

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590910

研究課題名(和文) RNA結合蛋白を介したオートファジー制御による抗癌剤耐性克服への挑戦

研究課題名(英文) An RNA binding protein, RBM5 modulates chemotherapeutic efficacy via the expression of p62.

研究代表者

清水 勇一 (Shimizu, Yuich)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90333608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 癌化学療法の問題点の一つは、治療経過中に薬剤耐性細胞が出現するために腫瘍が再増殖をきたすことである。そのため抗癌剤耐性に関する研究は重要な課題である。

RNA結合タンパクの1つであるRBM5をノックダウンさせた胃癌細胞に各種抗癌剤を投与すると、オートファジー調節因子の1つであるp62のmRNAおよびタンパク発現量が増加することが判明した。また、5-FU耐性胃癌細胞においてはp62の発現亢進を認め、5-FUにオートファジー阻害剤を併用すると感受性は部分的に回復した。これらのことは、オートファジーの経路が抗癌剤耐性獲得の経路に関与しており、RBM5がその調節経路に関与していることを示唆された。

研究成果の概要(英文)： The molecular mechanisms of drug resistance against cancer chemotherapy have not been yet fully elucidated. Several studies have shown that the acquisition of drug resistance is tightly regulated by post-transcriptional regulators such as RNA binding proteins, which change the stability and translation of mRNAs encoding factors involved in drug metabolism. RBM5 (RNA-binding motif protein 5) is known to modulate apoptosis and cell cycle arrest but the molecular mechanisms of RBM5 function remains to be examined. We show here that RBM5 modulates the expression of p62, which is a scaffold protein that has multiple functions, such as cell survival, oxidative stress response, and autophagy. Recent reports suggest that autophagy is one of the processes contributing to drug resistance. We suggest that RBM5 plays important roles in the post-transcriptional regulation of mRNAs that are involved in the chemotherapeutic cellular response.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は造血器腫瘍や生殖器癌に比較して化学療法の奏効率は低く、多剤併用による強力な化学療法を行っても、進行癌においては未だに予後不良である。癌化学療法の問題点の一つに、治療過程において薬剤耐性細胞が出現し、腫瘍の再増殖をきたすことがあげられる。そのため、腫瘍細胞の抗癌剤への感受性や耐性を規定する制御因子の解明は重要である。

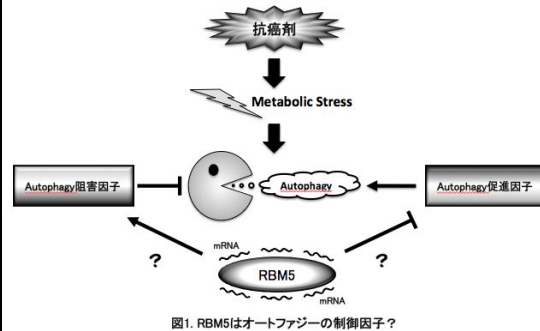
一般に飢餓状態におかれた細胞は、自己の蛋白質やオルガネラの分解により、不足したアミノ酸等を補う反応としてオートファジーが起こる。しかしオートファジーは飢餓以外にも、病原体感染、低酸素、DNA 損傷、酸化ストレスなどによっても誘導され、細胞質内蛋白質の品質管理、細胞分化、感染・免疫制御などの様々な生理的役割が推測されている。また、オートファジー制御遺伝子である Beclin1 や Atg7 などのノックアウトマウスでは発癌が見られ、癌抑制遺伝子としても機能していると推測されている。しかし一方で、オートファジーは腫瘍細胞が血管新生による栄養供給を受けるまでの栄養補給源として機能することや、抗癌剤抵抗性を助長する可能性も指摘されている。このように現時点では、オートファジーが抗癌剤効果に与える影響は、抗癌剤や癌細胞の種類などにより、相反する現象が知られており、その分子機構やアポトーシスとの相互作用は十分に解明されていない。

遺伝情報の発現は、DNAから蛋白質までの様々な段階で複雑に制御されている。RNA結合タンパクは、mRNAのスプライシング、核外輸送、細胞質内局在、安定性及び翻訳効率の調節などの転写後遺伝子発現調節において重要な働きをしている。これまでにRNA結合タンパクの1つであるRBM5が、癌抑制遺伝子p53の転写活性を亢進させることを報告してきた。またp53は一般に癌細胞に対して、各種抗癌剤の感受性を高めることが知られている。一方で、各種の癌組織においてRBM5の発現低下が報告されており、RBM5の発現量の変化が癌細胞の抗癌剤感受性あるいは抗癌剤耐性に何らかの影響を与える可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

オートファジーは癌細胞の抗癌剤耐性機構と薬剤による細胞死誘導機構の両方に関与する可能性があり、その調節機序解明は抗癌剤耐性克服と新たな治療戦略に寄与するものと期待される。また、オートファジーにより癌細胞が治療抵抗性を示す場合には、オートファジー促進因子を新たな治療抵抗性予測因子として臨床応用できる可能性もある。あるいは、オートファジー抑制因子が抗癌剤の感受性を増強させるのであれば、その存在は治療効果予測因子ともなり得る。このように、将来的にはオートファジー制御因子

が新しい予後判定因子としての応用も期待される。本研究は、これまでの研究を進展させて、抗癌剤投与中の癌細胞においてRBM5が発現を制御する新規のオートファジー調節因子を検索し、抗癌剤感受性あるいは耐性に与える影響を検討する。さらに、その作用機序を解明し、抗癌剤耐性克服への応用を目指すものである(図1)。



3. 研究の方法

(1) RBM5 による制御を受けるオートファジー調節因子の網羅的検討: 胃癌細胞株にRBM5を標的とするshRNA安定発現させたRBM5ノックダウン細胞株を作成した。この細胞株とコントロールの細胞株に抗癌剤として5-フルオロウラシル(5FU)、シスプラチン、ゲムシタピンなどを投与した。投与時間としては12時間、24時間、48時間、96時間を検討した。RBM5発現量およびこれらの抗癌剤により変動する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。本研究ではこれらのうち、オートファジー関連遺伝子を候補遺伝子として拾い上げて、その後の追加検討を行った。

(2) RBM5 抗 RBM5 モノクローナル抗体の作成: RBM5 に対する市販の抗体では、本研究に使用可能な良質な抗体が存在しなかったため、ヒト全長RBM5のcDNAよりリコンビナントタンパクを精製し、これを抗原としてマウス抗 RBM5 モノクローナル抗体を作成した。

以下の実験において、その他の抗体は市販のものを使用した。

(3) 定量的 RT-PCR: 培養細胞より Total RNA を抽出し、cDNA を RT-PCR により作成した。定量的 PCR は Taqman Probe (Applied Biosystems) を用いて、Real Time PCR 法にて測定した。

(4) 細胞増殖能の測定: 培養細胞を 96 well プレートに $1.5-2.0 \times 10^3$ 個ずつ播き、各種抗癌剤存在下に培養を行い、細胞数を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay kit (Promega) を用いて測定した。

(5) 新規の抗癌剤感受性制御候補遺伝子の発現プラスミドを作成し培養細胞株において強発現させて、抗癌剤感受性に与える影響を検討した。また siRNA により抗癌剤感受性制御候補遺伝子ノックダウンさせ同様の検討を行った。

(6) 作成した抗 RBM5 モノクローナル抗体を用いて、培養癌細胞内の動態を観察した。また、病理組織検体の免疫組織染色を行い、臨床病理学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) RBM5 は p62 の発現量を調節する

RBM5 をノックダウンさせた癌細胞株とコントロール株に各種抗癌剤を投与し、マイクロアレイにより変動遺伝子の解析を行った。オートファジー関連因子のうち変動の大きいものを定量的 RT-PCR にて確認したところ、オートファジー調節因子の1つである p62 において、胃癌細胞株、大腸癌細胞株、膵癌細胞株に共通の変動を示した(図 2)。さらに Western Blot 法により、RBM5 をノックダウンさせることにより p62 のタンパク発現量を増加させることが判明した(図 3)。

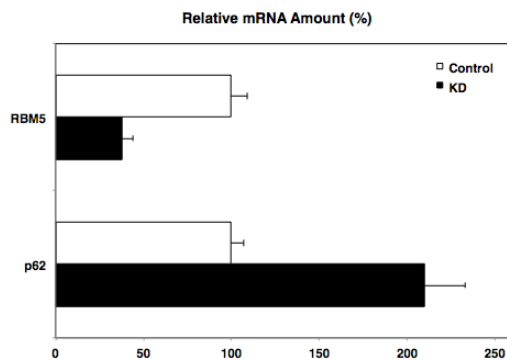


図2: RBM5ノックダウンによるp62mRNAの変化

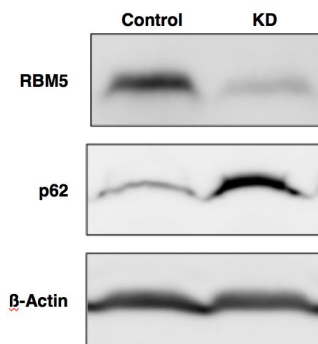


図3: RBM5ノックダウンによるp62タンパク量の変化

(2) 5FU 耐性の胃癌細胞株では p62 の発現が亢進している

既報では p62 がシスプラチンなどの抗癌剤耐性に関与すると報告されている。そこで、5FU 耐性の胃癌細胞株(5FU-R)を樹立した。この 5FU-R 細胞においては、親株と比較して

p62 のタンパク発現量が亢進していることが判明した(図 4)。

(3) オートファジーの抑制は抗癌剤効果を増強する

5FU-R 細胞と親株の胃癌細胞にオートファジー阻害剤の1つである 3-メチルアデニン(3-MA)を前処置後に 5FU を加えたところ、5FU に対する感受性が部分的に回復した(図 5)。

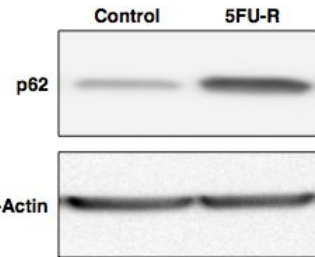


図4: 薬剤耐性誘導によるp62タンパク量の変化

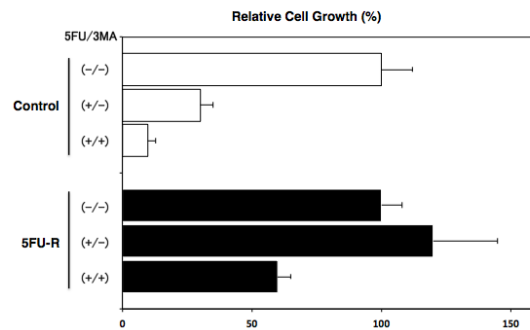


図5: オートファジー阻害による抗癌剤効果の変化

またシスプラチンでも類似の結果が得られた。このことは、オートファジーの経路が、抗癌剤耐性獲得の経路に関与していることを示唆していると考えられた(図 6)。

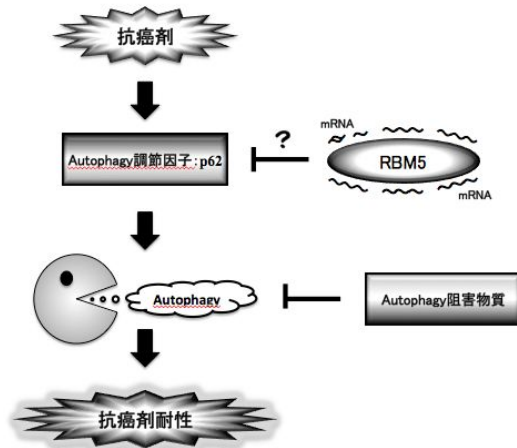


図6: RBM5は抗癌剤感受性制御因子?

(4) 考察

本研究において、RBM5 は p62 の発現に関与し、RBM5 のノックダウンにより p62 の発

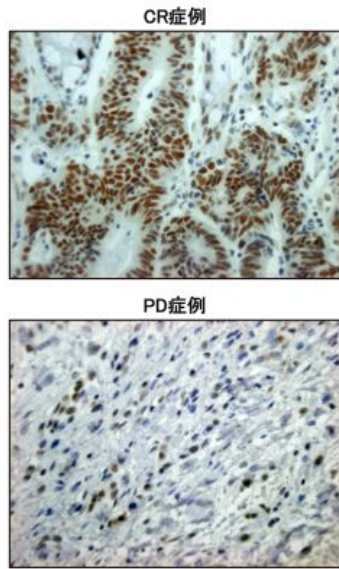


図7: RBM5の発現量と化学療法の効果の関連

現亢進を引き起こすことが示された。また抗癌剤耐性細胞株では、p62 の発現亢進を認めた。これらの結果は、RBM5 の発現量の低下している癌細胞では、5FU やシスプラチンなどの抗癌剤に対して、より抵抗性を示す可能性がある。現在、症例数は少ないが手術組織を用いて、RBM5 発現量を免疫染色により基礎検討している。癌組織における RBM5 の発現量は、術後の化学療法に対する効果に相関する傾向を認めている(図 7)。そこで今後は、胃癌、大腸癌、膵臓癌などの手術時標本を用いて RBM5 および p62 の発現量を検討し、臨床病理学的因子、化学療法に対する効果および予後との関連を検討していく予定である。さらに、同一患者の内視鏡生検サンプルを用いて、抗癌剤投与前後における RBM5 および p62 の発現量も合わせて検討していきたいと考える。これらの検討から、術前あるいは化学療法前の RBM5 および p62 の発現量により、抗癌剤に対する感受性を予測できる可能性を検討していきたいと考えている。

今回の検討では、RBM5 のノックダウンにより、p62 の mRNA およびタンパク発現量が上昇した。しかしながら、RBM5 が直接的に、あるいは間接的に p62 の発現を制御しているのか判明していない。今後は RBM5 による p62 発現制御に関わる分子機序を検討していく予定である。

近年、p62 はオートファジーに関与するのみならず、Keap1 に直接結合することにより、Nrf2-Keap1 の複合体に作用し、細胞の酸化ストレス応答に重要な働きをしていることが報告されている。癌細胞において Nrf2-Keap1 の制御機構が破綻することが、癌化メカニズムにとっても重要なステップとなることが示唆されている。p62 がオートファジーと酸化ストレスにおいて、どのような分子メカニズムでコントロールされているかは十分に

理解されていない。最近、p62 のリン酸化が、その機能制御に重要であることが報告された。

今後は p62 の野生型に加えて、変異型の発現プラスミド、shRNA の発現プラスミドを作成し、癌細胞内において RBM5 および p62 が、オートファジーや抗癌剤耐性克服の分子制御機構にどのように関与しているのかを詳細に検討を行っていく予定である。

また今回の検討では、オートファジーの阻害剤は、部分的にはあるが抗癌剤耐性を低下させて、抗癌剤の感受性を回復させた(図 5)。このことは将来的には、RBM5 の作用を増強させる物質、p62 の作用阻害剤などのオートファジー抑制剤の開発は、抗癌剤との併用した場合に有用な抗癌剤耐性克服のための分子標的薬になりうると期待されるものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 8 件)

Mizushima T, Kato M, Iwanaga I, Sato F, Kubo K, Ehira N, Uebayashi M, Ono S, Nakagawa M, Mabe K, Shimizu Y, Sakamoto N. Technical difficulty according to location, and risk factors for perforation, in endoscopic submucosal dissection of colorectal tumors. *Surg Endosc.* 2015 Jan;29(1):133-9. doi:

10.1007/s00464-014-3665-9. 査読有

Shimizu Y, Takahashi M, Mizushima T, Ono S, Mabe K, Ohnishi S, Kato M, Asaka M, Sakamoto N. Chromoendoscopy with iodine staining, as well as narrow-band imaging, is still useful and reliable for screening of early esophageal squamous cell carcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2015 Jan;110(1):193-4. doi:

10.1038/ajg.2014.371. 査読有

Omori S, Mabe K, Hatanaka K, Ono M, Matsumoto M, Takahashi M, Yoshida T, Ono S, Shimizu Y, Sugai N, Suzuki A, Katsuki S, Fujii T, Kato M, Asaka M, Sakamoto N. Human intestinal

spirochetosis is significantly associated with

sessile serrated adenomas/polyps. *Pathol Res Pract.* 2014 Jul;210(7):440-3. doi: 10.1016/j.prp.2014.03.007. 査読有
Shimizu Y, Takahashi M, Yoshida T, Ono S, Mabe K, Kato M, Asaka M, Sakamoto N. A "resect and watch" strategy with endoscopic resection for pharyngeal cancer with massive subepithelial invasion would not be rational. *Gastrointest Endosc.* 2014 Jan;79(1):178-9. doi: 10.1016/j.gie.2013.07.057. 査読有
Takahashi M, Shimizu Y, Ono M, Suzuki M, Omori S, Yoshida T, Mori Y, Nakagawa M, Ono S, Nakagawa S, Mabe K, Kato M, Hatanaka K, Asaka M, Sakamoto N. Endoscopic diagnosis of early neoplasia of the esophagus with narrow band imaging: correlations among background coloration and iodine staining findings. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Apr;29(4):762-8. doi: 10.1111/jgh.12477. 査読有
Shimizu Y, Takahashi M, Yoshida T, Ono S, Mabe K, Kato M, Asaka M, Sakamoto N. What is an adequate management strategy for pharyngeal low-grade dysplasia? *Gastrointest Endosc.* 2013 Jun;77(6):972-3. doi: 10.1016/j.gie.2012.12.012. 査読有
Shimizu Y, Takahashi M, Yoshida T, Ono S, Mabe K, Kato M, Asaka M, Hatanaka K, Sakamoto N. Endoscopic in vivo cellular imaging of superficial squamous cell carcinoma of the head and neck by using an integrated endocytoscopy system. *Gastrointest Endosc.* 2013 Aug;78(2):351-8. doi: 10.1016/j.gie.2013.03.1336. 査読有
Shimizu Y, Takahashi M, Yoshida T, Ono S, Mabe K, Kato M, Asaka M, Sakamoto N. Endoscopic resection (endoscopic mucosal resection/ endoscopic submucosal dissection) for superficial esophageal

squamous cell carcinoma: current status of various techniques. *Dig Endosc.* 2013 Mar;25 Suppl 1:13-9. doi: 10.1111/j.1443-1661.2012.01408.x. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清水 勇一(SHIMIZU YUICHI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号:90333608

(2)研究分担者

小林 隆彦 (KOBAYASHI TAKAHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号:80333607