

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430159

研究課題名(和文) 新しい網羅的遺伝子解析を用いた食道癌化学放射線療法耐性遺伝子の解明

研究課題名(英文) The novel and comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug and radiation in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

川久保 博文 (Hirofumi, Kawakubo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：20286496

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)：食道癌細胞にトランスポゾンを導入することで、抗癌剤耐性遺伝子を増幅もしくは、減弱させ、抗癌剤暴露環境下で培養し、作成した抗癌剤耐性株のDNA解析を行うことで、耐性遺伝子を特定することが可能となる。食道癌細胞株TE4,5,9,15について、Transposon tagged cellを樹立した。樹立したtransposon tagged cellを用いて、各種薬剤を添加もしくは放射線照射を施行し、TE4,15についてシスプラチン耐性株および放射線耐性株を獲得した。シスプラチン耐性遺伝子は37種類、放射線耐性遺伝子は10遺伝子を同定され、このスクリーニングシステムが有用なことが証明された。

研究成果の概要(英文)：Transposon is a base sequence which transports to other location in the genome at random. Transposon is activated by transposase which is enzyme in transposon its self. Activatted transposon transports to other location in the genome (cut and paste). Inserting CMV promoter to transposon as a transcriptional activator, varioius cells which have vaious overexpressed genes or knocked down genes are obtained. Using this system into esophageal squamous cell cancer (ESCC), drug or radiation was added into these cells, and the resistant colonies were harvested to detect resistant gene. This new gene screening technique was useful for detecting candidate of drug-resistant genes and radio-resistant genes in esophageal squamous cell carcinoma. We identified 37 candidate genes responsible for CDDP resistance in the two cell lines derived from ESCC cells. Eleven genes were detected as candidate radioresistant genes in the two cell lines derived from ESCC cells.

研究分野：一般消化器外科

キーワード：食道癌 抗癌剤耐性 放射線耐性 トランスポゾン 網羅的遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

食道癌は早期にリンパ節転移をきたしやすく、進行癌で発見されることが少なくなく、また切除可能であっても予後不良な疾患である。食道癌に対する化学療法は、5-FU、シスプラチン、マイトマイシンC、ドセタキセル、ビンレブリン、ネダプラチン、イリノテカン、ゲムシタピンなど多数の薬剤が使用されてきたが、単剤での奏効率は15~52%と報告されて、生存期間延長は認められていない。現時点では我が国では、初回治療として、シスプラチン+5-FUが用いられ、特に切除可能なStage・胸部食道癌(UICC分類2002年版)を対象としたシスプラチン+5-FUによる術前化学療法を比較したランダム化比較試験JCOG9907では、術前化学療法群で全生存期間が有意に改善した。この結果を受け、Stage・胸部食道癌に対する術前化学療法+根治手術は、我が国における標準的治療として位置付けられるようになった。一方、根治化学放射線療法は欧米ではRTOG(Radiation Therapy Oncology group)、わが国ではJCOGを中心に臨床研究が施行されてきた。RTOG85-01では臨床病期T1-3、N0-1、M0の胸部食道癌に対し化学放射線療法と放射線単独治療を比較して5年全生存率が27%対0%と有意に良好であり、根治療法としての化学放射線療法の有用性が示された。RTOG94-05では化学療法は同様に、放射線照射量を50.4Gyと64.8Gyを比較し、照射量の増量効果を認めなかった。この結果をふまえて、FP療法に併用する放射線量は50.4Gy(1.8Gy×28回)が標準となった。さらに化学放射線療法後の遺残、再発例に対してはサルベージ手術が積極的に行われている。このように進行食道癌の治療は手術、化学療法、放射線治療を含めた集学的治療を施行する。しかし、上記の結果をみても化学療法、化学放射線療法の奏効率、長期成績は不十分といえる。治療抵抗性の食道癌はもともと化学療法耐性遺伝子、放射線療法耐性遺伝子を有していることや、治療経過中に薬剤耐性が生じることが原因と考えられる。奏効しない症例にとっては有害事象のみの無駄な治療となることから薬剤および放射線耐性のメカニズムの解明し、個々の症例に対する個別化した治療戦略が非常に重要と考えられる。

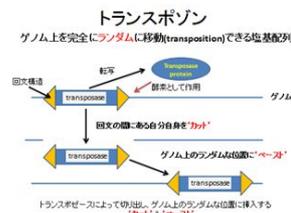
2. 研究の目的

現在進行食道癌治療の標準的化学療法であるシスプラチン、5-FUと放射線治療の薬剤耐性遺伝子と放射線耐性遺伝子を調べ、進行食道癌患者の化学療法、放射線療法、化学放射線療法の治療効果を予測し、進行食道癌の新たな治療戦略の開発と治療成績の向上を目指すことを目的とする。また、この治療抵抗性遺伝子の網羅的遺伝子解析の手法を用いて、個々の症例に対して他の多くの薬剤感受性予測し、個別化治療により治療成績が向

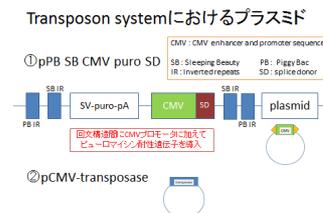
上させる。

3. 研究の方法

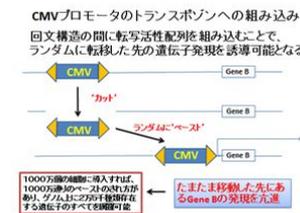
トランスポゾンとはゲノム上を完全にランダムに移動(transposition)できる塩基配列である。動く遺伝子、転移因子(Transposable element)とも呼ばれる。1940年にBarbara McClintockがトランスポゾンの転移によってトウモロコシの実に斑を生じることを発見したが、Sleeping Beauty(魚類)、piggyBac(昆虫)などのトランスポゾンが存在し、これらはヒトやマウスの細胞でも機能することが示されている。遺伝子をはさんだ両端に回文配列や挿入配列があり、この部分が必要な酵素を指定し、挿入の対象となる部位の塩基配列の重複回数を決めるなど、転移に重要な役割を果たしている。トランスポゾンは自身に含まれるトランスポゼーゼという酵素により'カット' & 'ペースト'され、ゲノム上のランダムな位置に挿入される。



トランスポゾンの回文構造間に転写活性因子であるCMVプロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドとトランスポゼーゼを発現ベクターに組み込んだプラスミドの2つのプラスミドを細胞に導入することで、ランダムに転移した先の遺伝子発現を誘導可能となる。

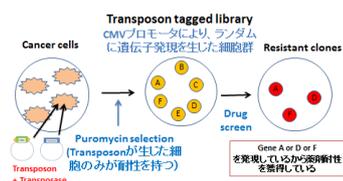


この性質を利用し食道癌細胞にこのトランスポゾンを導入することで、ある特定の遺伝子を増幅させ、さまざまな薬剤環境下で培養し、網羅的なDNA解析を行うことで、耐性遺伝子を特定する。



- 食道癌細胞において Transposon tagged cell の樹立
前述の通り、各種細胞へトランスポゾンを

用いて、CMV プロモーターとピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、ピューロマイシンによる selection を行い、細胞一つ一つにおいて CMV プロモーターがゲノム上のランダムな位置に挿入された細胞プールである、Transposon tagged cell を樹立する。



2) 食道癌細胞株でのシスプラチン、5-FU、放射線耐性株の獲得

野生型細胞株が全滅する薬剤濃度を決定した後、樹立した transposon tagged cell を用いて、その濃度の薬剤を添加する。CMV プロモーターにより薬剤耐性に関与する遺伝子を過剰発現した細胞は single cell として生き残り、3 週間程度培養することでコロニーを形成する。我々が樹立した食道癌細胞株の transposon tagged cell に、任意の濃度のシスプラチン、5-FU または放射線を暴露し、耐性株の獲得をする。

3) シスプラチン、5-FU 耐性遺伝子および放射線耐性遺伝子の同定

耐性を獲得したコロニーをピックアップし、それぞれのコロニーから Genomic DNA を抽出する。トランスポゾンにより CMV プロモーターが挿入された箇所を制限酵素にて切り出し、切断部位にリンカーを合成し、Splinkerette PCR を行って同部位の DNA を増幅し、Topo Cloning 法を用いてプラスミドベクターへのクローニングを行う。これを鋳型として Sequence により増幅した DNA の塩基配列を同定し、BLAST を用いて遺伝子を同定する。5FU、放射線に関しても同様の手法により耐性遺伝子の解析を行う。

4) 薬剤および放射線耐性株の耐性を確認する

薬剤および放射線耐性株の遺伝子発現を real-time quantitative PCR にて確認する。薬剤および放射線を暴露し、野生株と比較して耐性を認めるかを調べる。

4 . 研究成果

食道癌細胞にトランスポゾンを導入することで、抗癌剤耐性遺伝子を増幅もしくは、減弱させ、抗癌剤暴露環境下で培養し、作成した抗癌剤耐性株の DNA 解析を行うことで、耐性遺伝子を特定することが可能となる。

食道癌細胞株 TE4,5,9,15 について、Transposon tagged cell を樹立した。樹立した transposon tagged cell を用いて、各種薬剤を添加もしくは放射線照射を施行した。コロニー形成を生じた場合、薬剤耐性に関する遺伝子を過剰発現もしくは低発現して

いる細胞株と考えられる。TE4,15 についてシスプラチン耐性株および放射線耐性株を獲得した。シスプラチン耐性遺伝子は 37 種類同定し、報告した (Tsutsui M, Int J Oncol. 2015)。シスプラチン耐性遺伝子の 1 つ JAK2 低発現株の JAK2 発現低下は Real-time quantitative PCR で確認し、実際に薬剤 (シスプラチン) 耐性を確認した。JAK2 は JAK2/STAT3 シグナル経路によりアポトーシスを誘導する。シスプラチン暴露後のアポトーシスは有意に抑制されていた。

放射線耐性遺伝子は 10 遺伝子を同定した。放射線耐性遺伝子株の 1 つ MT-CO1 低発現株の発現低下は Real-time quantitative PCR で確認し、放射線耐性を確認した。放射線耐性遺伝子の MT-COX1 はアポトーシスを誘導すると報告されている。放射線照射後の caspase-3 活性は MT-CO1 低発現株で有意に低値であり、MT-CO1 低発現株はアポトーシスが阻害されていることにより、放射線耐性を獲得していた。

このスクリーニングシステムが実際に機能していることが証明され、シスプラチン、放射線耐性の候補遺伝子が同定された。今後はそれぞれの耐性株において遺伝子発現を調べ、実際に耐性を有しているかを確認する。臨床検体を用いて、耐性遺伝子を検索し、実際に化学放射線療法の治療効果と関連するかを調べる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Tsutsui M, Kawakubo H, Hayashida T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Takeuchi H, Kitagawa Y. Comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Oncol, 査読有, 47,2015, 867-874. DOI: 10.3892

[学会発表](計 5 件)

1. 気賀澤悠, 川久保博文, 福田和正, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 竹内裕也, 北川雄光. 食道癌抗癌剤耐性遺伝子として JAK2 遺伝子の検討. 第 26 回日本消化器癌発生学会総会, 2015 年 11 月 19 日, 米子全日空ホテル (鳥取県米子市).
2. Tsutsui M, Kawakubo H, Hayashida T, Fukuda K, Takeuchi H, Kitagawa Y. The Novel Comprehensive Screening of Anticancer Drug Resist Genes of Esophageal Cancer. 14th World Congress of International Society for Diseases of the Esophagus (ISDE), 2014 年 9 月 24 日, Vancouver (Canada).
3. 武居友子, 川久保博文, 林田哲, 福田和

正, 中村理恵子, 高橋常浩, 和田則仁, 竹内裕也, 才川義朗, 大森泰, 北川雄光. トランスポゾンを用いた網羅的遺伝子解析による食道癌放射線耐性遺伝子の同定. 第 52 回日本癌治療学会学術集会, 2014 年 8 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

4. 筒井麻衣, 川久保博文, 林田哲, 福田和正, 竹内裕也, 北川雄光. トランスポゾンを用いた食道癌薬剤耐性遺伝子の網羅的解析法. 第 68 回日本食道学会学術集会, 2014 年 7 月 3 日, 東京ドームホテル (東京都文京区).

5. 筒井麻衣, 川久保博文, 林田哲, 福田和正, 竹内裕也, 北川雄光. トランスポゾンを用いた、薬剤性遺伝子の網羅的解析法. 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2013 年 7 月 11 日, プエナビスタ松本 (長野県松本市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川久保 博文 (KAWAKUBO, Hirofumi)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 20286496

(2) 研究分担者

林田 哲 (HAYASHIDA, Tetsu)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80327543

筒井 麻衣 (TSUTSUI, Mai)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90573460