

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 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：25461997

研究課題名(和文)新規網羅的スクリーニング法によるサブタイプ別乳癌細胞における薬剤耐性遺伝子の検索

研究課題名(英文)The Novel Comprehensive Screening of Anticancer Drug Resistant Genes of Breast Cancer Cell

研究代表者

高橋 麻衣子(Takahashi, Maiko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：50348661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤治療を継続していく上で薬剤耐性獲得が問題となるため、様々な耐性遺伝子解析法が行われているが、我々はトランスポゾンを用いたまったく新しい網羅的な薬剤耐性遺伝子のスクリーニングを行った。本手法の利点は、任意の細胞株と分子標的薬を含む任意の抗癌剤の組み合わせで、薬剤耐性遺伝子の解析が可能となる点であり、我々はこの手法を用いて「食道扁平上皮癌・放射線耐性」「Luminal乳癌・エリブリン」「HER2陽性乳癌・ラパチニブ」等、複数の組み合わせについて候補遺伝子の蓄積を行った。今後は本手法を用いて様々な応用を行い、トランスレーショナルリサーチとして臨床応用を試みていく。

研究成果の概要(英文)：Drug resistance is one of the major issues in managing esophageal cancer patients as chemotherapy is a pillar treatment today. Since drug resistance may be mediated by genetic changes in the tumor, the identification of gene mutation may lead to better outcomes in therapy. We performed a novel method using transposon for a comprehensive screening with a view to identify drug resistant genes. Transposons are DNA sequences that move from one location on the genome to another. By this nature, a modified piggyBac transposon was designed as an insertion mutagen. A cytomegalovirus (CMV) promoter sequence was added to initiate strong transcription. When the transposon is inserted to the upstream of a certain gene, the gene will be up-regulated while when inserted downstream of intragenically it will be down regulated. The method is inexpensive and relatively simple, and capable both in activation and disruption, leading to comprehensive screening.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：薬剤耐性 スクリーニング トランスポゾン 乳癌

1. 研究開始当初の背景

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り、両側の回文構造の間に自分自身を切り出し(=カット)、ゲノム上のランダムな位置に挿入(=ペースト)する働きを持つトランスポゼースという酵素を併せ持っている。

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、その後 Sleeping Beauty(魚類), piggyBac(昆虫)などのトランスポゾンが発見され、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た。

我々の共同研究者である Massachusetts General Hospital の Dr. Chen らは、このトランスポゾンから2つのプラスミドを作製した。1つは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(pPB-SB-CMV-puro-SD)でありもう1つはトランスポゼースを発現ベクターへ組み込んだプラスミドである。これらプラスミドを細胞に導入することで、CMV プロモータをゲノム上のランダムな位置に「カット&ペースト」し、一つ一つの細胞がランダムな遺伝子を高発現する「細胞プール」を得ることができる。仮に1000万個の細胞にこのトランスポゾンを導入すれば、10000万通りのペーストのされ方があり、遺伝子発現も1000万通りとなる。Dr.Chen の試算によれば、CMV プロモータが約50Kbpをカバーすることが可能であることを考慮すると、全ゲノムを網羅することが可能となる。

このトランスポゾンを導入した細胞(transposon tagged cell : TTC)に薬剤投与を行い、薬剤耐性コロニーを形成した場合、その細胞が高発現している遺伝子が投与薬剤に対する耐性遺伝子である可能性が考えられる。また、複数のコロニーで同一の遺伝子発現が増強されていれば、その遺伝子が薬剤耐性遺伝子である可能性はさらに高まる。

トランスポゾンを用いた手法により、複数の乳癌細胞株と薬剤の組み合わせを用いて、乳癌薬剤耐性に関与する遺伝子の同定を試みることが可能である。

我々は本システムを用いて前実験を行い、複数の耐性遺伝子候補リストを得た。その中にはラパチニブに対するPI3KCAなど、既知の薬剤耐性遺伝子が含まれていることから、この新しいシステムは妥当性・確実性の高い研究であると考えられた。

トランスポゾンを用いた研究の優れた点は、ヒトゲノム上の全遺伝子を網羅可能である点、そしていかなる癌種・いかなる薬剤を用いても耐性遺伝子の検討が可能にある点にある。乳癌薬物療法においては、術後補助療法と同様に転移・再発後の薬物療法も重要であり、その治療過程における薬剤耐性化、病勢増悪が問題となる。本研究により乳癌薬剤耐性遺伝子を同定することで、乳癌患者それぞ

れの遺伝子発現状況に応じた最適な薬剤選択の一助となれば、さらなる乳癌個別化治療にむけてその貢献度は非常に高いと考えられる。また、耐性遺伝子の同定が薬剤耐性化メカニズム解明の一助となり、新しいコンセプトの治療開発や、新たな分子標的治療薬の標的となる可能性に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、我々独自の全く新しい、トランスポゾンを利用した薬剤耐性遺伝子スクリーニング法を用いて、乳癌細胞株における薬剤耐性遺伝子の同定を試みることを目的とする。本システムを用いることで、ヒトゲノム上に存在する全ての遺伝子を網羅的に対象としたスクリーニングが可能であり、しかも「任意の乳癌細胞株」と「任意の薬剤」を用いて薬剤耐性に寄与すると考えられる遺伝子の検索が可能となる。

本研究において明らかにすべき事項は以下の点である

- (1) 各細胞株における transposon tagged cell library の樹立
- (2) 薬剤耐性遺伝子リストの獲得と商業データベースである NextBio system を用いた各遺伝子の耐性遺伝子としての可能性の選別
- (3) 薬剤耐性候補遺伝子の過剰発現株作製と薬剤耐性の評価
- (4) 臨床検体における耐性候補遺伝子の発現状況と薬剤耐性との相関の評価

前述の通り、各細胞へトランスポゾンを用いて、CMV プロモータ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セレクションをかけることで、細胞一つ一つにおいて CMV プロモータ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 (TTC)を樹立する。

この TTC に対して各種薬剤を用いて耐性株を作成し、遺伝子を同定する。

その後同定した薬剤耐性遺伝子の発現ベクターを作成し、これを各種乳癌細胞へ導入することで高発現株を作製し、MTT assay 法を用いてコントロールと比較し、薬剤耐性化が生じるか否かの評価を行う。

3. 研究の方法

- (1) Transposon tagged cell の樹立

酵素であるトランスポゼースが、トランスポゾン導入に必須であることを確認するため、酵素のあり・なしでピューロマイシンによるセレクションを行った。

各細胞株においてピューロマイシンによる最小殺細胞濃度を測定し、これに従って chemical transfection 法によりトランスポゾンおよびトランスポゼースの両者を細胞株に導入後、ピューロマイシンを添加した。これにより、CMV プロモータおよびピューロ

マイシン耐性遺伝子がゲノム上加えられた細胞のみが生き残ることができると考えられる。これを transposon tagged cell (TTC) として以降の実験に使用した。具体的に本システムに適用する細胞株は以下の通りである。

MCF7 ER (+) HER2 (-) Luminal A
 T47D ER (+) HER2 (+) Luminal B
 BT474 ER (-)HER2 (+) HER2 enriched
 SKBR3 ER (-)HER2 (+) HER2 enriched
 MDA-MB468 ER(-)HER2 (-) Basal type
 TE-4, TE-15 食道癌細胞

(2) 薬剤耐性コロニーの樹立

各種細胞株において、エリブリン・エリブリン・ラパチニブ等の薬剤に対する最小殺細胞濃度を MTT assay によって測定した。これを前述した TTC に適用し、single cell からコロニー形成を認めたところでピックアップし、培養を行った。これらは各種薬剤耐性株と考えられ、一部を凍結。一部を以降の研究に使用した。

本研究では、薬剤のみならず放射線耐性についてもこのシステムが適用できるか否かを検討するため、放射線耐性株を食道癌細胞を用いた TTC に対して樹立を行った。

(3) 薬剤耐性遺伝子の同定

耐性コロニーをピックアップして、単離培養した後、ゲノム DNA を抽出して、トランスポゾンにより CMV プロモータが挿入された箇所を制限酵素にて切り出す。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 クローニング法を用いてプラスミドベクターへクローニングを行う。これを鋳型として、シーケンスにより増幅した DNA の塩基配列を同定し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて遺伝子を同定する。

4. 研究成果

前述した細胞株に対して、TTC を作成した。我々は酵素であるトランスポゼースが、トランスポゾン導入に必須であることを確認するため、酵素のあり・なしでピューロマイシンによるセレクションを行った。その結果、前述のトランスポゾンがコードされたプラスミド (pPB-SB-CMV-puro-SD) のみの導入で、酵素を導入しなかった細胞株では、ピューロマイシンにより全滅したが、トランスポゼースを同時に導入した細胞株ではコロニー形成が認められた。(図 1)

この pPB-SB-CMV-puro-SD とトランスポゼースの double transfection を、細胞数 1000 万個というラージスケールで複数回行うことで、全ゲノムを網羅した TTC の樹立を行った。

我々はまず MCF7, T47D, SKBR3, MDA-MB468 において、試験的に TTC を 1 プールずつ樹立

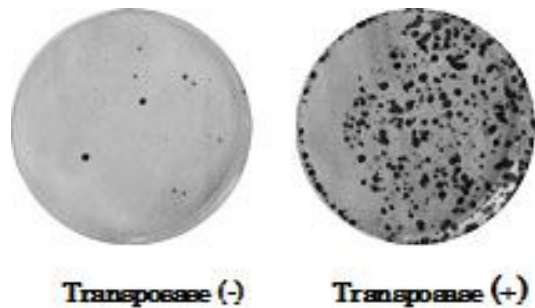


図1 ピューロマイシンセレクション 酵素により DNA への挿入が行われた細胞のみが生存

し、これを以下の実験に適用して本システムの妥当性を検討した。すなわち、以下の組み合わせについて薬剤耐性株を作成し、その耐性遺伝子を同定することを行った。

- ・ホルモン陽性乳癌細胞 - エリブリン
- ・HER2 陽性乳癌細胞 - ラパチニブ
- ・トリプルネガティブ乳癌細胞 - エピルビン

HER2 陽性乳癌細胞株である SKBR3 については、ラパチニブ耐性株を作成し、約 40 種類のコロニーがピックアップ可能であった。これに対して、ゲノム DNA を抽出し、前述の方法にてラパチニブ耐性遺伝子の候補遺伝子を同定することが可能であった。

これらのいくつかを挙げると、THSD7A・PIK3CA・ARL15・FAR1 などである。特に、PIK3CA は、その過剰発現がラパチニブ耐性をもたらすことは既に多くの報告がなされており、既知の事項である。よって、BLAST でこの遺伝子がヒットしたことは、トランスポゾンを用いてランダムに遺伝子転写を促進する今回の実験系が正しく機能したことを示唆している。

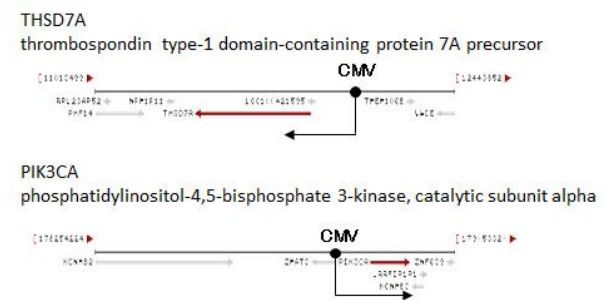


図2 ラパチニブ耐性遺伝子と今回の CMV プロモータが挿入された部位

MCF7 に対してエリブリンを添加したところ、こちらについては約 80 種類のコロニーをピックアップすることが可能であった。こちらに対しても、同様の処理を行い、候補遺伝子の同定を試みたが、PCR 等の処理が困難であり、現時点で有効な遺伝子を同定することができていない。よって今後も繰り返し同定作業を継続し、エリブリン耐性遺伝子の同

定を目指す。

放射線耐性については、食道癌細胞株である TE-5, TE-15 を用いて研究を行った。これらに対する TTC を作成した後に、一定量の放射線照射を行い、耐性株を作成した。これらから耐性候補遺伝子の一つとして、MT-C01 のノックアウトが同定された。

実際に MT-C01 ノックアウト細胞に対して放射線照射を行ったところ、細胞死の抑制と早期の増殖能力回復が認められた。これら放射線耐性は、アポトーシスに関わる caspase cascade の活性阻害を通じて生じることを解明した。

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. 2015 Sep;47(3):867-74. doi: 10.3892/ijo.2015.3085. 査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 林田 哲、トランスポゾンによる薬剤・放射線耐性遺伝子の新規網羅的解析法とその運用、第 49 回制癌剤適応研究会、2016 年 3 月 25 日、会津東山温泉御宿東風(福島県会津若松市)

〔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

高橋 麻衣子 (Maiko Takahashi)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：50348661

(2)研究分担者

林田 哲 (Tetsu Hayashida)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80327543

神野 浩光 (Hiromitsu Jinno)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号:20216261

(3)連携研究者
なし