

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：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670857

研究課題名(和文) KIF遺伝子群のタキサン系抗癌剤耐性に果たす役割の解明と耐性克服治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of the role of the taxane anti-cancer drugs resistance of KIF genes and the development of treatment for overcoming resistance

研究代表者

丹沢 秀樹 (HIDEKI, TANZAWA)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50236775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：タキサン系抗癌剤の耐性メカニズムについて解析した。癌で特異的に発現増強を示していることが確認できた微小管作動性遺伝子であるKIF遺伝子群にフォーカスをあて、さらにタキサン系抗癌剤耐性遺伝子としてKIF4Aを同定した。口腔癌由来細胞株にshRNAを導入し耐性度を算出したところ、親株と比較して耐性の減少を認めた。さらにトランスフォーマントをマウスに移植し解析したところ耐性に関与している事が確認できた。KIF遺伝子は微小管を介して染色体の分離、紡錘体の配置、細胞質分裂に関与する遺伝子であり、紡錘体チェックポイント(SAC)に関する遺伝子の発現状態をKIF4Aが発現制御していることも確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the resistant mechanism to taxane-based anticancer drug was analyzed. Our preliminary study has already revealed that the specific enhanced expression of KIF family genes, which act to microtubules, was confirmed in oral squamous cell carcinomas (OSCCs). Of KIF family genes, we focused on KIF4A because of its expression pattern. In both in vitro and in vivo, the transformation experiments using shRNA indicated the involvement of KIF4A in resistance to taxane, anti-cancer drug. Because KIF genes are involved in the separation of chromosomes and the arrangement of the spindle, cytokinesis through the microtubule, we also reconfirmed the role of KIF4A controlling the expression status of the spindle assembly checkpoint (SAC)-related molecules (BUB1, MAD2, CDC20, and cyclin B1).

研究分野：医歯薬学

キーワード：KIF4A 口腔扁平上皮癌

1. 研究開始当初の背景

現在、癌化学療法で最も用いられているのは白金系抗癌剤、5-FU 系抗癌剤、そしてタキサン系抗癌剤である。抗癌剤治療における現在の重要な課題は、薬剤耐性の問題である。我々はすでに白金系抗癌剤、5-FU 系抗癌剤に関する薬剤耐性機構を研究し、薬剤耐性克服薬を開発し、臨床試験を行っている。本研究では残された抗癌剤のうち、主な薬剤であるタキサン系抗癌剤の耐性メカニズムを解析する。具体的には、先行研究でマイクロアレイにより癌で特異的に発現増強を示していることが確認できた微小管作動性遺伝子である kinesin family (KIF) 遺伝子群 (16 のサブファミリーを有する一大遺伝子群) にフォーカスをあて、タキサン系抗癌剤に対する作用を明らかにする。さらに、KIF 遺伝子群、あるいは遺伝子パスウェイ上で KIF 遺伝子群の上流遺伝子に対する阻害剤や発現増強剤を検索・同定し、タキサン系抗癌剤に対する耐性克服治療薬の可能性を検討する。

2. 研究の目的

マイクロアレイにより癌で特異的に発現増強をすでに確認した微小管作動性遺伝子である kinesin family (KIF) 遺伝子群にフォーカスを当て、以下の事項を明らかにする。

- (1) タキサン系抗癌剤作用メカニズムに対する KIF 遺伝子群の作用を明らかにする。
- (2) KIF 遺伝子、あるいは KIF 遺伝子の上流遺伝子に対する阻害剤や発現増強剤を検索・同定し、タキサン系抗癌剤に対する耐性克服治療薬の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) kinesin family (KIF) 遺伝子群 (16 個のサブファミリーを有する一大遺伝子群) の発現解析

口腔癌由来細胞 9 種類と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞を用いて KIF 遺伝子群の発現状態を real time PCR を用いて解析する。また多数の手術抽出、精製した cDNA を使用し同じく発現解析を real time PCR 法にて確認する。

(2) 実験使用細胞株の選択

癌由来培養細胞株から、KIF 遺伝子群で高発現していた遺伝子が増加している癌由来細胞株と減弱している癌由来細胞株を複数選び出す。これらの細胞株に関してタキサン系抗癌剤に対する IC50 を求め、耐性を算出し、KIF 遺伝子群の発現状態とタキサン系抗癌剤耐性度相関の有無を調べる。

(3) 遺伝子発現制御実験によるトランスフォ

ーマント細胞株の作製

(2)で選択した細胞に shRNA を導入し発を抑制させトランスフォーマント細胞株を作製する。

(4) in vitro における解析

トランスフォーマント細胞株を用い MTS assay を行い KIF 遺伝子がタキサン系抗癌剤耐性に係っている事を調べる。

(5) in vivo における解析

トランスフォーマント細胞株をヌードマウスに移植し、PTX を投与して KIF 遺伝子がタキサン系抗癌剤耐性に係っている事を調べる。

(6) メカニズムの検討

KIF 遺伝子が制御する紡錘体チェックポイントに関係した遺伝子群の発現状態が、KIF 遺伝子の発現制御と関連しているか検討する。

(7) 候補薬剤の同定および in vitro, in vivo における薬剤効果の評価

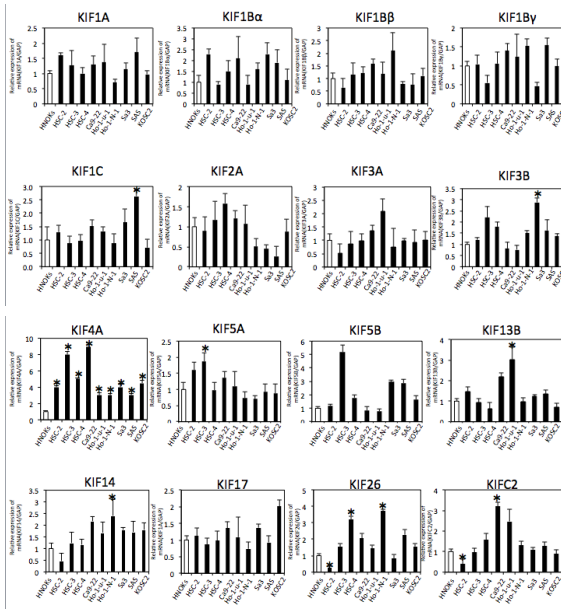
メカニズムに登場した遺伝子に対する発現阻害薬や増強薬を文献と遺伝子パスウェイソフト (IPA) により検索する。検索・同定した薬剤を用いて KIF 遺伝子が制御可能であるか確認する。

4. 研究成果

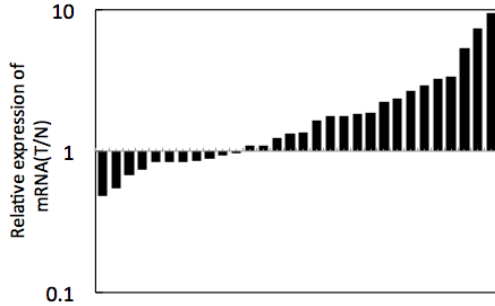
(1) kinesin family (KIF) 遺伝子群 (16 個のサブファミリーを有する一大遺伝子群) の発現解析

口腔癌由来細胞株 (HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22, Ho1-u-1, Ho1-N-1, Sa3, SAS, KOSC-2,) と正常口腔扁平上皮由来初代培養細胞 (HNOKs) の total RNA を採取し、リアルタイム PCR 法とウェスタンブロットング法を用いて KIF 遺伝子群の発現解析を行った。KIF4A は口腔癌由来細胞株全てにおいて、HNOKs と比較し有意な発現亢進を認めた。

KIF4A の臨床検体における発現の確認を行ったところ臨床検体 30 例中 19 例で発現の亢進を認めた。

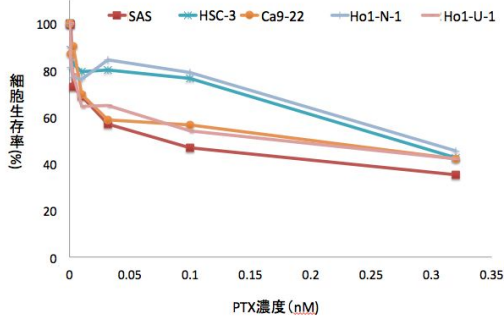


KIF4Aの臨床検体30例での発現確認



(2) 実験使用細胞株の選択

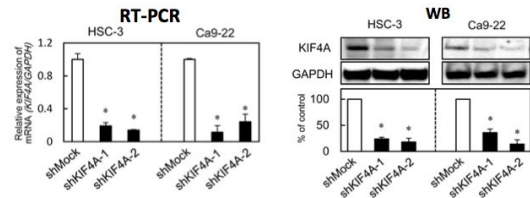
real time PCR 法の結果より KIF4A の発現が増加している癌由来細胞株 (HSC3、Ca9-22) と減弱している癌由来細胞株 (Ho1-u-1、Ho1-N-1、SAS) を選出した。選出した細胞株を用いて MTS assay を行い、タキサン系抗癌剤に対する IC50 を求め、耐性を算出した。KIF4A 発現更新株でタキサン系抗癌剤に対する耐性が増強していることが明らかになった。



Cell Line	IC50
HSC-3	0.253396
Ca9-22	0.247207
Ho-1-u-1	0.168441
Ho-1-N-1	0.268295
SAS	0.040371

(3) 遺伝子発現制御実験によるトランスフォーマント細胞株の作製

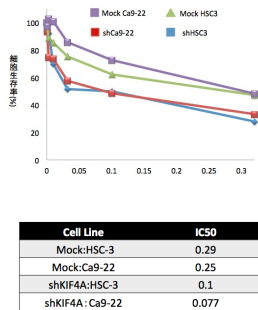
選出した癌由来細胞株に shRNA を導入し shKIF4A 細胞株 (HSC-3sh、Ca9-22sh) を作製、遺伝子発現抑制を確認した。



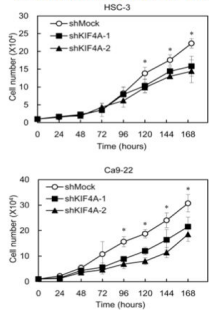
(4) in vitro における解析

shKIF4A 細胞株を用いて、タキサン系抗癌剤に対する IC50 を求め、耐性を算出した。親株と shKIF4A 細胞株における IC50 を比較したところ、shKIF4A 細胞株のタキサン系抗癌剤に対する感受性の低下を認めた。増殖能試験では shKIF4A は shMock と比較し増殖能が低下していることを確認した。

shKIF4A (HSC-3, Ca9-22) とMockにおけるPTX投与後のMTSの結果



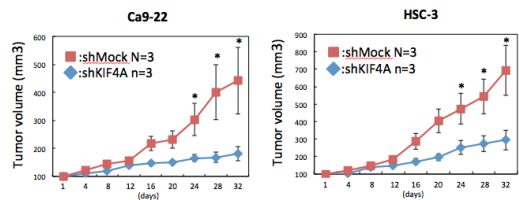
腫瘍増殖能試験: in vitro



(5) in vivo における解析

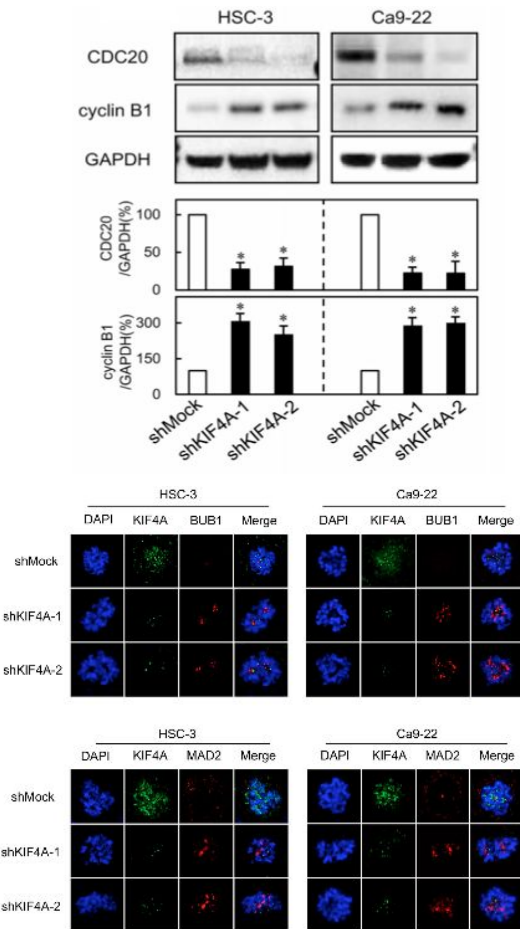
shKIF4A 細胞株をヌードマウスに移植し、増殖能を調べたところ、Mock と比較し shKIF4A 導入細胞株では腫瘍径が有意に減少し、増殖能の減弱が明らかとなった。さらに、in vivo においてタキサン系抗癌剤を作用させ機能解析を行ったところ、shKIF4A は shMock と比較し増殖能が低下していることを確認した。

腫瘍増殖能試験: in vivo

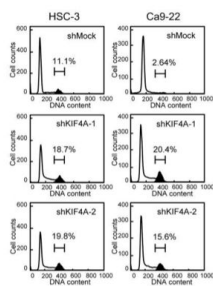


(6) メカニズムの検討

KIF 遺伝子が微小管を介して染色体の分離、紡錘体の配置、細胞質分裂に關与する遺伝子であるので、これらに關した遺伝子群 (BUB1、MAD2、CDC20、cyclinB1) の発現状態を確認したところ、Mock と比較して shKIF4A 導入細胞株ではこれらの発現増強と CDC20 の発現低下を認めた。



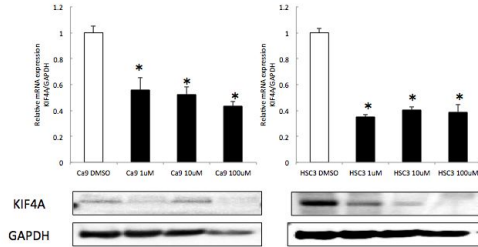
Flow cytometry



(7) 候補薬剤の検索・同定

文献と遺伝子パスウェイソフト (IPA) により複数の候補薬剤を検索した結果、阻害剤として Triamcinolone acetonide を同定した。さらに Triamcinolone acetonide を癌由来細胞株 (HSC3、Ca9-22) に作用させ、KIF4A が制御していることを確認した。

Inhibitor trials: mRNA&protein expression



[まとめ]

KIF 遺伝子群が微小管作動性遺伝子である点に着目し、タキサン系抗癌剤耐性との関係性について解析した。KIF4A を耐性遺伝子として同定し、in vitro および in vivo で耐性に關与していることを明らかにした。さらに、KIF4A 発現を制御する Triamcinolone acetonide を同定し、今後のタキサン系抗癌剤耐性克服薬の開発の糸口になると期待できるのではないかとされる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 zzzz (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織 (1) 研究代表者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：50236775

(2)研究分担者

笠松 厚志 (KASAMATSU ATSUSHI)

千葉大学・医学部付属病院・講師

研究者番号：60375730

肥後 盛洋 (HIGO MORIHIRO)

千葉大学・医学部付属病院・助教

研究者番号：60724383

(3)連携研究者

()

研究者番号：