

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08109

研究課題名(和文) 癌治療における薬物応答に影響を及ぼすバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Candidate biomarkers for predicting drug response in cancer treatment

研究代表者

小林 広幸 (KOBAYASHI, Hiroyuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60195807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト白血病株とそのイダルビシン耐性白血病細胞を用いて耐性細胞に特異的な薬剤耐性に関わる機構を解明することを目的として、薬剤耐性に関わる変異遺伝子の探索をミトコンドリアDNAとエクソーム核DNAの両面から検討した。エクソーム解析からは、細胞膜の脂質や蛋白に関連する遺伝子に変異が検出された。細胞内イダルビシンの蛍光強度をフローサイトメトリーで測定したところ、薬剤とincubation開始の数秒間における取込みが低下していることが確認された。以上のことより、耐性細胞では細胞膜の脂質や蛋白に遺伝子変異が起こり薬剤の細胞内への取込みが初期相で低下するために薬剤耐性が誘導される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Idarubicin (IDR), which inhibits DNA polymerase, is a key drug to treat leukemia. We investigated the mechanism of resistance using the human leukemia cell line MOLT-3 and its idarubicin-resistant MOLT-3/IDR by mitochondrial DNA and exome nuclear DNA analyses.

In resistant sublines, LIG1 DNA ligase 1 and helicase plurality genes showed amino acid-related changes. Amino acid mutations were also confirmed in polymerase-associated genes. GO enrichment testing was performed and lipid-related genes were selected based on the results. Flow cytometric method was used to determine whether IDR permeability was significantly different in MOLT-3/IDR and MOLT-3. The data showed that an IDR concentration of 0.5 μg resulted in slow permeability in MOLT-3/IDR. The slow IDR permeability seen in MOLT-3/IDR might be due to the effects of the amino acid changes found in polymerase- and lipid-associated genes.

Our findings suggest that multiple mutations in these genes play a role in IDR resistance.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：がん 薬剤反応性

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍薬耐性は、当初より抗腫瘍薬の効きにくい固形腫瘍や再発時に抗腫瘍薬への反応性が低下する造血器腫瘍における化学療法の成績向上を妨げる大きな障壁となっている。また、モルヒネなどのオピオイドの鎮痛効果の個人差は、癌患者の QOL に多大な影響を与えている。本研究者は、各種抗腫瘍薬に耐性の株化培養腫瘍細胞を樹立し、これらの細胞において耐性の分子メカニズムを解析し、耐性遺伝子の変異や発現異常を明らかにしてきた。また、耐性に寄与している遺伝子の発現を核酸製剤により抑制することで耐性克服が可能であることを示してきた。さらに、様々な悪性腫瘍で異常な活性化が観察されている種々のキナーゼ経路が一部の耐性細胞で過度に活性化していることを見出し、それらの経路を核酸製剤である siRNA や阻害薬によって抑制することにより耐性克服が可能であることを確認してきた。オピオイドの鎮痛効果についても、動物モデルにおいてオピオイドペプチド分解酵素の影響を中心に検討を重ねてきた。

これまでに耐性因子として確認・報告されたものは、耐性腫瘍細胞のみならず、発現量の差があるものの正常細胞にも発現しているものが多い。本研究者は葉酸拮抗薬に耐性化した細胞のみに発現している変異型ジヒドロ葉酸還元酵素を認識し正常型酵素には影響を与えないリボザイムを開発し報告した。このように耐性克服を図る上では、正常細胞に影響を与えずに耐性細胞のみに発現する因子や変異もしくは発現量の差が大きな因子を同定し標的とすることが望まれる。本研究では、これまでに樹立してきた 20 種類の耐性細胞で変異型ジヒドロ葉酸還元酵素のように耐性細胞に特異的な耐性因子を探索し、それらを標的とした耐性克服法を開発する基盤を築くことを目指す。

2. 研究の目的

自ら樹立した薬剤耐性細胞と元の感受性細胞(親株細胞)をマイクロアレイや全エクソームシーケンス等の手法で比較検討し、各々の薬剤耐性細胞のみに発現する因子や変異もしくは発現量の差が大きな因子を同定する。核酸製剤を用いて発現量の差が有意な因子を変動させたり、変異遺伝子を標的としてゲノム編集を試みたりして、各々の因子の薬剤耐性への寄与度を検討し、耐性克服の分子標的になりうるか探索し将来の臨床応用への基盤とする。

抗腫瘍薬耐性細胞に特異性の高い耐性因子を探索し、それらの耐性因子を分子標的とした耐性克服法を開発し臨床応用に展開するために、

(1) 自ら樹立してきた抗腫瘍薬またはモルヒネ耐性細胞と元の感受性細胞(親株細胞)を比較検討し、薬剤耐性細胞に特異性の高い耐性因子を探索する。

(2) 耐性細胞で発現亢進している因子を siRNA で抑制することにより耐性が克服可能かを検討する。

(3) 耐性細胞で発現低下している因子については、元の感受性細胞でその因子を siRNA で抑制することにより耐性が誘導できるかを検討する。

(4) 酵素活性が亢進し耐性化に寄与している因子については、阻害薬で酵素活性を抑制することにより耐性が克服可能かを検討する。

(5) 細胞周期やアポトーシスの調節などにも大きく関わっているミトコンドリア DNA 配列を耐性細胞と元の感受性細胞で比較検討し、抗腫瘍薬耐性への関与を検討する。ナトリウム利尿ペプチド、cGMP、cGMP 依存性蛋白キナーゼなどミトコンドリア機能に影響を与えるものにより耐性が変化するかを検討する。

(6) National Cancer Institute が Investigational New Drug として受理した分子標的薬で第 1 相試験施行中のものについて情報を入手し、耐性克服薬として利用することが可能かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養:

ヒト急性白血病細胞株 MOLT-3 をイダルビシンに耐性化した細胞株を作成した。MOLT-3 細胞を 40 nM のイダルビシンに 8 時間曝露し、生存した細胞をイダルビシンなしで再増殖させる操作を週に 1 回繰り返した。曝露毎にイダルビシン濃度を 20 nM ずつ漸増し、4 ヶ月後に MTT アッセイにて耐性度を検討したところ、イダルビシンに対して 10 倍耐性となっていた。その後、軟寒天でサブクロニングし、単一の細胞から増殖したコロニーを選択し、再度 MTT アッセイにてイダルビシンに対する耐性度を検討した。イダルビシンに 10 倍耐性となっているものを MOLT-3 / IDR と命名し、一部を凍結保存した。その後の実験には、凍結保存した細胞を解凍し、培養・増殖させたものを用いるようにした。イダルビシンなしで 1 ヶ月間以上培養すると耐性度が変化する可能性があるため、必要に応じて凍結細胞を解凍し、実験に用いるようにした。

(2) ミトコンドリア DNA (全配列) の決定:

細胞から全 DNA を抽出した。その後、PCR 法を用い、mtDNA を KOD FXneo (Toyobo) で増幅した。その際、25 プライマーを作成した。PCR 条件は、熱変性 94°C 2 分を行った後に、熱変性 98°C 10 秒、60°C でアニーリング 20 秒、伸長反応 68°C 1 分を 35 サイクル繰り返し、伸長反応を 68°C で 7 分行った。その後、得られた PCR 産物は 1% Agarose TBE 50V 60min 電気泳動を実施し DNA の確認を行った。この時、複数のバンドが確認された場合は切り出し精製を実施した。PCR 産物は

EXOSAP-IT で処理し PCR で用いたプライマーでシーケンス(ABI 3500xL)を行った。得られたシーケンスデータは ATCG ソフトを使いアッセンブルを行いミトコンドリア DNA 配列およそ 16,500bp を決定した。

(3) エクソーム解析 :

DNA サンプルは、 SureSelect XT Reagent Kit と SureSelect XT Human All Exon V5 (Agilent Technologies) を用いて濃縮した。SeqNovaCS Data Analysis System によりアセンブリした。ライブラリーを HiSeq1000 and HiSeq 2500 シークエンサー (Illumina)にて解析した。

変異解析には、GATK tool を利用した。リファレンスとして、hg38 を用いて各サンプルの変異を同定し、 SnpEff を用いてアノテーションを行った。また、同定された変異とイダルビシンの作用に関連する遺伝子については、KEGG pathway 解析を実施した。Gorilla を用いた GO enrichment test も行った。

(4) フローサイトメトリーを用いた薬剤の細胞内取込みの検討 :

ヒト急性白血病細胞株 MOLT-3 とイダルビシンに耐性化した細胞株を各種濃度 (0.1, 0.5, 1 mg/ml) のイダルビシンに短時間曝露し、4℃の PBS にて洗浄後、イダルビシンの蛍光をフローサイトメトリーにて解析した。Beckton Dickinson 社の BD Fortessa cytometry analyzer と TreeStar 社の FlowJo version 7.6.5 software を用いた。

(5) 新規の阻害剤による機能解析 :

研究協力者である米国 Vanderbilt 大学癌センター第 1 相試験チーム・Kenneth R. Hande 教授より、National Cancer Institute が Investigational New Drug として受理した分子標的薬で第 1 相試験施行中のものについて安全性等の情報を入手する。有望なものの中で試薬として入手可能な一部の阻害剤を用いて、イダルビシン耐性細胞においてイダルビシンに対する耐性が克服されるかどうかを MTT アッセイにて検討する。

4. 研究成果

(1) ミトコンドリア DNA 多型によるアミノ酸変異の解析 :

MOLT-3 親株では COX2 の 127 番目のアミノ酸はフェニルアラニン(Phe)からセリン(Ser)に置換、ND5 の 39 番目のアミノ酸はイソロイシン(Ile)からバリン(Val)に非同義置換していた。

MOLT-3/IDR 耐性株において、ND3 の 61 番目のアミノ酸はスレオニン(Thr)からイソロイシン(Ile)に置換、ND5 の 39 番目の変異は MOLT-3 と共通である。

ND3 配列のアミノ酸の BLAST 同源性検索結果では、現在までのデータベースに、ND3

配列の 61 番目のアミノ酸はすべてスレオニン(Thr)であった。我々が解析結果から発見したこのイソロイシン(Ile)への置換はオリジナルな変異であることが分かった。

(2) GATK と SnpEff による変異の検出 :

	MOLT-3	MOLT-3/IDR	MOLT-3/IDR only
Mutant base	286,781	318,539	194,683
Mutant genes	47,520	49,712	8,839
Genes containing amino acid changes	12,452	12,906	1,162
Endemic amino acids	33,712	36,489	5,124

(3) KEGG pathway 解析の結果 :

Gene	Mutant amino acid	Domain	Known or unknown
LIG1	p.Lys702Glu	x	x
	p.Ile3Leu	x	x
MCM3	p.Asp391Gly	MCM	x
	p.Ala620Pro	x	x
MCM7	p.Val273Ile	x	x
RFC1	p.Gly416Asp	BRCT	x
	p.Leu612Pro	x	x
RNASEH2B	p.Phe95Cys	x	x
	p.Ala287Ser	x	x

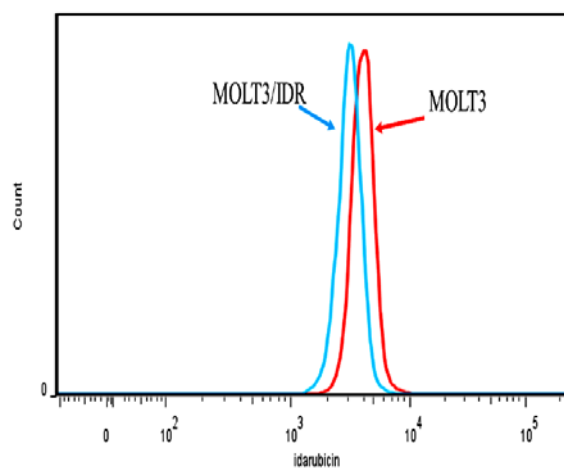
(4) GO enrichment test の結果 :

ID	Description	P-value	Number of genes
1	fatty acid beta-oxidation	1.63E-05	3
2	regulation of cellular carbohydrate metabolic process	4.08E-05	5
1	lipid oxidation	4.22E-05	3
1	fatty acid oxidation	4.22E-05	3
1	fatty acid catabolic process	4.22E-05	3
1	fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA dehydrogenase	5.28E-05	2
3	response to tumor necrosis factor negative regulation of plasma	6.70E-05	6
4	membrane long-chain fatty acid transport	5.28E-04	2

(5) フローサイトメトリーを用いた薬剤の細胞内取込みの検討結果 :

上記のように GO enrichment test の結果、細胞膜の脂質や蛋白に関連する遺伝子に変異が検出された。イダルビシンは脂溶性が高く急速に細胞内に取込まれる。薬剤排泄ポンプである P 糖蛋白や MRP 蛋白は耐性細胞に発現していないことが確認されているので、薬剤の細胞内への取込み初期相での低下が想定された。実際にイダルビシンの蛍光強度をフローサイトメトリーで測定したところ、薬剤と incubation 開始の数秒間における取込みが低下していることが再現性を持って確認された。

以上のことより、耐性細胞では細胞膜の脂質や蛋白に遺伝子変異が起こり薬剤の細胞内への取込み初期相での低下を来すために薬剤耐性が誘起されることが示唆された。



Idarubicin (0.5ug)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Komiyama T, Ogura A, Hirokawa T, Zhijing M, Kamiguchi H, Asai S, Miyachi H, Kobayashi H. Analysis to Estimate Genetic Variations in the Idarubicin-Resistant Derivative MOLT-3. *International Journal of Molecular Sciences* 査読あり, 18(1), 12-24 (2017). DOI:10.3390/ijms18010012.

(2) Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Watanabe M, Ajimi J, Takahashi S, Miura M, Ito K, Kobayashi H, Suzuki T. Effect of Peptidase Inhibitors on Dynorphin A (1-17) or (1-13)-Induced Antinociception and Toxicity at Spinal Level. *Pharmacology & Pharmacy* 査読あり, 8(2), 33-51 (2017). DOI: 10.4236/pp.2017.82003.

(3) Matsuda M, Yoshikawa M, Kan T, Jin XL, Takahashi S, Kobayashi H, Nishiyama T. Inhibition of AMPA Receptors and Activation of the Glycine Site or Polyamine Site of NMDA Receptors at the Supraspinal Level Induces Antinociception. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 査読あり, 4(3), 77-83 (2017).

http://www.ejbps.com/ejbps/abstract_id/2223

[その他]

ホームページ等

<https://www.cp-tokai.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 広幸 (KOBAYASHI, Hiroyuki)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 60195807

(2) 研究分担者

小見山 智義 (KOMIYAMA, Tomoyoshi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：60439685

(4) 研究協力者

Yu Shyr

Vanderbilt 大学・癌センター・教授

Kenneth R. Hande

Vanderbilt 大学・癌センター・教授