

令和元年6月12日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07149

研究課題名(和文) 新しい網羅的遺伝子解析による食道癌の薬剤、放射線耐性遺伝子の検索とそのメカニズム

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 (Kawakubo, Hirofumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20286496

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)：ヒトゲノム上に存在する全ての遺伝子をスクリーニング可能であるトランスポゾンを用いて、食道癌に対するシスプラチン、5-FU、放射線耐性遺伝子の新しい網羅的解析に関する研究において、37種類のシスプラチン耐性遺伝子を発見した。そのうちTRIM16L overexpression細胞株に関してシスプラチン耐性をMTT assayにて検証し、シスプラチンへの耐性を証明した。TRIM16 knockdown細胞株に関してシスプラチンへの耐性が減少することを確認した。TRIM16L overexpression細胞株のマウスxenograftでのシスプラチンに対する耐性をin vivoにて確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、食道癌に対する根治的治療法は手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われている。しかし、化学療法、放射線療法の奏効率は決して高くなく、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。また、治療の経過中に薬剤耐性が生じることで治療不応性となることが問題である。以上より化学療法および放射線耐性のメカニズムの解明が治療戦略に非常に重要と考えられる。トランスポゾンを用いたシスプラチン、5-FU、放射線耐性遺伝子の新しい網羅的解析により、進行食道癌の新たな治療戦略の開発と治療成績の向上が可能である。

研究成果の概要(英文)：Multimodal therapies including surgery, chemotherapy, and radiotherapy are necessary for advanced esophageal cancer. However, patients with resistance to chemo or radiotherapy cannot derive benefit from the therapy but suffer side effects. Therefore, detecting resistant genes and mechanisms is essential for tailoring treatment to improve the prognosis. We used a novel method involving transposons to screen and identify drug-resistant genes and radio-resistant genes. The new gene screening technique was useful for detecting candidate of drug-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. TRIM16 is one of the candidate of CDDP resistant gene. We confirmed TRIM 16 overexpression cell has CDDP resistant using MTT assay and resistance is decreased by knocking down TRIM 16. We also confirmed TRIM 16 overexpression cell has CDDP resistant in vivo xenograft model.

研究分野：食道癌

キーワード：薬剤耐性 放射線耐性 トランスポゾン 食道癌 網羅的解析 5-FU シスプラチン 放射線

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

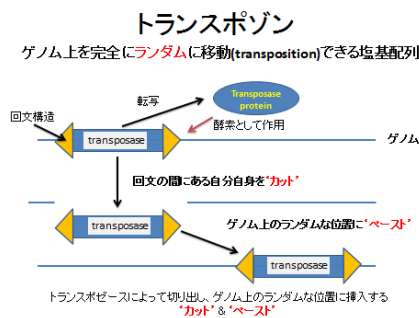
食道癌は早期にリンパ節転移をきたしやすく、切除可能であっても予後不良な疾患である(Fig1.)。手術成績は向上しているが、手術単独治療では根治が限界であるため、現在、食道癌に対する根治的治療法は手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療が行われている。手術療法を選択した場合もシスプラチン、5-FU、ドセタキセル等による術前化学療法が推奨されている(JCOG9907)。欧米では術前化学放射線療法が標準である。(CROSS study)。しかし、化学療法、放射線療法の奏効率は決して高くなく、奏効しない症例にとっては有害事象のみの無駄な治療となる。切除可能食道癌に対する術前治療は、非奏効例では術前治療中に病状が進行し、切除不能になってしまうこともある。施行前に非奏効症例が予測可能であれば、それらの症例は速やかに手術をすることで根治が可能となる。化学療法、放射線療法施行前にそれらの感受性を予測できれば、無駄な治療が回避できるとともに、他の薬剤による化学療法や、他の治療法に速やかに変更することが可能になる。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。薬剤および放射線耐性のメカニズムの解明が治療戦略に非常に重要と考えられる。また、それらのメカニズムが解明したら、将来的に耐性遺伝子の遺伝子治療によって、化学療法、放射線療法の感受性を高めることによって、奏効率、生存率を向上することができる可能性がある。

<食道癌手術後成績>

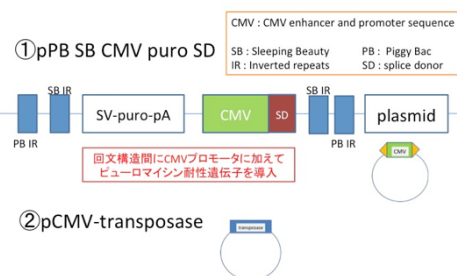
病理学的進行度 (TNM)	1998-2002		2001-2005	
	症例数	術後5生存率(%)	症例数	術後5生存率(%)
0	5	100%		
I	58	72.4	69	91.9
IIA	62	66.1	52	78.8
IIB	69	59.4	87	54.6
III	148	33.8	123	45.9
IVA	31	29.0	23	31.6
IVB	79	13.9	65	33.8

Fig.1 2000年（国立がんセンター中央病院）

われわれはトランスポゾンを用いた網羅的遺伝子解析によって、37種類のシスプラチン耐性遺伝子を同定し報告した。トランスポゾン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見出したが、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が、前述の回文構造の間に転写活性配列(CMVプロモーター)を組み込むことで、ランダムに転移した先の遺伝子発現を誘導可能となる(Fig.3)。また遺伝子上に転移した場合はその遺伝子発現を抑制する。



Transposon systemにおけるプラスミド



2. 研究の目的

われわれは、トランスポゾンを用いたシスプラチン、5-FU、放射線耐性遺伝子の新しい網羅的解析により、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。

3. 研究の方法

トランスポゾン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。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が、前述の回文構造の間に転写活性配列(CMVプロモーター)を組み込むことで、ランダムに転移した先の遺伝子発現を誘導可能となる。また遺伝子上に転移した場合はその遺伝子発現を抑制する。食道癌細胞に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もしくは抑制させた無数の細胞を作成することができる。その細胞集団に対し、任意の薬剤環境下や放射線照射下で培養し、生き残った細胞のDNA解析を行うことで、耐性遺伝子を特定することができる。

#### 4. 研究成果

食道癌細胞において **Transposon tagged cell** を樹立した。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** を樹立した。トランスポゾンを用いた網羅的遺伝子解析の手法によって 37 の候補遺伝子が同定され、その中には **MRP1 (Multidrug resistance protein1)**を含んでおり、既知の耐性遺伝子を含んでいることより、この実験手法が十分に機能していることが確認できた。候補遺伝子のうち **TRIM16** に関して実際に **Real time PCR** にて遺伝子の **overexpression** を認めた。**JAK2** 遺伝子に関しては **Real time PCR** にて遺伝子の **down expression** を認めた。**TRIM16 overexpression** 細胞株と野生型細胞株にシスプラチンを暴露し、シスプラチン耐性を **MTT assay** にて検証し、シスプラチンへの耐性を証明した。食道癌細胞株 **TE4,5,9,15** の他に、**KYSE** 細胞株において **Transposon tagged cell** の樹立に成功した。**KYSE** 細胞株での野生型細胞株がシスプラチンで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した。**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した。**KYSE** 細胞株についてシスプラチン耐性株を獲得した。4 シリーズで同定された 37 種類のシスプラチン耐性遺伝子 37 のうち薬剤耐性と関係のありそうな **TRIM16L** に関して **Real time PCR** にて遺伝子の **overexpression** を認めた。**TRIM16 overexpression** 細胞株と野生型細胞株にシスプラチンを暴露し、シスプラチン耐性を **MTT assay** にて検証し、シスプラチンへの耐性を証明した。**TRIM16** を有する食道癌野生型細胞株から **siRNA** にて **TRIM16** を **knockdown** し、シスプラチンへの耐性が減少することを確認した。マウス **xenograft** での薬剤耐性の判定した。食道癌野生株と、耐性遺伝子を導入した治療耐性株のマウス **xenograft** モデルを作成し、シスプラチンに対する耐性を **in vivo** にて確認した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Tsutsui M, Kawakubo H, Hayashida T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Takeuchi H, Kitagawa Y: Downregulation of cytochrome *c* oxidase 1 induced radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology let* 2017 14(4):4220-4224. 査読あり
2. Takesue T, Kawakubo H, Hayashida T, Tsutsui M, Miyao K, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Takeuchi H, Kitagawa Y: Downregulation of cytochrome *c* oxidase 1 induced radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;14(4): 4220-4224. 査読あり

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. Kawakubo H, Fukuda K, Kigasawa Y, Takesue T, Tsutsui M, Takahashi T, Nakamura R, Wada N, Takeuchi H, Kitagawa Y. The novel and comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug and radiation in esophageal squamous cell carcinoma. *AACR Annual Meeting* 2016
2. 林雅人, 川久保博文, 福田和正, 中村理恵子, 須田康一, 和田則仁, 竹内裕也, 北川 雄光. Transposon を用いた食道癌細胞における抗癌剤耐性遺伝子の網羅的解析. 第 27 回日本消化器癌発生学会総会 2016

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。