

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590214

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬耐性因子を分子標的とする治療開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Targeted therapy for anti-cancer drug resistance: Basic research

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトT細胞白血病株とそのイダルビシン耐性白血病細胞を用いた耐性腫瘍細胞特異的な抗腫瘍薬耐性に関わる分子機構を解明することを目的として、イダルビシン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と核DNAの両面から検討した。

ミトコンドリアDNA比較配列解析とアレイCGH解析を用いることで、イダルビシン耐性白血病細胞にみられる遺伝子変異の抽出を試みた結果、イダルビシン薬剤耐性にはND3やGALNT2遺伝子などの複数の遺伝子変異が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of resistance using the human acute leukemia cell line MOLT3 and its idarubicin-resistant MOLT3/IDR by mtDNA and nuclear DNA analyses. We found altered candidate regions among the two cell lines. The ND3 mutation site (p.Thr61Ile) of mtDNA sequence was a unique mutation in the MOLT3/IDR. Moreover, we found five candidate genes by using array CGH analysis. Then, we focused on the GALNT2 gene among the five candidate genes. We sequenced the exon of GALNT2 gene and found a G1788K mutation of the stop codon position in MOLT3/IDR not in MOLT3. Because of this, the mutation led to 18 amino acids being added to the sequence in the GALNT2 gene. In addition, we confirmed the gene expression of this mutation region by RT-PCR. Furthermore, we predicted the protein structure of the mutated GALNT2 gene, and confirmed the conformational change of the ligand pocket. From our results, we speculated that these mutation genes might be related to idarubicin 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。本研究者は、各種抗腫瘍薬に耐性の株化培養造血器腫瘍細胞を樹立し、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。

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

本研究は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の基盤となる研究を行う。

(1) 自ら樹立してきた抗腫瘍薬耐性細胞と元の感受性細胞(親株細胞)を比較検討し抗腫瘍薬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核酸製剤等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核酸製剤等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 をイダルピシンに耐性化した細胞株を作成した。MOLT-3 細胞を 40 nM のイダルピシンに 8 時間曝露し、生存した細胞をイダルピシンなしで再増殖させる操作を週に 1 回繰り返した。曝露毎にイダルピシン濃度を 20 nM ずつ漸増し、4 カ月後に MTT アッセイ(Kobayashi H, International Journal of Cancer 81:944, 1999)にて耐性を検討したところ、イダルピシンに対して 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ピシンに対する耐性を検討した。イダルピシンに 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。イダルピシンなしで 1 ヶ月間以上培養すると耐性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 2 分を行った後に、熱変性 98 10 秒、60 でアニーリング 20 秒、伸長反応 68 1 分を 35 サイクル繰り返し、伸長反応を 68 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) GALNT2 遺伝子 DNA 配列の決定:

細胞から全 DNA を抽出した。その後、PCR

法を用い、2×KOD FX Neo Buffer 5 µl、2mM each dNTPmix 1 µl、2.5 µM each GALNT2 primermix 1 µl、Millie 1.9 µl、KOD FX Neo 0.1 µl、MOLT-3 と MOLT-3/IDR 100mg/ul のテンプレート 1 µl で反応した。PCR 条件は、熱変性 94 2 分を行った後に、熱変性 98 10 秒、58、62、66 ずつでアニーリング 20 秒、伸長反応 68 20 秒を 35 サイクル繰り返し、伸長反応を 68 で 7 分を行った。その後、得られた PCR 産物は、1.5% アガロース 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、GALNT2 遺伝子の DNA 配列を決定した。

#### (4) 逆転写 PCR :

RNA 抽出は、MOLT-3 および MOLT-3/IDR より、Trizol Reagent(Ambion)を用いて全 RNA を常法どおり抽出した。cDNA 合成は、得られた RNA 5 µg を SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用い Oligo(dT) で cDNA を合成した; Total RNA 5 µg、20mM TrisCl pH8.4、50mM KCl、Oligo(dT) 2.5 µM、dNTP 500 µM each、MgCl<sub>2</sub> 5mM、DTT 10mM、RNase OUT 2U、SuperScript Reverse Transcriptase 20U で 50 50 分、85 5 分、RNase H 2U を加え 37 20 分で行った。PCR 反応は ExTaq を用いて行った。温度条件は、熱変性 95 3 分を行った後に、熱変性 95 10 秒、68、69、70、71 のいずれかでアニーリング 10 秒、伸長反応 72 20 秒を 35 サイクル繰り返し、最後に伸長反応 72 7 分を行った。RT-PCR 後に 2%アガロース TBE 50V 60min 電気泳動を行った。

#### (5) リアルタイム PCR :

2×TAKARA SYBR Premix Ex Taq 5 µL、primer 各 500nM、希釈したテンプレート 4.5 µL で 10 µL とし、反応チューブを軽く遠心後、StepOnePlus リアルタイム PCR システムにセットし、反応を開始させた。

リアルタイム PCR 反応は、熱変性 95 20 秒を行った後に、熱変性 95 5 秒、アニーリングと伸長反応 69 30 秒を 45 サイクル繰り返し、95 で 10 秒、60 で 1 分の後、95 まで徐々に温度を上げて融解曲線を得た。最後にアガロース電気泳動用のアニーリング 80、70、60 で各 3 分追加して行った。リアルタイム PCR 後に 2% アガロース TBE 50V 60min 電気泳動を行った。

(6) ミトコンドリア DNA 配列と GLANT2 遺伝子配列のアライメント方法 :

決定されたシーケンス配列は、ClustalW を用いアライメントを行った。この際、リファレンスとして健常人のポーランド人 (EU547188.2) の mtDNA を用い、変異サイトの確認を行った。このポーランド人の配列を用いた理由は、相同性検索を行った際に、ヒト T 細胞白血病株 (MOLT-3) と 4 塩基しか違いが見られなかったのでリファレンスとして用いた。さらに、確認された変異サイトをデータベース (NCBI-dbSNP、mitoMap、Ensemble、JSNP) 内を相同性検索および登録されている変異サイトを検索することで他の配列と比較し、変異サイトの確認を実施した。GLANT2 のアライメントは、ClustalW を用い、DNA、RNA とともに NM\_004481.3 :GI:206725412 をリファレンス配列とし使用した。

(7) CGH アレイを用いた耐性因子に関する候補遺伝子の探索 :

イダルピシン耐性に関わるエクソン上の変異 (SNV (SNP), STR/InDel) の検出を目的とし、ヒト T 細胞白血病株 (MOLT-3) ならびにイダルピシンに耐性化したイダルピシン耐性白血病細胞 (MOLT-3/IDR) を用いた CGH アレイ (2×400K) による耐性因子候補の探索を行った。まず、それぞれの細胞からゲノム DNA を抽出し、それぞれ Cy3、Cy5 蛍光色素で標識後、ヒトゲノム aCGH アレイにハイブリダイズさせ、マイクロアレイスキャナによりプローブごとのシグナル強度を検出した。シグナル強度比に関して、MOLT-3 と MOLT-3/IDR で比較し 2 倍、4 倍差のあったものをそれぞれ P 値 < 0.05 で検定を行い、変異領域候補として抽出した。これらの研究を実施することで、CGH アレイ解析で得られた 5 つの候補遺伝子群とミトコンドリア DNA 配列解析で得られた多数の多型情報をもとにした網羅的な解析を行うことができる。

(8) 伸長配列を持つ変異型 GLANT2 遺伝子のタンパク質立体構造予測 :

Navarrete E.L. (2014) らの PDB ID:4D0Z を鋳型構造に変異型 GLANT2 の立体構造予測を行った。4D0Z では、GLANT2 全配列のうち、75 番目の Lys から 569 番目の Leu までの構造が決定されている。よって本研究では、初期構造として変異型 GLANT2 の 75 番目から伸長配列までの領域を構造予測領域とし、75 番目から 569 番目の配列部分については、X 線構造 4D0Z を鋳型構造に用いたホモロジーモデリング、570 番目から伸長配列までを鋳型に依存しない自由モデリングにより構造予測した。ホモロジーモデリングならびに自由モデリングは、Schrödinger 社の Prime を利用した。またモデリングでは、4D0Z で結合していたリガンド HWU (PDB リガンドコード名) も含めた構造を予測した。予測された構造の Viewer には、Jmol を使用

した。

(9) 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、イダルピシン耐性細胞においてイダルピ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 (全配列) における遺伝子多型の抽出と解析：

ヒト T 細胞白血病株 (MOLT-3) ならびにイダルピシンに耐性化したイダルピシン耐性白血病細胞 (MOLT-3/IDR) のそれぞれの mtDNA 全配列を決定し、変異サイトの抽出を行った。

MOLT-3 親株とリファレンス (EU547188.2) と比較配列解析を行った。COX2 のエクソンで 7966 番目の塩基が T (チミン) から C (シトシン) に置換、tRNA のイントロンで 12172 番目の塩基が A (アデニン) から G (グアニン) に置換、ND5 のエクソンで 12452 番目の塩基が A (アデニン) から G (グアニン) に置換していた、また、D-Loop の 16193 番目に 1 個 C (シトシン) 塩基の挿入が見られた。

次に、MOLT-3/IDR 耐性株とリファレンスの比較配列解析を行った。ND3 のエクソンで 10242 番目の塩基が C (シトシン) から Y に置換、tRNA の 12172 番目の置換と ND5 の 12452 番目の置換と D-Loop の 16193 番目の置換は共通である。D-Loop の 16194 番目にもう一個 C (シトシン) 塩基の挿入が見られた。

MOLT-3 親株と MOLT-3/IDR 耐性株の比較配列解析結果は、COX2 のエクソンで 7966 番目の塩基が T (チミン) から C (シトシン) に置換、ND3 のエクソンで 10242 番目の塩基が C (シトシン) から Y (C あるいは T) に置換、D-Loop の 16194 番目に一個 C (シトシン) 塩基の挿入が見られた。

(2) ミトコンドリア DNA 多型によるアミノ酸変異の解析：

変異サイト中で、エクソン領域の置換に注目した。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。

(3) CGH アレイ解析を用いた耐性因子に関わる候補遺伝子の探索結果：

MOLT-3 親株細胞をリファレンスとして MOLT-3/IDR 耐性株細胞における変異を検出するために、CGH アレイ (8X60K) を用いて解析を行った。その結果、MOLT-3/IDR で特異的に変異している領域をシグナル強度 2 倍 (P 値 < 0.05) で抽出したところ、MOLT-3/IDR 耐性株細胞で 674 領域が抽出された。さらにシグナル強度 4 倍 (P 値 < 0.05) ではコピー数が増加した 9 領域まで絞ることができた。MOLT-3 親株細胞では、シグナル強度 2 倍 (P 値 < 0.05) で抽出したところ、724 領域が抽出され、シグナル強度 4 倍 (P 値 < 0.05) にしたところ、欠失を起こした 1 領域のみ抽出することができた。そして、この 10 個の変異領域と遺伝子との関係を明らかにするために NCBI と Ensemble データベースを用いることでアノテーションを行い、遺伝子との関係が明らかとなった 5 つの耐性候補遺伝子 (GALNT2、DCHS2、ENTPD8、PNPLA7、FBXW7) を絞ることができた。

(4) GALNT2 遺伝子多型およびアミノ酸変異の解析結果：

CGH アレイで抽出された 5 つの耐性候補遺伝子の中で、本研究では GALNT2 遺伝子に注目し配列解析を行った。この GALNT2 遺伝子のエクソンのみの配列決定し、変異サイトの確認を行った。幾つかのエクソン変異を確認した。858 番目の塩基が G (グアニン) から A (アデニン) に置換、1014 番目の塩基が C (シトシン) から Y (C あるいは T) に置換、1197 番目の塩基が A (アデニン) から R (A あるいは G) に置換していた。MOLT-3/IDR 耐性株だけ 1716 番目の終止コドンが G (グアニン) から K (G あるいは T) のヘテロ塩基に置換していた。それらの塩基置換によるアミノ酸置換について、286 番目、338 番目と 399 番目のアミノ酸置換はすべて同義置換であり、572 番目の終止コドンはチロシン (Tyr) に置換した。このことからアミノ酸の読み枠は次の終止コドンまでの 18 残基が多く読まれていると推測した。

(5) リアルタイム PCR と逆転写 PCR を用いた発現定量解析結果：

MOLT-3/IDR 耐性株において、終止コドンが K (Keto) に置換していることから、遺伝子発現にどのように影響しているかを確認するためにリアルタイム PCR と RT-PCR を用いることで発現定量解析を行った。

その結果、MOLT-3 細胞の MOLT-3 親株細胞 GALNT2 (wild) の発現量を 1.00 (PCR

効率：99.8%）とすると、IDR 耐性細胞株では 0.96（PCR 効率：99.7%）であった。そして、MOLT-3 細胞の GALNT2（mutant）タイプでは発現は確認されなかった、それに対して、IDR 耐性細胞株では発現量比は 0.35（PCR 効率：100%）であった。

また、逆転写 PCR においても発現が確認された。

（6）変異型 GALNT2 遺伝子のタンパク質立体構造予測結果：

リアルタイム PCR と RT-PCR で IDR 耐性細胞株の GALNT2 遺伝子に発現が確認されたことで、変異型 GALNT2 遺伝子のタンパク質立体構造予測を Schrödinger 社の Prime のモデリングソフトを使うことで行った。GALNT2 遺伝子の立体構造は、Navarrete E.L.（2014）らによって解かれているので、この構造をリファレンスとして用いることにした。

この結果、アミノ酸配列の C 末が 18 残基多く読まれることで、分子量の増加に伴い結合部位における構造変化に影響を及ぼすことが示唆された(下図)。

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://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

繆 之環（BOKU, Shikei）  
東海大学大学院医学研究科・大学院生

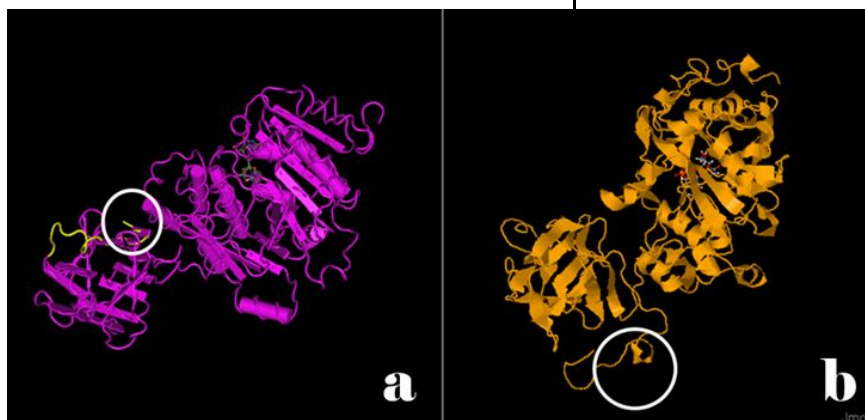


図. GALNT2 遺伝子と変異 Type のタンパク質立体構造

a.GALNT2wild タンパク質立体構造

b.GALNT2mutant タンパク質立体構造

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Tateno Y, Komiyama T, Katoh T, Munkhbat B, Oka A, Haida Y, Kobayashi H, Tamiya G, Inoko H. Divergence of East Asians and Europeans estimated using male- and female-specific genetic markers. *Genome Biol Evol.* 6:466-73, 2014, doi: 10.1093/gbe/evu027, 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 繆 之環、Idarubicin 耐性化 Molt3 細胞を用いた薬剤耐性に関する候補遺伝子の探索、第 37 回日本分子生物学会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）