

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591895

研究課題名(和文) 消化器癌に発現する抗癌剤耐性ABCトランスポーターのスプライシングの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of splicing variants of multidrug-resistant ABC transporters expressed in gastrointestinal cancer

研究代表者

大沼 忍 (Ohnuma, Shinobu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70451565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA-seqによる解析結果から、Ensemblに登録されている48種類のABCトランスポーター全502種類のスプライスバリエーションについて、正常組織と癌組織・大腸癌細胞株の発現量を比較したところ、大腸癌特異的なバリエーションの候補として71種類が抽出された。

これらの中で、ABCA12のスプライスバリエーションであるENST00000513511はRNA-seqの結果をRT-qPCRで再現することができた。このことからENST00000513511は大腸癌特異的なスプライスバリエーションの可能性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bioinformatics analysis showed that seventy-one out of total 502 splicing variants of ABC transporters, which are registered in Ensembl, were detected as candidates of potential colon-cancer-specific-splice-variants.

Experimental validations were performed for some of these candidates by RT-qPCR. ENST000005135112, one of ABCA12 splice variants, had reproducibility. This result strongly suggests that ENST000005135112 is a colon-cancer-specific-splice-variant.

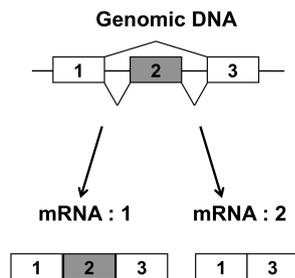
研究分野：大腸癌の集学的治療・分子生物学

キーワード：ABCトランスポーター 大腸癌 多剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 同一のゲノム DNA 配列から多様な成熟 mRNA が生成される過程を選択的スプライシングといい、その結果生じた mRNA をスプライスバリエーションという(図1)。全ゲノム上の遺伝子の 90%以上にスプライスバリエーションが存在し、癌との関連性が報告されている。申請者らは、癌におけるスプライスバリエーションの研究は、ポストゲノム以降の新規治療戦略の開発に極めて重要と考えその研究に取り組んできた。その結果、申請者は胃癌特異的なバリエーションを同定し(Ohnuma S. et al. Surgery. 2009)、その1つ CDCA1 遺伝子のバリエーションを siRNA で選択的にノックダウンすることで癌細胞の増殖能を抑制、アポトーシスを誘導できることを実証してきた(Kaneko N. Ohnuma S. et al. BBRC. 2009)。

図1: 選択的スプライシング



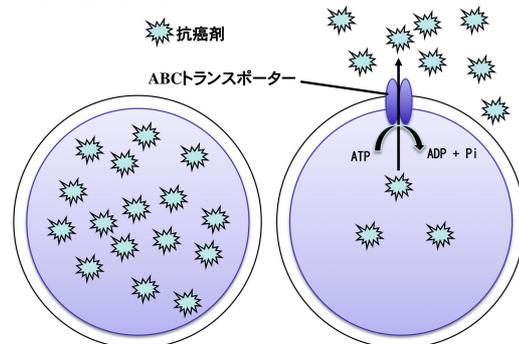
一つのDNAから複数のmRNA (スプライスバリエーション) が生じる。
(□: エクソン、—: イントロン)
Ohnuma S. et al. Surgery 2009より
改変

(2) 一方、申請者は 2007 年 9 月より 2010 年 10 月までの 3 年間、米国癌研究所 (NCI) Dr. Suresh V Ambudkar のもとで抗癌剤耐性に関わる ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターのひとつである P-glycoprotein (Pgp) の抑制剤の開発研究に従事し、ATP アナログ、phosphodiesterase-5 inhibitor、天然有機化合物などが Pgp の抑制剤になることを報告してきた(Ohnuma S. et al. Biochemistry. 2011, Ding PR, Ohnuma S. et

al. PLoS One. 2011, Pitchakarn P, Ohnuma S. et al. J Nutr Biochem. in press、大沼忍他、第 49 回日本癌治療学会. 優秀演題賞受賞. 2011. 10)。

Pgp は癌細胞膜に過剰発現し、ATP のエネルギーを用い抗癌剤を癌細胞内から外へ排出することで抗癌剤耐性を獲得している(図2)。胃癌・大腸癌といった消化器癌においても Pgp の他、ABCC1 (MRP1)、ABCG2 (BCRP) などの抗癌剤排出 ABC トランスポーターが過剰発現しており、これらトランスポーターに対する抑制剤の開発により、癌の抗癌剤耐性の克服が可能になると考えられている(Shukla S. Ohnuma S. et al. Curr Drug Targets. 2011, Wu CP, Ohnuma S. et al. Curr Pharm Biotechnol. 2011)。しかし、実地臨床で使用できる抑制剤はこれまで存在しない。

図2: ABCトランスポーターによる薬剤耐性のメカニズム



ABCトランスポーターを発現していない癌細胞: 抗癌剤は細胞内にとどまる (抗癌剤感受性)

ABCトランスポーターを発現する癌細胞: 抗癌剤を細胞外に排泄する (抗癌剤耐性)

(3) 表1に示す通り、抗癌剤耐性関連 ABC トランスポーターに多数のスプライスバリエーションが存在するが、報告されているバリエーション数は、データベースや文献により異なっており、それらの消化器癌組織における発現状況、機能も十分に解明されていないのが現状である。効果的な抑制剤を開発するにはスプライスバリエーションの機能を

解析した上で、スプライスバリエーションも考慮した薬剤開発がなされるべきと考え、本研究課題の着想に至った次第である。

表1. 各データベースから予測されるスプライスバリエーションの数

	エクソン数	ABCトランスポーター							
		ABC1	ABC1	ABC2	ABC4	ABC5	ABC6	ABC11	ABC2
予測されるスプライスバリエーションの数	RefSeq*	0	5	0	2	2	2	3	0
	ASD**	0	4	0	9	7	0	5	0
	Pubmed文献	2	20	2	4	3	2	2	3

* NCBI Reference Sequences

** EMBL-EBI Alternative Splicing Database

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、消化器癌に発現する抗癌剤耐性関連 ABC トランスポーターのスプライスバリエーションを同定、機能解析することでスプライスバリエーションによる抗癌剤耐性メカニズムを明らかとし、それらを基盤とした新規治療戦略を構築することにある。

(2) また、抗癌剤耐性関連 ABC トランスポーター以外についても、ヒトに発現している全 48 種類の ABC トランスポーターを対象として、消化器癌特異的に発現しているスプライスバリエーションを同定し、臨床病理学的因子との関連性を解析することで、新規バイオマーカーとして役立てることを目的としている。

具体的研究項目は、手術検体（胃癌・大腸癌）でスプライスバリエーションの発現を癌部 / 正常部間で比較し、癌特異的なスプライスバリエーションを同定する、スプライスバリエーションを生じさせる原因となる遺伝子多型、変異を同定しスプライシング調節メカニズムを明らかとする、スプライスバリエーションのトランスポーターとしての機能を明らかにする、スプライスバリエーションと臨床病理学的因子の解析を行い、新規バイオマーカーに活用することである。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌患者 3 例の手術検体から、大腸正常組織と癌組織をそれぞれ採取し、併せて

大腸癌細胞株 5 種類 (COLO205, HCT15, HCT116, HT29, SW620) を培養した。これらから RNA を抽出し、次世代シーケンサー (HiSeq2500) による網羅的なトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行い、Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) に登録されている 48 種類の ABC トランスポーター全 501 種類のスプライスバリエーションについて、正常組織と癌組織・大腸癌細胞株の発現量を比較し、大腸癌特異的なスプライスバリエーションを抽出した。さらに、抽出された候補について、RT-qPCR を用いて validation 実験を行い、その発現を確認した。

(2) RNA-seq によるトランスクリプトーム解析における発現定量化ソフトウェアの精度を評価するため、4 種類の定量化ソフトウェア (cufflinks, DEGseq, DESeq, TIGAR) を用いて再解析を施行した。また、参照データベースとして Ensembl に加えて Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) を対象として、それぞれのデータベースにおいて大腸癌特異的なスプライスバリエーションの抽出を行った。

4. 研究成果

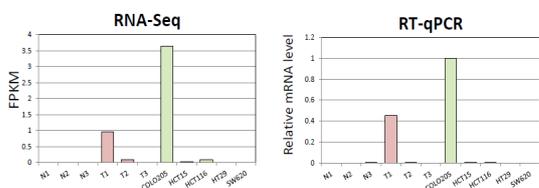
(1) RNA-seq による解析結果から、Ensembl に登録されている 48 種類の ABC トランスポーター全 502 種類のスプライスバリエーションについて、正常組織と癌組織・大腸癌細胞株の発現量を比較したところ、大腸癌特異的な splice variant の候補として 71 種類が抽出された。これらの中で、その配列特異性から RT-qPCR による validation を行うことができたのは 8 種類であった (Ensembl ID : ENST00000586811 、 ENST00000272895 、 ENST00000542328 、 ENST00000572053 、 ENST00000513511 、 ENST00000443497 、 ENST00000443684 、 ENST00000441774)。

また、これらの中で抗癌剤耐性関連 ABC トラ

ンスポーターのスプライスバリエントは、ABCC1 のバリエントである ENST00000572053 と、ABCC2 のバリエントである ENST00000513511 である。

(2) これら 8 種類のうち 7 種類については RNA-seq の結果を RT-qPCR で再現することができなかったが、ABCA12 のスプライスバリエントの1つである ENST00000272895 については RT-qPCR によってその発現を再現することができた(図 3)。

図3: RNA-seqとRT-qPCRでの各サンプルにおけるENST00000272895の発現量



(3) RT-qPCR で再現性を示すことができなかったスプライスバリエントはいずれも発現量が小さいために RNA-seq のデータ解析の段階で誤差が生じ、定量性に欠けるのではないかと考えられた。そこで、当初用いたソフトウェア(cufflinks)に加え 3 種類のソフトウェア(DEGseq, DESeq, TIGAR)を用いて再解析を施行した。その結果、48 種類の ABC トランスポーターの遺伝子レベルの発現量は各ソフトで高い相関を認めたと(図 4)、一方で 502 種類のスプライスバリエントの発現量は各ソフト間で差が大きく、発現量が小さいほど定量結果がソフトウェアに依存することが確認された(図 5)。

図4: 4種類のソフトにおける48種類のABCトランスポーター遺伝子の発現量の比較

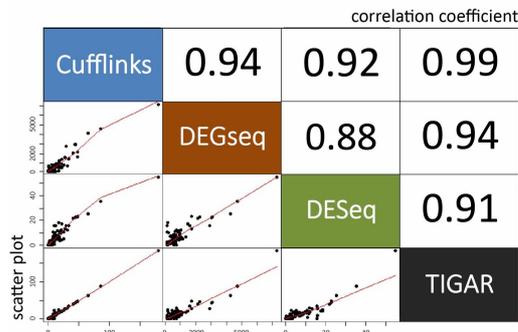
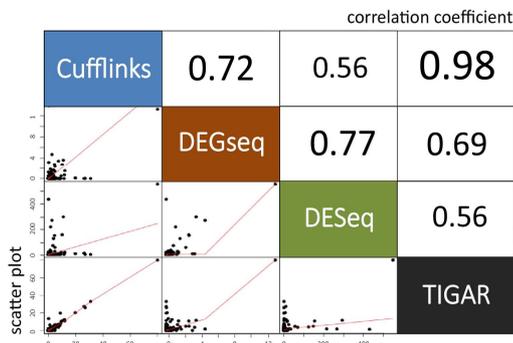


図5: 4種類のソフトにおける502種類のスプライスバリエントの発現量の比較



これを反映して、RT-qPCR で再現性のなかった 7 種類のスプライスバリエントについては 4 種類のソフト間で大腸癌特異的な発現パターンに再現性がみられなかった。一方で、RT-qPCR で再現性のあった ENST00000272895 については 4 種類のソフトのいずれにおいても大腸癌特異的な同様の発現パターンを示した。以上より、大腸癌特異的なスプライスバリエントとして ABCA12 のバリエントである ENST00000272895 が抽出された。ABCA12 はこれまで抗癌剤を基質とすることは知られていないため、抗癌剤耐性メカニズムとの関連性は低いと考えられるが、臨床病理学的因子との関連を解析することで新規バイオマーカーとして活用できる可能性は高いと考えられる。今後、当研究室で保存している大腸癌臨床検体を用いて解析を行う予定である。

(4) Ensembl に加えて、Refseq に登録されているスプライスバリエント 91 種類について発現量を解析した結果、上記結果で抽出された大腸癌特異的に対応する Refseq transcript ID:NM_173076 は、Refseq を対象とした解析においても大腸癌特異的な発現変化を示した。また抗癌剤耐性関連 ABC トランスポーターのスプライスバリエントについては Refseq を対象とした解析では、大腸癌特異的な発現変化を示すものは新たに抽出されなかった。

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 8 件)

- . Kajiwara T, Miura K, Ohnuma S, Gastrointestinal toxicities of 5-fluorouracil increase the proportion of regulatory T cells in intestinal tract: advantages of alternate-day S-1 administration. Int J Clin Oncol. 2015. [in press] (査読有り)
- . Komura T, Miura K, Shirasaka T, Ohnuma S, et al. Usefulness of alternate-day administration of S-1 and leucovorin in a xenograft mouse model of colorectal cancer: a shorter drug-free interval leads to more efficient antitumor effects. Int J Clin Oncol. 2015 Feb;20(1):117-25. (査読有り)
- . Kono E, Tanaka N, Kudo K, Musha H, Tsuchiya T, Miyachi T, Nagao M, Kajiwara T, Kimura S, Karasawa H, Aoki T, Abe T, Ohnuma S, et al. Two cases of advanced gastric cancer achieved pathological complete response by preoperative chemotherapy with S-1 plus weekly low-dose CDDP. Gan To Kagaku Ryoho. 2014 Nov;41(12):2279-81.
- . Kobayashi M, Ohnuma S, et al. A case report of complete pathological response of a locally advanced rectal cancer after long term chemotherapy. Gan To Kagaku Ryoho. 2014 Nov;41(12):1755-7.
- . Kimura S, Ohnuma S, et al. A case of pathological complete response

to It. Lateral lymph node metastasis from lower rectal cancer by S-1 combined neoadjuvant chemoradiotherapy. Gan To Kagaku Ryoho. 2014;41 (12) 1560-2.

- . Fung KL, Pan J, Ohnuma S, et al.: MDR1 synonymous polymorphisms alter transporter specificity and protein stability in a stable epithelial monolayer. Cancer Research. 2014;74 (2) :598 - 608. (査読有り)
- . Zhao XQ, Dai CL, Ohnuma S, et al. Tandutinib (MLN518/CT53518) targeted to stem-like cells by inhibiting the function of ATP-binding cassette subfamily G member 2. Eur J Pharm Sci. 2013;49(3):441-50 (査読有り)
- . Ohnuma S, et al. Therapeutic strategy for neuroendocrine tumor of the rectum. Gan to Kagaku Ryoho. 2013;40 (12):2077-79

[学会発表](計 17 件)

小林 実、大沼 忍、他、大腸癌に発現する抗癌剤耐性 ABC トランスポーターのサブライスバリエーション解析、第 101 回日本消化器病学会総会、2015 年 4 月 23 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

大沼 忍、局所進行、再発直腸癌に対する外科治療(招待講演)、第 13 回山形骨盤外科研究会、2015 年 1 月 24 日、ホテルキャッスル(山形県山形市)

Kobayashi M, Ohnuma S, et al. Transcriptome analysis of human ABC-transporters in colorectal cancer cell lines and surgically resected cancer tissues、NIH-Japan-JSPS Symposium、2014 年 10 月 23 日、Bethesda

(USA)

小林 実、他、大腸癌特異的な ABC トランスポーターのサプライズバリエーション解析、第 3 回生命医薬情報連合大会、2014 年 10 月 2 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

大沼 忍、他、進化する大腸癌治療（招待講演）第 6 回元気健康フェア in とうほく、2014 年 4 月 6 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

小林 実、大沼 忍、他、大腸癌に発現する ABC トランスポーターのサプライズバリエーション解析、東北大学大学院医学系研究科第 7 回 リトリート大学院生研究発表会、2014 年 1 月 18 日、片平さくらホール（宮城県仙台市）

大沼 忍、他、結腸癌に対する腹腔鏡下結腸切除術における腹部手術の既往。第 26 回日本内視鏡外科学会総会、2013 年 11 月 28 日、福岡国際会議場（福岡県博多市）

大沼 忍、他、直腸 GIST の治療戦略、第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会、2013 年 11 月 15 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

大沼 忍、大腸癌化学療法 東北大学病院での取り組み。第 62 回日本農村医学会学術総会（招待講演）。2013 年 11 月 7 日、福島ビューホテル（福島県福島市）

大沼 忍、他、Stage IV 大腸癌手術症例における長期生存例の特徴、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013 年 10 月 24 日、京都国際会館（京都府京都市）

Toshima M, Ohnuma S, et al. Analysis of the single nucleotide polymorphisms of the DPYD gene that affect adverse events in 5-FU treated patients. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

大沼 忍、他、直腸神経内分泌腫瘍に対する治療方針（優秀演題賞）第 1 回神経

内分泌腫瘍研究会学術集会、2013 年 9 月 28 日、京都テルサ（京都府京都市）

大沼 忍、三浦 康、他、Stage IV 大腸癌の長期生存例の解析に基づく治療戦略、第 67 回日本消化器外科学会総会、2013 年 7 月 18 日、富山国際会議場（富山県富山市）

大沼 忍、他、直腸神経内分泌腫瘍に対する手術症例の検討、第 35 回日本癌局所療法研究会、2013 年 5 月 31 日、ホテルオークラ神戸（兵庫県神戸市）

大沼 忍、三浦 康、他、直腸カルチノイド手術症例の検討、第 113 回日本外科学会定期学術集会、2013 年 4 月 11 日、福岡国際会議場（福岡県博多市）

Ohnuma S, Miura K, et al. Stenofoline is a potent modulator of the multidrug resistance-linked P-glycoprotein (ABC1). AACR, 2013 年 4 月 6 日、Washington D.C. (USA)

小林 実、大沼 忍、他、消化器癌に発現する抗癌剤耐性 ABC トランスポーターのサプライズ解析、東北大学大学院医学系研究科第 6 回リトリート大学院生研究発表会、2013 年 1 月 19 日、片平さくらホール（宮城県仙台市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沼 忍 (Ohnuma Shinobu)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：70451565

(2) 研究分担者

三浦 康 (Miura Koh)
宮城県立がんセンター・がん薬物療法研究部・特別研究員
研究者番号：40282074