

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701011

研究課題名(和文) RNAiスクリーニングを用いた大腸癌化学療法効果予測バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Identification of biomarkers by RNAi screening that predict efficacy of chemotherapy in colon cancer

研究代表者

荒川 泰弘 (Arakawa, Yasuhiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：80349547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円、(間接経費) 390,000円

研究成果の概要(和文)：今回、RNA干渉法によるゲノムワイドスクリーニングで、発現の抑制が大腸癌細胞株に抗癌剤耐性をもたらす遺伝子の探索を行った。

イリノテカン耐性となった十数個の大腸癌細胞亜株が得られた。ターゲットとなる遺伝子の発現抑制が実際に確認され、遺伝子の発現抑制によりイリノテカン耐性をもたらされる3遺伝子を抽出した。このうち、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の抑制により、細胞増殖が抑制され、イリノテカン投与によるアポトーシス導入の低下が認められた。

研究成果の概要(英文)： In this study, using genome-wide RNA interference screening, we explored genes whose downregulation promote colon cancer cells resistant to anticancer drugs.

We obtained a dozen sublines from DLD-1 that were resistant to irinotecan. We identified three genes whose expression were actually suppressed in the resistant sublines. The suppression of identified genes caused DLD-1 cells resistant to irinotecan. Among those three genes, we focused on the gene encoding histone methyltransferase. When this gene was knocked down, cell growth was inhibited and apoptosis induced by irinotecan was suppressed.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：大腸癌 薬剤感受性 薬剤耐性 RNAiスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

(1) オキサリプラチンとイリノテカン近年、大腸癌化学療法の中心的薬剤として臨床で広く用いられている。しかし、これらの薬剤に対する耐性に関係し、臨床での化学療法の選択に有用かつ実用的な遺伝子異常は十分に解明されていない。現在、進行再発大腸癌に対する化学療法は一次治療として、フッ化ピリミジン系薬剤にオキサリプラチンを加えた FOLFOX 療法または CapeOX 療法、フッ化ピリミジン系薬剤にイリノテカンを加えた FOLFIRI 療法、さらに分子標的治療薬を併用する治療が標準となっている。治療の進歩により、進行再発大腸癌の生命予後は best supportive care のみを行った場合の約 8 ヶ月から、2 年以上へと改善した。ただし、一次治療の奏効率は 50%程度である。

(2) 進行再発大腸癌患者のおよそ半数が標準化学療法に自然耐性であることから、治療効果は不十分であり、無効の患者にも多剤化学療法が導入されているという事実は医療経済面からも早急な対策が必要である。さまざまな基礎研究やトランスレショナルリサーチが行われているにも関わらず、臨床におけるオキサリプラチン、イリノテカンの効果予測と治療選択に有用、実用的なマーカーは少ない。近年、DNA 修復に関わる遺伝子(ERCC1、XPD、XRCC1)の多型がオキサリプラチンを含むプラチナ製剤による治療の効果に関連があるとされ、精力的に研究がなされている。一方、イリノテカンについては、代謝活性物質である SN-38 をグルクロン酸抱合する UGT1A1 の多型が好中球減少など有害事象の発現率に関連することが知られている。ただし、これらの研究では胚細胞変異を検出することにより患者が生来持つ性質に焦点をあてており、腫瘍が形成される過程で付加的に出現する体細胞変異ともなう遺伝子の活性の変化、重複や欠失の影響は考慮していない。

(3) 癌の分子病理学的な側面からみると、大腸癌の多段階発癌モデルでも示されているように複数の癌遺伝子の活性化や癌抑制遺伝子の不活性化が腫瘍の発生・進展とともに蓄積する。さらに、遺伝子変異や欠失とならんでプロモーター領域での DNA のメチル化に伴う遺伝子発現の抑制が癌抑制遺伝子不活性化の機序として重要と考えられるようになってきた。細胞の増殖、細胞周期調節、アポトーシスに関わる遺伝子群は多くの癌で変異が報告されており、腫瘍の悪性度だけでなく抗癌剤耐性とも強く関連することが知られている。よって、発現の抑制により抗癌剤耐性の形質を腫瘍細胞に付与する遺伝子の検索は有用な情報をもたらす。今回、発現抑制が大腸癌細胞株に抗癌剤耐性をもたらす遺伝子をスクリーニ

ングする。この研究で得られた候補遺伝子の腫瘍内における発現を化学療法開始前に検討することにより、治療効果を開始前に予測することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 大腸癌細胞株において発現抑制により抗癌剤耐性をおこす遺伝子のスクリーニング

現在、RNA interference(RNAi, RNA 干渉)は任意の遺伝子の発現抑制し、その影響を検討するための技術として広く用いられている。さらに、ヒト全遺伝子を個別に発現抑制することが可能なライブラリーの構築に関する研究も進んでいる(Bernards R et al. shRNA libraries and their use in cancer genetics. Nature methods; 3(9): 701-6. 2006)。ヒト全遺伝子を標的とする shRNA 発現レンチウィルスベクタープールを用いて、網羅的に遺伝子をノックダウンさせることを目的としたライブラリーがいくつかの会社から販売されている(System Biosciences 社 GeneNet Lentiviral siRNA Libraries、OpenBiosystems 社 Decode RNAi Viral Screening Pools)。これらのライブラリーを大腸癌細胞株に導入して、オキサリプラチンおよびイリノテカンに耐性となった細胞を選別する。

(2) ベクター導入による標的遺伝子発現抑制の確認と抗癌剤感受性を検討

選別された細胞群からクローニングを行い、各耐性クローンで shRNA 発現ベクターの標的となっているヒト遺伝子を検索する。また、各クローンにおいて shRNA の標的となっている遺伝子が実際に発現抑制されているか確認する。さらに、スクリーニングで選別された候補遺伝子について、発現を抑制することにより抗癌剤耐性をもたらされるか検討する。選別された遺伝子のうち、文献上でその機能が明らかにされているものについてはその情報を利用して、薬剤耐性との関連を考察する。

(3) 本研究ではヒト全遺伝子を網羅する shRNA 発現ウィルスベクターのプールを高効率に、かつレパートリーを保ったまま大腸癌細胞株に導入する。ヒトゲノムの全塩基配列が利用できるようになった現在、ターゲットとなる配列を狙って表現型を得る方法として RNAi は格好のツールとなっており、本手法は薬剤耐性という特定の表現型に關与する遺伝子の探索に有用だと考えられる。過去、microRNA もしくは short hairpin RNA(shRNA)を発現するレンチウィルスのライブラリーを用いて、ヒト線維芽細胞の形質転換に関わる遺伝子、p53 による細胞周期停止の回避と関わる遺伝子が報告されている。発現抑制により放射線感受性低下を引き

おこす遺伝子の検討も同様の手法を用いて行われているが、抗癌剤耐性に関わる遺伝子を検討した報告は非常に少ない。したがって、予定している実験手法は細胞の特定の表現形と関連のある遺伝子発現低下のスクリーニングには非常に有用であるが、その応用はまた途上である。遺伝子変異、染色体欠失、プロモーター領域のメチル化などエピジェネティクスを介した癌抑制遺伝子の不活性化は細胞の増殖亢進、脱分化、アポトーシス抵抗性などの形質を癌細胞に付与し、化学療法開始前に抗癌剤に対する自然耐性をもたらすと考えられている。本研究では抗癌剤に対する自然耐性に関与する遺伝子も選別することが可能だと考えられる。ひいては、化学療法開始前の患者の腫瘍検体を用いて、本研究で選別された遺伝子発現を検討することにより、進行・再発大腸癌の一次化学療法として、オキサリプラチンもしくはイリノテカンどちらの薬剤を使用する方に効果が期待できるか予測可能となる。今後、本研究で抽出された遺伝子群の発現状況を大腸癌組織検体で検討することを予定している。今回の研究の結果を参考として、進行・再発大腸癌患者で一次化学療法に対する効果を予測可能であるか検討する前向きな臨床研究を行い、抗癌剤治療の奏効率の向上と薬剤の適正使用につなげる。

3. 研究の方法

(1) shRNA 発現レンチウイルスライブラリーの大腸癌細胞株への導入

具体的には、OpenBiosystem 社の Decode RNAi Viral Screening Pools を使用する。このライブラリーはヒト全遺伝子を個別に標的とした約7万種の shRNA を発現するレンチウイルスのプールであり、安定発現細胞の選択のためにピューロマイシン選択マーカーをもつ。導入する細胞はレンチウイルスの導入効率と薬剤選択後のクローニングの効率の良さを考慮し、代表的な大腸癌細胞株である DLD-1 を予定している。各細胞へのウイルスの重複感染が起こらないよう 0.1 multiplicity of infection (MOI) 程度を目安に、また全てのレパートリーが導入されるよう十分な細胞数にライブラリーを導入する。

(2) 薬剤耐性大腸癌細胞亜株の選択

ライブラリーを導入した大腸癌細胞をオキサリプラチンもしくはイリノテカンの存在下で 48~72 時間培養する。その際、使用する抗癌剤の濃度は 48~72 時間の暴露で少なくとも 99.9~99.99%の細胞が死滅する濃度とし、前もって検討しておく。抗癌剤暴露で選択の後、shRNA の安定発現株を選択するため、ピューロマイシンを用いて選択を行う。最後に抗癌剤、ピューロマイシン耐性の細胞をクローニングする。

(3) 抗癌剤耐性クローンに導入されたレンチウイルスの shRNA 配列のシークエンス

クローニングした抗癌剤耐性大腸癌細胞の亜株からゲノム DNA を抽出し、ゲノムに組み込まれたウイルスベクターの snRNA 配列を含む部位を PCR で増幅する。増幅された配列をダイレクトシークエンスもしくはクローニングベクターに挿入したのちシークエンスを行う。shRNA 配列の結果をもとに、発現抑制のターゲットとなっている遺伝子をデータベース (NCBI BLAST など) から検索する。既に報告のある遺伝子についてはデータベース上の遺伝子機能の情報を参考にして抗癌剤耐性の機序を予想する。

(4) ターゲットとなっている遺伝子の発現抑制の確認と抗癌剤耐性の関連

各ターゲットの遺伝子について、実際にどの程度発現がノックダウンされているか検討する。ターゲットになっている遺伝子に固有のプライマーを作製し、リアルタイム PCR を用いてメッセンジャー RNA の発現量を親細胞株と shRNA 発現クローンとで比較する。

選別された遺伝子のノックダウンが実際に抗癌剤耐性を引きおこすかを確認するため、当該遺伝子に対して RNAi をひきおこす二本鎖 RNA (dsRNA) を作製する。dsRNA 配列の決定は、合成を委託する会社のアルゴリズムを使用する。ヒト遺伝子に相同配列がないようなネガティブコントロールの dsRNA を導入した細胞とターゲット遺伝子に対する dsRNA を導入した細胞で抗癌剤感受性をコロニー形成法や MTT 法などの細胞増殖アッセイを用いて比較検討する。DLD-1 大腸癌細胞株にオキサリプラチンやイリノテカンを投与すると、およそ 48 時間で G2/M 期に細胞周期停止をおこし、さらに 48 時間継続投与すると大部分の細胞がアポトーシスに陥る。選別された遺伝子を発現抑制した細胞において、抗癌剤投与による細胞周期停止やアポトーシス導入の状態が変化するかを検討する。具体的には当該遺伝子をノックダウンする dsRNA またはネガティブコントロールの dsRNA をカチオン脂質などで導入した大腸癌細胞に抗癌剤を暴露し、時間経過毎に回収、エタノールで固定した後 propidium iodide で細胞を染色する。フローサイトメーターを使用して各細胞集団の DNA 含量の分布をヒストグラムで表示し、細胞周期の停止やアポトーシス分画 (G1 より DNA 含量が少ない細胞集団として観測される) の比率を検討する。

4. 研究成果

(1) イリノテカン耐性大腸癌細胞亜株の選択

はじめに、イリノテカン耐性株のスクリーニングを行った。選択に使用するイリノテカンの濃度は検討の結果 1 μ M とした。ライブ

ラリーを導入した大腸癌細胞株(DLD-1)をイリノテカンの存在下で72時間培養し、耐性のコロニーを十数個得た。

(2) ターゲットとなっている遺伝子の発現抑制の確認

クローニングしたイリノテカン耐性大腸癌培養細胞亜株に導入されたウイルス由来の配列を増幅し、shRNA配列をシークエンスした。発現抑制のターゲットとなっている遺伝子をデータベースから検索した。さらに、shRNAのターゲットとなっている遺伝子について、親株とイリノテカン耐性亜株で発現をリアルタイムPCRで比較した。結果として、発現抑制のターゲットが特定され、実際に耐性亜株で発現抑制を認める遺伝子を3つ同定した。

(3) イリノテカン耐性亜株における薬剤感受性の確認

親株(DLD-1)とイリノテカン耐性亜株におけるイリノテカン感受性をMTSアッセイで比較した所、耐性亜株は親株と比較してIC50で2~4.5倍耐性であることが判明した。

(4) 当該遺伝子の発現抑制とイリノテカン感受性の変化

今回同定された遺伝子のうち、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の発現を抑制する二本鎖RNAを合成し、大腸癌細胞株DLD-1に導入し、イリノテカン感受性を検討した。二本鎖RNAの導入によりターゲット遺伝子の発現抑制をリアルタイムPCRで確認した。当該遺伝子の発現を抑制する二本鎖RNAを導入した細胞はコントロールの二本鎖RNAを導入した細胞と比較してイリノテカン耐性を引き起こすことが確認された。

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5件)

Arakawa Y, Ozaki K, Okawa Y, Yamada H. Three missense mutations of DNA topoisomerase I in highly camptothecin-resistant colon cancer cell sublines. *Oncology Reports*. 30(3): 1053-1058, 2013. 査読有, DOI: 10.3892/or.2013.2594

Nagasaki E, Yuda M, Tanishima Y, Arakawa Y (12名中4番目), Aiba K. Complete response of esophageal small cell carcinoma amrubicin treatment. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 19(4): 770-775, 2013. 査読有, DOI: 10.1007/s10156-012-0510-8

荒川泰弘 オンコロジック・エマージェ

ンシー 高カルシウム血症 成人病と生活習慣病 41巻4号 520-523, 2013. 査読無

荒川泰弘, 相羽恵介 薬効を予測するバイオマーカー 抗癌剤の治療効果を予測するバイオマーカー 癌と化学療法 39巻11号 1608-1612, 2012. 査読無
Kobayashi T, Ichiba T, Sakuyama T, Arakawa Y (17名中4番目), Kuraishi Y. Possible clinical cure of metastatic breast cancer: lessons from our 30-year experience with oligometastatic breast cancer patients and literature review. *Breast Cancer* 19(3): 218-237, 2012. 査読有, DOI: 10.1107/s12282-012-0347-0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 泰弘 (ARAKAWA, Yasuhiro)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80349547

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: