

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460921

研究課題名(和文) RNA結合蛋白を介した上皮間葉転換制御による抗癌剤耐性克服療法の開発

研究課題名(英文) RNA binding proteins modulate drug sensitivity of cancer chemotherapy via EMT related proteins.

研究代表者

小林 隆彦 (Kobayashi, Takahiko)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80333607

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)：上皮間葉転換(EMT)は癌細胞の浸潤能亢進などに関連している。本研究では、RNA結合蛋白であるRBM5がEMTを介して抗癌剤感受性に与える影響を検討した。癌細胞においてRBM5をノックダウンさせるとEMT転写因子Snailの発現量が増加した。一方でRBM5を発現誘導するとSnailの発現量は減少した。5FU耐性癌細胞ではRBM5の発現量は減少しSnailの発現量は亢進していた。またRBM5をノックダウンさせると5FU感受性を低下させ、RBM5を発現誘導すると5FUに対する感受性を亢進させた。これらよりRBM5はSnailの発現制御を介して薬剤感受性に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The biological basis of drug resistance against cancer chemotherapy has not been fully elucidated. RBM5 is known to modulate apoptosis and cell cycle arrest but the molecular mechanisms of RBM5 function remains to be examined. We show here that RBM5 modulates the expression of Snail, which is one of transcription factors that regulate epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). EMT is a process whereby cells acquire morphologic and molecular alterations facilitating tumor metastasis and progression. Recent reports suggest that EMT contributes to the malignant potentials of cancer cells including the drug resistance. In the present study, we suggest that RBM5 plays important roles in the post-transcriptional regulation of mRNAs that are involved in the chemotherapeutic cellular responses.

研究分野：消化器内科

キーワード：薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

消化器癌は造血器腫瘍や生殖器癌に比較して化学療法の奏効率は低く、多剤併用による強力な化学療法を行っても、進行癌においては未だに予後不良である。癌化学療法の問題点の一つに、治療により薬剤耐性細胞が出現し、再増殖を来すことがあげられる。そのため抗癌剤への感受性や耐性に関する分子機構の解明は非常に重要である。近年、上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象である上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) が、癌細胞の浸潤能亢進、抗癌剤耐性獲得などに関連していることが報告されているが、その分子機構は不明な点が多い(図1)。

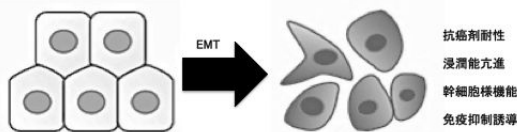


図1. 癌細胞とEMT

細胞内における遺伝情報の発現はDNAから蛋白質までの様々な段階で複雑に制御されている。RNA結合蛋白質(RBP)は、mRNAのスプライシング、核外輸送、細胞質内局在、安定性及び翻訳効率の調節などの転写後遺伝子発現調節において重要な働きをしている。申請者らはRNA結合蛋白質の1つであるRBM5が癌抑制遺伝子p53の転写活性を亢進させることを報告した。さらに各種の癌組織においてRBM5の発現量が低下していることが判明し、予後にも深く関与することを報告した。これらのことはRBM5の発現量の変化が癌細胞の抗癌剤感受性あるいは抗癌剤耐性に何らかの影響を与える可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

EMTは癌細胞の抗癌剤耐性機構に関与する可能性があり、その調節機構解明は抗癌剤耐性克服と新たな治療戦略に寄与するものと期待される。またEMTにより癌細胞が治療抵抗性を示す場合には、EMT促進因子を新たな治療抵抗性予測因子として臨床応用できる可能性もある。あるいはEMT抑制因子が抗癌剤の感受性を増強させるのであれば、その存在は治療効果予測因子ともなり得る。このように、将来的にはEMT制御因子が新しい抗癌剤感受性予測因子、あるいは抗癌剤耐性予測因子としての応用も期待される。本研究は、これまでの研究を発展させて、抗癌剤投与中の癌細胞においてRBM5が発現を制御する新規のEMT調節因子を検索し、抗癌剤感受性あるいは耐性に与える影響を検討する。さらに、その作用機構を解明し、将来的には抗癌剤耐性克服への応用を目指すものである(図2)。

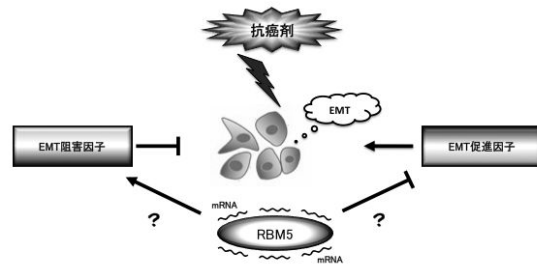


図2. RBM5はEMTの制御因子?

3. 研究の方法

(1) 各種細胞株の樹立: 胃癌細胞株を用いてRBM5全長cDNAのテトラサイクリン発現誘導株およびRBM5を標的とするshRNA安定発現させたRBM5ノックダウン細胞株を樹立した。また、現在の消化器癌の化学療法において中心的に用いる5-フルオロウラシル(5FU)、シスプラチンを細胞培養培地に段階的に濃度を上昇させて長期間培養し薬剤耐性株を作成した。

(2) RBM5による制御を受けるEMTの網羅的検討: ドキシサイクリンによるRBM5誘導株あるいはRBM5ノックダウン細胞株とそれぞれのコントロールの細胞株に抗癌剤を各種濃度で投与した。投与時間としては抗癌剤投与後12時間、24時間、48時間、96時間を検討した。RBM5発現量およびこれらの抗癌剤により変動する遺伝子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。本研究においては、網羅的拾い上げた遺伝子の中から、過去の研究で構築したデータマイニングのアルゴリズムを用いて、既知のEMT関連遺伝子や薬剤代謝関連因子を候補遺伝子として抽出し、その後の追加検討を行った。

(3) 定量的RT-PCR: 培養細胞よりTotal RNAを抽出し、cDNAをRT-PCRにより作成した。定量的PCRはTaqman Probe (Applied Biosystems) を用いてReal Time PCR法にてmRNAを測定した。

(4) Western Blot法: RBM5に対する市販の抗体には、本研究に使用可能な良質な抗体が存在しなかったため、ヒト全長RBM5のcDNAよりリコンビナント蛋白質を精製し、これを抗原としてマウス抗RBM5モノクローナル抗体を作成した。エピトープはRBM5のC末側アミノ酸を特異的に認識していることを確認した。

その他のEMT関連遺伝子、薬剤代謝関連因子に対する抗体は市販のものを使用した。

これらの抗体を用いてWestern Blot法にてタンパク発現量を検討した。

(5) 細胞増殖能の測定: 培養細胞を96wellプレートに1.5-2.0 x 10³個ずつ播き、各種抗癌剤存在下に培養を行い、細胞数をCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability

Assay kit (Promega)を用いて測定した。

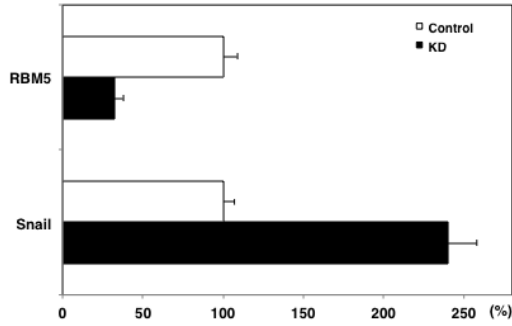


図3. RBM5ノックダウンによるSnail mRNAの変化

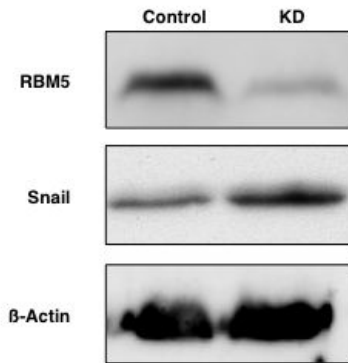


図4. RBM5ノックダウンによるSnailタンパク量の変化

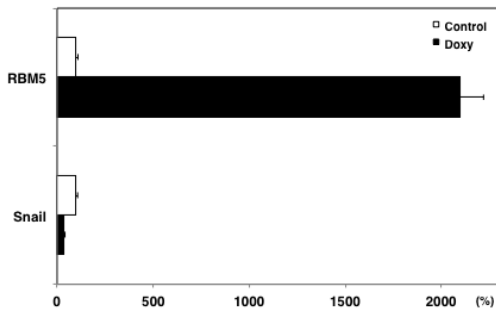


図5. RBM5発現誘導によるSnail mRNAの変化

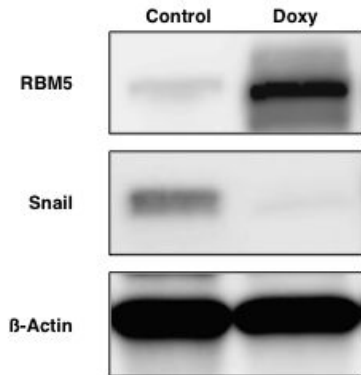


図6. RBM5発現誘導によるSnailタンパク量の変化

(6) 免疫組織染色：上記の抗 RBM5 モノクロー

ナル抗体を用いて手術摘出組織標本の免疫組織染色を行い、臨床病理学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) RBM5 は Snail の発現量を調節する

RBM5 をノックダウンさせた癌細胞株とコントロール株に各種抗癌剤を投与し、マイクロアレイにより変動遺伝子の解析を行った。EMT 関連因子のうち変動の大きいものを抽出し、定量的 RT-PCR にて再確認した所、EMT 調節転写因子の1つとして知られる Snail が胃癌細胞株、大腸癌細胞株、膵癌細胞株に共通の変動を示した。胃癌細胞において RBM5 をノックダウンさせると Snail の mRNA 量(図3)およびタンパク発現量が増加した(図4)。しかし doxycycline を用いて RBM5 を発現誘導すると Snail の mRNA (図5)およびタンパク量は減少した(図6)。

これらの結果は RBM5 が EMT 制御因子である Snail の重要な発現調節因子である可能性が示唆された。

(2) 5FU 耐性胃癌細胞では Snail の発現が亢進している

既報では Snail が 5FU やシスプラチンなどの各種抗癌剤の薬剤耐性機序に関与すると報告されている。そこで 5FU 耐性の胃癌細胞株を樹立し、Snail の発現量を検討した。親株と比較して、5FU 耐性細胞においては Snail の mRNA (図7)およびタンパク発現量は亢進

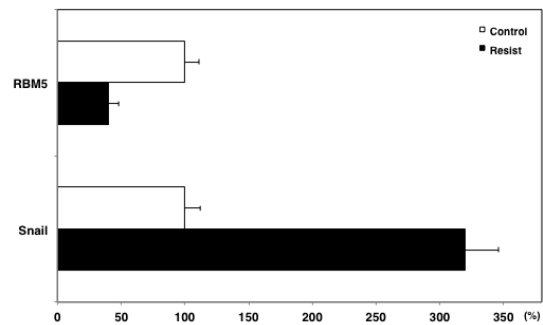


図7. 5FU耐性化によるSnail mRNAの変化

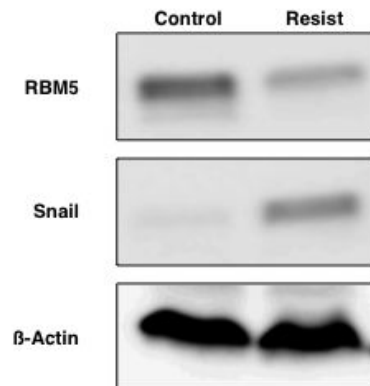
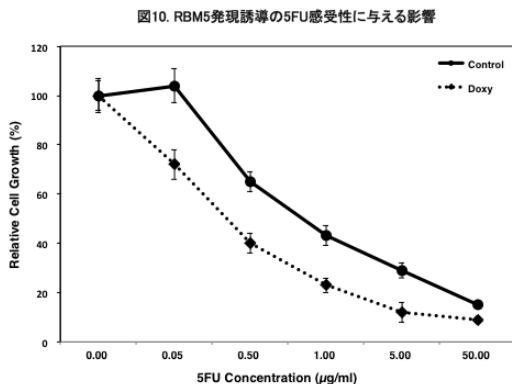
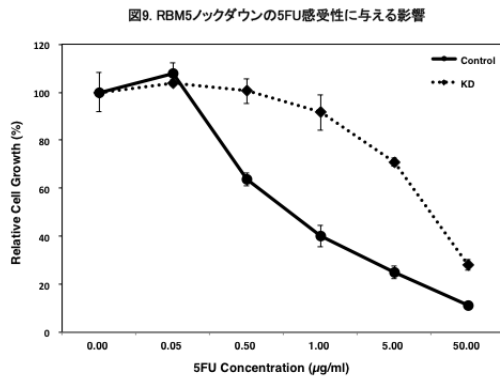


図8. 5FU耐性化によるSnailタンパク量の変化

していた(図8)。しかしRBM5のmRNAおよびタンパク発現量は減少していた。

(3) RBM5の発現量は薬剤耐性・感受性に影響を与える

次にRBM5の発現量の変化が5FUの感受性に与える影響を検討した。RBM5のノックダウンでは5FU感受性を低下させた(図9)。一方でRBM5を発現誘導すると感受性を亢進させた(図10)。このことは癌細胞内におけるRBM5発現量が抗癌剤の感受性に影響を与えることを示唆している。



(4) RBM5はTSの発現量を調節する

SnailはEMTを誘導する転写因子の1つとして知られており、Vinculin、Fibronectin、Vimentinなどの間葉系マーカーの発現を誘導する。また一方で、E-cadherin、Occludin、Claudinsなどの上皮系マーカーの遺伝子発現を抑制することが知られている。本研究ではRBM5によりSnailの発現量が調節されていることが示唆された。しかしRBM5がどのようなSnail下流の標的遺伝子を介して5FUの薬剤感受性を制御しているのかは明らかではない。そこで5FUの代謝酵素のうち癌組織における発現異常が薬剤耐性との関連を報告されているthymidylate synthase (TS)に対してRBM5が与える影響を検討した。

RBM5の発現量が低下しているRBM5ノックダウン細胞および5FU耐性細胞においては、いずれもTSの発現量が増加していた(図11)。このことは、RBM5がTSの発現量を調節していることが示唆された。

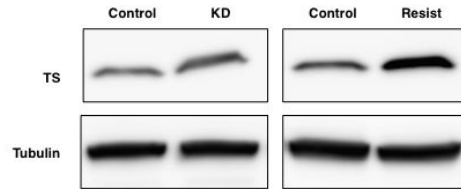


図11. RBM5ノックダウンおよび5FU耐性化によるTSタンパク量の変化

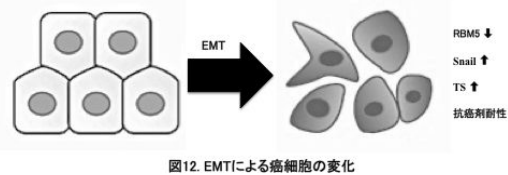


図12. EMTによる癌細胞の変化

(5) 考察

本研究において、RBM5はSnailの発現量を制御することで、5FUの代謝酵素であるTS活性調節を介して薬剤感受性に影響を与えていることが示唆された。このことは癌細胞の悪性度が増す過程でRBM5の発現量が低下し、Snailの発現量が高まりEMTが進行する可能性がある。この結果、TSの発現量が増進し、5FUなどの薬剤耐性を獲得していく可能性が示唆された(図12)。

現在の所、症例数は少ないが手術摘出組織標本を用いて、免疫染色によりRBM5発現量の検討を行っている。RBM5の発現量が低下している患者では、5FU系抗癌剤を用いた術後化学療法に対する効果が乏しい傾向を認めている(図13)。今後は胃癌、大腸癌、膵臓癌などの多数の手術摘出標本を用いて、RBM5およびSnailの発現量を検討し、臨床病理学的因子、化学療法奏効率および予後との関連を検討していく予定である。さらに同一患者の内視鏡生検サンプルを用いて、抗癌剤投与前後におけるRBM5およびSnailの発現量も合わせて検討していきたいと考える。これらの検討により術前あるいは化学療法前のRBM5およびSnail発現量により、抗癌剤に対する感受性を予測できる可能性を検討していきたい。

現時点ではRBM5がどのような機序でRBM5がSnailの発現制御を行い、さらにSnailがどのようにTS発現制御を行っているかは不明である。今後はRBM5によるSnail発現制御に関わる分子機序を詳細に検討していく必要がある。

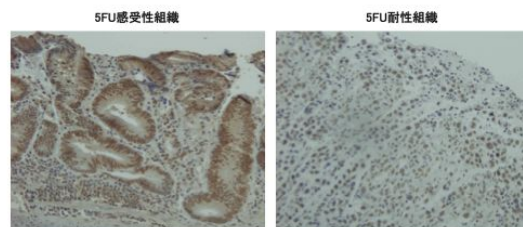


図13. RBM5の発現量と5FU感受性

また今回の基礎検討では、RBM5 の発現亢進は 5FU に対する薬剤感受性を上昇させた。このことは将来的には RBM5 の作用を増強させるような低分子あるいは Snail の転写阻害剤などの EMT 抑制剤は、抗癌剤耐性克服のための分子標的薬の開発に繋がると期待される。

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 2 件)

Sato F, Kubota Y, Natsuzaka M, Maehara O, Hatanaka Y, Marukawa K, Terashita K, Suda G, Ohnishi S, Shimizu Y, Komatsu Y, Ohashi S, Kagawa S, Kinugasa H, Whelan KA, Nakagawa H, Sakamoto N. EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial - mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16(6) :933-940. doi: 10.1080/15384047.2015.1040959. 査読有

Sasaki T, Fuse N, Kuwata T, Nomura S, Kaneko K, Doi T, Yoshino T, Asano H, Ochiai A, Komatsu Y, Sakamoto N, Ohtsu A. Serum HER2 levels and HER2 status in tumor cells in advanced gastric cancer patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2015; 45(1): 43-48. doi: 10.1093/jjco/hyu174. 査読有

Kobayashi T, Ozasa M, Miyashita K, Saga A, Miwa K, Saito M, Morioka M, Takeuchi M, Takenouchi N, Yabiku T, Kanno H, Yuzawa S, Tanino M, Tanaka S, Kawakami H, Asaka M, Sakamoto N. Large solid-pseudopapillary neoplasm of the pancreas with aberrant protein expression and mutation of β -catenin. *Intern Med.* 2013;52(18):2051-2056. doi:10.2169/internalmedicine.52.9512 査読有

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小林 隆彦 (KOBAYASHI TAKAHIKO)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：80333607

(2) 研究分担者

小松 嘉人 (KOMATSU YOSHITO)
北海道大学・大学病院・准教授
研究者番号：60333598