

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462027

研究課題名(和文) microRNA-gene pathway を介した胃癌トラスツズマブ耐性機序の解明

研究課題名(英文) The Molecular mechanism of trastuzumab for gastric cancer via microRNA &#8211;gene pathway

研究代表者

岩槻 政晃 (IWATSUKI, Masaaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：50452777

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)：トラスツズマブのHER2 陽性胃癌に対する化学療法への上乗せ効果が示されたが、その耐性機序は明らかではない。トラスツズマブ耐性胃癌細胞株を作成し、耐性に関連するmicroRNA (miR)の同定を試みた。トラスツズマブを持続曝露させ、耐性株(R株)を作成した。R株と親株(P株)のmiR arrayで、トラスツズマブ耐性に関連するmiRを同定した。miR223-FBXW7に着目した。6カ月の持続曝露により耐性株を作成した。miR arrayの結果、R株で5倍以上の発現上昇を認められた23種類のmiRを同定した。miR-223-FBXW7がトラスツズマブ感受性を制御していた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify microRNA-gene pathway that regulates the sensitivity of HER2-positive GC cells to trastuzumab. We performed following experiments: (i) trastuzumab-resistant GC cell: We cultured the HER2-positive cell line in the presence of trastuzumab (ii) microRNA array: We examined the miR expression profile using miR array analysis. (iii) novel miR-gene pathway: We focused on miR-223-FBXW7 pathway based on miRarray analysis. Results: (i) We established resistant cell without significant changes in HER2 in the presence of trastuzumab continuously for 6 months. (ii) We identified 23 miRs up-regulated in the resistant cells. (iii) the miR-223/FBXW7 pathway regulates the sensitivity of a HER2-positive GC cell line to trastuzumab. In conclusion, this study suggested that the miR-223-FBXW7 pathway can be a crucial clue to the mechanism of resistance to trastuzumab in GC.

研究分野：微量癌細胞、抗癌剤耐性、microRNA

キーワード：胃癌 トラスツズマブ耐性 microRNA

1. 研究開始当初の背景

胃癌は罹患率、死亡率はいずれも高く、治療法の確立されていない腹膜播腫をきたしやすい難治性の癌腫である。胃癌に対して初の分子標的治療薬であるトラスツズマブの有効性が示され、治療成績の向上が期待されるが、一方でその耐性が懸念される。実臨床では免疫染色やFISH法でHER2の発現が評価されるが、HER2陽性例においても病勢コントロール率は47%である。また、HER2以外のトラスツズマブの感受性を規定する分子生物学的マーカーは存在しない。

2. 研究の目的

遺伝子発現調節機構として注目されているmicroRNAに着目し、臨床検体を用いて新たなマーカーとしてmicroRNA-gene pathwayを解明し、HER2陽性胃癌に対するトラスツズマブ耐性機構を明らかにすることで、より正確で効果的な個別化治療を確立することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

胃癌に対する初の分子標的治療薬であるトラスツズマブの病勢コントロール率はHER2陽性症例の約50%である。実臨床ではHER2以外のバイオマーカーは明らかではなく、未だその耐性に関する分子生物学的なメカニズムの解明はなされていない。本研究では診断のため必ず施行される内視鏡的生検組織と末梢血を用いて、トラスツズマブ耐性を規定するmicroRNA(miR)と現在、脚光を浴びているFBXW7遺伝子に着目しmiR-gene pathwayの同定を試みる。microarray解析を行うことによって網羅的にmiR,の発現プロファイルを明らかにし、トラスツズマブ耐性に真に関わるmiR, geneをpick upする。pick upされたmiR, geneについて臨床サンプルを用いてvalidationを行い、microarrayデータの妥当性を検証し、新規miR, geneのトラスツズマブ耐性マーカーの有用性を確立する。また、in vitroでmiR-gene pathwayを証明することにより、トラスツズマブ耐性のメカニズムが解明され、臨床応用への期待も高まる。

4. 研究成果

Trastuzumab耐性株の作成とmicroRNA array
Trastuzumabに対して感受性を示すHER2陽性胃癌細胞株(NCI-N87)を用い、Trastuzumab 100 µg/mlを6か月間持続投与を行い、耐性株を作成した。そこで、耐性株と親株でmicroRNA arrayを行い、Trastuzumab耐性に関わると思われるmiRを同定した。これまで、癌関連microRNAと報告されているmiR-21に着目した。

arrayにて同定されたmiR-21とその標的であることが報告されているPTENに注目した。NCI-N87を除くHER2陽性株で、その発現をreal time PCR法・Western blottingで確認し、miR-21とPTENの発現には逆相関を認め、miR-21高発現/PTEN低発現株とmiR-21低発現/PTEN高発現株を同定した。

miR-21の強制発現および発現抑制実験
miR-21の強制発現および発現抑制を行い、PTENの発現・その下流遺伝子であるp-AKT発現の変化を確認した。miR-21の発現抑制を行ったところ、PTEN発現は上昇し、その下流であるp-AKTの発現は低下した。また、miR-21強制発現を行ったところ、PTEN発現は低下し、p-AKTの発現は上昇した。

miR-21の発現の変化によるTrastuzumab感受性の変化

miR-21強制発現にてTrastuzumabに対して耐性を示すように変化したが、miR-21の発現を抑制するとTrastuzumabの感受性が増加した。

耐性機序の解明

miR-21強制発現株にてFACSを用いてアポトーシスの変化について検討したところ、miR-21強制発現株では、Trastuzumab投与下においてアポトーシスの割合が減少していた。

Trastuzumab耐性株の作成に成功し、Trastuzumab耐性に関与する新たなmicroRNAを検索した。そこで、本研究で着目するFBXW7遺伝子をregulateするmicroRNAをmicroRNA arrayの結果から、in silicoで候補microRNAとしてmiR-223を同定した。

まずFBXW7のsiRNAによる発現抑制を行い、FBXW7発現低下でTrastuzumab感受性が低下することを確認し、FBXW7がTrastuzumab耐性に関わることを明らかにした。ついで、miR-223がFBXW7特異的に制御しているかをluciferase assayを用いてdirect bindingすることを確認した。そこで、同定したmiR-223をHER2陽性株化細胞へ強制発現(pre-miR)したところ、FBXW7は低下し、Trastuzumab感受性が低下することをしました。一方で、miR-223を発現抑制(anti-miR)を行ったところ、FBXW7の発現は上昇し、Trastuzumab感受性が増加した。次いで、耐性の分子生物学的メカニズムの明らかにするために、FBXW7の標的蛋白であるMCL1に着目した。miR-223を強制発現すると、FBXW7は低下し、標的蛋白であるMCL1が上昇し、Trastuzumab感受性が低下した。その際、アポトーシス関連蛋白の発現を確認すると、MCL1上昇により抗アポトーシス作用により、感受性が低下することを明らかにした。

現在は、耐性株を用いて、同定されたmicroRNAが存在する染色体のcopy numberを確認し、genomeレベルでの発現を確認してい

る。cDNA array, CGH array を行うことで、耐性獲得で誘導されるゲノムレベルのダイナミックな変化を解析している。Trastuzumab 耐性株を樹立し、Trastuzumab 耐性に関わる microRNA-gene pathway を同定した。新規 microRNA を同定するために行った microRNA microarray の結果から、約 30 個の Trastuzumab 耐性に関与する microRNA を同定した。同定された microRNA の染色体上の locus を確認したところ、ある特定の領域に偏在していた。そこで、耐性株と親株を用いて、CGH array を行い、ゲノムレベルでの変化を網羅的に解析した。その結果、ある特定の領域でゲノムの amplification や loss がみられ、trastuzumab の二次耐性の獲得にはゲノムレベルでのダイナミックな変化が起きていることが明らかとなった。また、同時に cDNA microarray を行い、ゲノムと連動して、その発現が増加している遺伝子、減少している遺伝子群を同定した。さらに pathway 解析を行い、ECM receptor pathway や MAPK pathway が連動して変化していることが明らかとなり、二次耐性に関わる pathway を包括的に解析することができた。

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 2 件)

Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ishimoto T, Ida S, Imamura Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H.

“The sensitivity of gastric cancer to trastuzumab is regulated by the miR-223/FBXW7 pathway.”

Int J Cancer. 2015;1;136(7):1537-45. doi: 10.1002/ijc.29168.

Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H.

“The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab.”

Ann Surg Oncol. 2014;21(1):343-50. doi: 10.1245/s10434-013-3325-7.

[学会発表](計 15 件)

岩槻政晃、江藤弘二郎、藏重淳二、小澄敬祐、黒田大介、江藤二男、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌におけるトラスツズマブ二次耐性獲得のメカニズムの解明」、第 116 回日本外

科学会定期学術集会、2016 年 4 月 14 日、リーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市) 発表確定

岩槻政晃、藏重淳二、江藤弘二郎、糸山明莉、黒田大介、江藤二男、小澄敬祐、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌におけるトラスツズマブ二次耐性に関与する microRNA の同定」、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015 年 11 月 20 日、米子全日空ホテル(鳥取県・米子市)

Iwatsuki M, Kurashige J, Eto K, Baba Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Baba H, “Comprehensive Analysis of secondary-resistant genes for trastuzumab in gastric cancer” 2016 AACR-JCA Joint Conference, 2016 年 2 月 19 日, Hyatt Regency Maui (Hawaii, USA)

Masaaki Iwatsuki, Eto Kojiro, Hideo Baba, “Molecular mechanism of secondary-resistant for trastuzumab in gastric cancer.” ASCO-GI 2016, 2016 年 1 月 21 日, Moscone West Building (San Francisco, USA)

江藤弘二郎、岩槻政晃、石本崇胤、今村裕、馬場祥史、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における FBXW7-MCL1 pathway を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 69 回日本消化器外科学会総会、2014 年 7 月 17 日、郡山総合体育館(福島県・郡山市)

Kojiro Eto, Masaaki Iwatsuki, Takatsugu Ishimoto, Hideo Baba, “Sensitivity to trastuzumab for gastric cancer is regulated by miR-223/FBXW7 pathway.” AACR Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 7 日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

江藤弘二郎、岩槻政晃、石本崇胤、今村裕、井田智、馬場祥史、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における FBXW7 を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014 年 4 月 4 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

江藤弘二郎、岩槻政晃、石本崇胤、井田智、今村裕、馬場祥史、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における PTEN を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 86 回日本胃癌学会総会、2014 年 3 月 22 日、

パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

江藤弘二郎、**岩槻政晃**、**石本崇胤**、井田智、今村裕、馬場祥史、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における microRNA/FBXW7 を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 47 回制癌剤適応研究会、2014 年 3 月 7 日、名古屋マリオットアソシアホテル（愛知県・名古屋市）

Kojiro Eto, **Masayuki Watanabe**, **Masaaki Iwatsuki**, **Takatsugu Ishimoto**, Hideo Baba, “A novel gene-pathway regulating of microRNA mediates resistance to trastuzumab for gastric cancer.” The 4th JCA-AACR, 2013 年 12 月 17 日, Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts（千葉県・浦安市）

江藤弘二郎、**渡邊雅之**、**岩槻政晃**、馬場秀夫、「胃癌におけるマイクロ RNA を介したトラスツズマブ耐性機序の解明」、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

Kojiro Eto, **Masayuki Watanabe**, **Masaaki Iwatsuki**, Hideo Baba, “A novel gene-pathway regulating of microRNA mediates resistance to trastuzumab for gastric cancer.” The 1st International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology, 2013 年 9 月 26 日, Xiamen International Conference Center（XiaMen, China）

江藤弘二郎、**渡邊雅之**、**岩槻政晃**、**石本崇胤**、今村裕、井田智、馬場祥史、岩上志朗、坂本快郎、宮本裕士、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における microRNA を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 45 回胃癌病態機能研究会、2013 年 8 月 3 日、名古屋市立大学（愛知県・名古屋市）

江藤弘二郎、**渡邊雅之**、**岩槻政晃**、**石本崇胤**、馬場祥史、岩上志朗、宮本裕士、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫、「胃癌における microRNA を介した Trastuzumab 耐性機序の解明」、第 68 回日本消化器外科学会、2013 年 7 月 19 日、サンホテルフェニックス（宮崎県・宮崎市）

Eto K, **Watanabe M**, **Iwatsuki M**, Baba H, “A novel gene-pathway regulating of microRNA mediates resistance to trastuzumab for gastric cancer.” AACR Annual Meeting 2013, 2013 年 4 月 8 日, Walter E. Washington Convention

Center（Washington, DC ,USA）

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩槻 政晃（IWATSUKI, Masaaki）
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：50452777

(2) 研究分担者

渡邊 雅之（WATANABE, Masayuki）
公益財団法人がん研究会・その他部局等・食道担当部長
研究者番号：80254639

石本 崇胤（ISHIMOTO, Takatsugu）
熊本大学・国際先端医学研究機構・客員准教授
研究者番号：00594889

(3) 研究協力者

藏重 淳二（KURASHIGE, Junji）
熊本大学・医学部附属病院・特任助教

江藤 弘二郎（ETO, Kojiro）
公益財団法人がん研究会・その他部局等・医員