

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640067

研究課題名(和文) 長鎖非コード/アンチセンスRNAを標的にした薬剤耐性がん細胞抑制の新戦略

研究課題名(英文) New strategy for drug-resistant cancer cells by targeting long, non-coding/antisense RNA

研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA, Hidenori)

高知大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30295422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト非小細胞肺癌由来細胞株PC9を用い抗がん剤gefitinibを投与し薬剤耐性株DTP細胞(薬剤投与直後生存している細胞のうちほぼ分裂を停止した状態)、DTEP細胞(更なる薬剤投与で元の分裂能を回復した状態)、DTEP-r細胞(DTEP細胞を薬剤非存在下で長期培養し再び薬剤感受性を獲得)を作成した。PC9、DTP、DTEP細胞サンプルのRNA-seq(mRNAとtotal RNA)を行い特にポリA鎖を欠くncRNAの割合が変化している遺伝子座を特定した。がんの表現型を現すいくつかの発現マーカーを上記4細胞種間で定量し、細胞間の変化がエピジェネティックなものであることを予想させる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We established a drug-resistant cell line DTP (non-proliferative immediately after drug treatment), DTEP (cell proliferation resumed), DTEP-r (drug-sensitive after a long culture without drug), starting with PC9 cells, derived from human non-small cell lung cancer, using anticancer drug, gefitinib. We performed RNA-seq (mRNA and total RNA) for each cell line, and identified ncRNA producing gene loci showing unique expression balances between poly(A)+RNA and total RNA. We also obtained differential expression profiles of several genes among cell types, which suggested the phenotypic differences among cell types were due to epigenetic changes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：薬剤耐性 非コードRNA エピジェネティクス トランスクリプトーム RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

一般にエピジェネティックな制御とは DNA やヒストンの修飾を介すると理解されるが、RNA 分子を介して行われる場合も多い。内在性アンチセンス転写は哺乳動物で普遍的に行われていることが判明し、これらの RNA やその他一般的な非コード RNA (ncRNA) など核内にとどまる RNA も多く、ゲノムの約 7 割の領域は転写されていると報告されている。しかしスタンダードな cDNA 作製に基づく遺伝子発現解析のプロトコルでは poly(A) 鎖を有する mRNA のみを対象としているため、従来法ではポリ A 鎖の無い ncRNA の発現は全く見ていないことになる。

最近、研究代表者らの独自の工夫にて、通常のマイクロアレイ解析手法では検出が不可能で、かつヒト大腸がん特異的なアンチセンス RNA の検出に成功した。一方、ここ数年、次世代シーケンシングによる発現解析 (RNA-seq) が一般的になりつつある。しかしながら RNA-seq においても poly(A) 鎖を有する RNA のみを対象とすると、トランスクリプトーム全体を見ていないことになる。

本研究では研究代表者らの大腸がんにおける解析方法を手本とし、通常のがん細胞とそれより派生した抗がん剤耐性細胞集団を比較し、耐性に直接関わるアンチセンス/ncRNA の同定を試みる。

2. 研究の目的

本研究ではがん治療における抗がん剤に対する耐性のうち、エピジェネティックな要因が原因であるものを想定し、非コード RNA もしくは内在性アンチセンス RNA を用いて薬剤耐性を取り除くことを最終的な目的とする。

「薬剤耐性⇔薬剤感受性」には可逆的でエピジェネティックな変化によるものが存在するが、その機構の多くは不明である。本研究では「薬剤感受性細胞集団」と「薬剤耐性細胞集団」のトランスクリプトーム解析により非コード/アンチセンス RNA 発現の変化を伴うゲノム領域を特定する。

これら領域は非コード/アンチセンス RNA の強制発現もしくはノックダウンにより薬剤耐性を可逆的に変化させることを試みるターゲットとなる。組織・細胞全体に影響を与える一般的な阻害剤に比べ、変異の起きたゲノム領域特異的なアプローチのため、副作用が少ないと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 抗がん剤に対する薬剤耐性がん細胞出現に関してエピジェネティックな要因を示唆した Sharma et al. による文献(1)を参照とし、抗がん剤 gefitinib に感受性のある非小

細胞肺がん由来の細胞株 PC9 を用い、薬剤耐性株を樹立した。薬剤耐性株は薬剤投与後 2 週間程度で出現し、ほとんど分裂をしない drug-tolerant persisters (DTPs) とその後約 1 ヶ月間、薬剤を投与し続けることで出現し分裂能を回復した drug-tolerant expanded persisters (DTEPs) の 2 種類である。

(2) 上記がん細胞株と特定の抗がん剤により導出した薬剤耐性がん細胞の RNA を用いて、次世代シーケンサーにより配列決定 (RNA-seq) を行った。その際、センス鎖とアンチセンス鎖の転写を区別して解析できるように、鎖特異的な cDNA を準備した。また、poly(A)+RNA (ポリ A プラス RNA : ポリ A 鎖のついた RNA) と共に poly(A)-RNA (ポリ A マイナス RNA : ポリ A 鎖の無い RNA) の発現も解析するため、total RNA の RNA-seq も行った。

(3) 配列解析を行い、3 種類の細胞種 (PC9, DTP, DTEP) 間で発現の変化している遺伝子の特定を行った。その際、通常の mRNA (ポリ A 鎖のある RNA) と共に total RNA サンプルでの解析も行い、特に total RNA の変化に注目をした。

(4) PC9 と DTEP 間の変化がエピジェネティックな変化であることを示すため、作成した DTEP を薬剤のない条件下で培養を続けることにより、再びオリジナルの PC9 のように薬剤感受性になる細胞 (DTEP re-sensitive, DTEP-r) の作成を行い、基本的な表現型の発現マーカーのチェックを行った。

<文献>

(1) Sharma et al., Cell 141, 69-80, 2010.

4. 研究成果

(1) PC9, DTP, DTEP 間でエピジェネティックな変化が起きていることの指標の 1 つとなるマーカー KDM5A (Sharma らによる) の発現をリアルタイム PCR で解析したところ、図 1 のように上昇しており、エピジェネティックな変化が起きていることが示唆された。

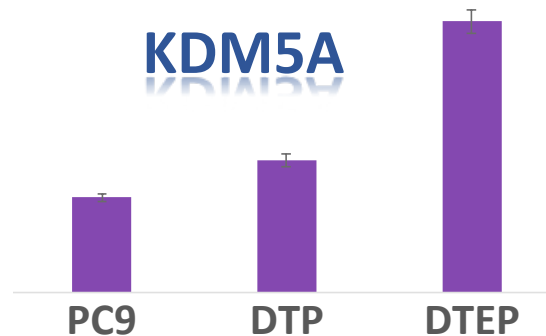


図 1 KDM5A の発現

(2) 遺伝的な変化による薬剤耐性の可能性を確認するため、もっとも頻繁に見られる2つの遺伝的変異を調べた。1つは MET tyrosine kinase 遺伝子の遺伝子重複である。独立に作成した3株の DTEP 細胞の MET tyrosine kinase 遺伝子座のコピー数をリアルタイム PCR で確認したところ、どの DTEP 細胞株でも遺伝子重複は起きていなかった。(図2)

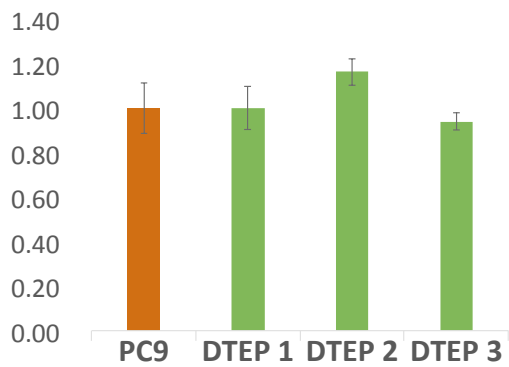


図2 MET tyrosine kinase 遺伝子のコピー数

また薬剤耐性を獲得する際によく見られる EGFR T790M 変化も確認したところ変異は起きていなかった(図3)。

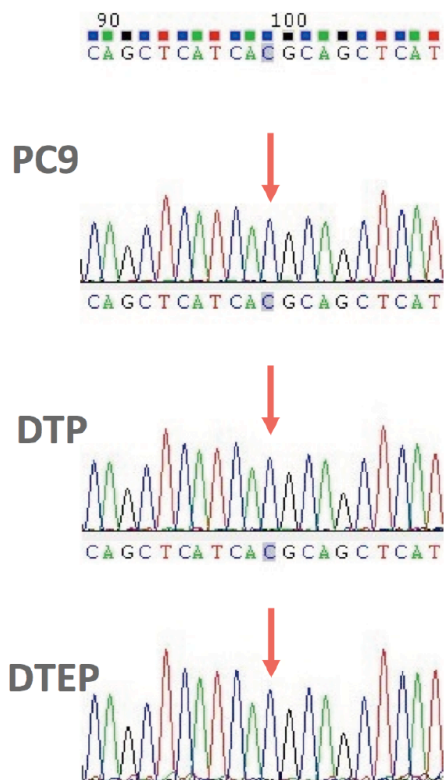


図3 EGFR T790M 変異の有無

(3) PC9、DTP、DTEP 間の RNA-seq による遺伝子発現の変化の解析において、mRNA の発現変化と共に、mRNA と total RNA 間の発現比に違いがある遺伝子を解析したところ、表1に

示すように多くの ncRNA 候補があがった。

表1 細胞間の発現で mRNA と total RNA の発現の比に大きな差があった遺伝子(発現値は FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped))。

| Gene | Direct annotation | Poly(A) RNA | | | Total RNA | | |
|--------------------------------|--|-------------|---------|---------|-----------|---------|---------|
| | | PC9 | DTEP | DTP | PC9 | DTEP | DTP |
| 1 | Critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells | 221.895 | 327.205 | 76.627 | 746.628 | 1190.22 | 1591.8 |
| 2 | Regulation of gene expression by genetic imprinting | 0.16373 | 0.16382 | 0.234 | 172.207 | 20.334 | 261.905 |
| 3 | Endonuclease activity | 0 | 0 | 145.002 | 1342.43 | 1367.29 | 2433.13 |
| 4 | Small nuclear RNA host gene | 425.294 | 482.955 | 448.812 | 1324.84 | 1281.58 | 1158.36 |
| 5 | Involved in maintaining pluripotency in ESCs | 336.791 | 140.434 | 191.222 | 1804.36 | 2008.11 | 2379.96 |
| 6 | Responds to chemical stressors (cisplatin, cycloheximide, and mercury (II) oxide) in HeLa Tet-off cells | 318.999 | 174.341 | 193.017 | 553.227 | 106.087 | 316.545 |
| 7 | 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNA | 0 | 0 | 0 | 450.034 | 507.002 | 597.455 |
| 8 | Template for synthesis of G-rich strand of telomere | 0.117672 | 0 | 0.15141 | 329.265 | 993.099 | 356.298 |
| 9 | DNA activity, regulation of cell proliferation | 0.44889 | 0 | 0 | 256.13 | 329.158 | 538.325 |
| 10 | Post-transcriptional regulation in multicellular organisms | 0 | 0 | 0 | 256.13 | 329.158 | 538.325 |
| 11 | Testis expressed | 0 | 0 | 0.03942 | 0 | 0 | 0.36561 |
| 12 | Component of the signal recognition particle (SRP) that mediates co-translational insertion of secretory proteins in endoplasmic reticulum | 0.1769 | 0.56141 | 0 | 1807.33 | 2106.02 | 1574.75 |
| 13 | Guides the modification of spliceosomal RNAs | 0.09483 | 0.0682 | 0 | 291.955 | 272.151 | 344.749 |
| 14 | Novel lincRNA, unknown function | 0 | 0 | 0.02077 | 102.676 | 188.564 | 100.772 |
| Long intergenic non-coding RNA | Novel lincRNA, unknown function | 0 | 0 | 0.03087 | 100.301 | 101.263 | 119.836 |

(4) 独立に作成した再び薬剤感受性になった細胞株(DTEP-r)においてがんの進行に係わる遺伝子や ncRNA の発現をリアルタイム PCR により解析したところ、DTEP-r 細胞株ではその発現がオリジナルの PC9 と同程度となっていることが確認された。特に MALAT1 などががんの悪性度と相関があると言われている ncRNA に関して DTEP-r では PC9 と同程度にその発現が低下していた(図4)。

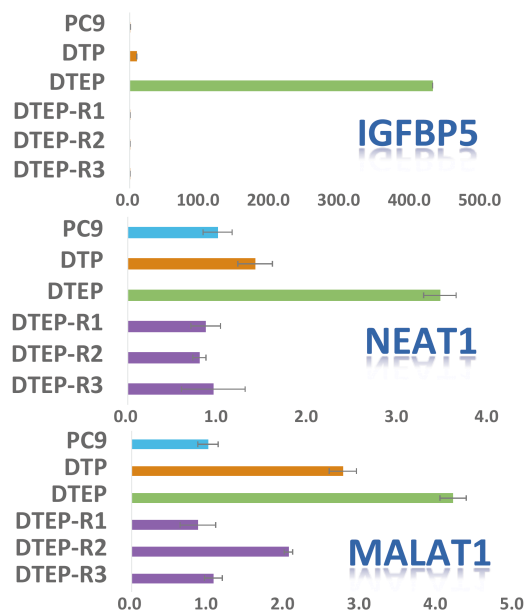


図4 細胞間におけるリアルタイム PCR による遺伝子発現差

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ly Le、近藤伸二、加藤英政、鈴木穰、菅沼成文、清澤秀孔：薬剤耐性を獲得した腫瘍培養細胞のトランスクリプトーム解析、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2014 年 11 月 25-27 日。
- ② Ly Le、近藤伸二、加藤英政、鈴木穰、菅沼成文、清澤秀孔、薬剤耐性を獲得した腫瘍培養細胞のトランスクリプトーム解析、第 16 回日本 RNA 学会、ウイנקあいち、名古屋、2014 年 7 月 23-25 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA, Hidenori)

高知大学・医学部・特任准教授

研究者番号：30295422

(2) 研究分担者

近藤 伸二 (KONDO, Shinji)

大学共同利用機関法人情報・システム研究機構 (新領域融合研究センター)・特任准教授

研究者番号：30415161

加藤 英政 (KATO, Hidemasa)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：50292123