

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430146

研究課題名(和文) 網羅的 RNAi スクリーニングを用いた食道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 esophageal cancer

研究代表者

荒川 泰弘 (Arakawa, Yasuhiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80349547

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)：ヒト遺伝子を対象としたshRNAを発現するウィルスベクターライブラリーを用いて、発現の抑制が食道癌細胞株に抗癌剤感受性の変化をもたらす遺伝子を探索した。Positive selectionとしてライブラリーを導入した食道癌細胞(KYSE170株)にシスプラチンを投与し、耐性亜株で発現が抑制されている遺伝子を特定した。Negative selectionとしてライブラリーを導入した食道癌細胞を2つに分け、片方にシスプラチンを投与した後増減したshRNA配列を比較した。ヌクレオチド除去修復やヒストン修飾に関わる遺伝子の抑制はシスプラチン感受性を高めることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored genes whose knockdown promotes esophageal cancer cells increased sensitivity or resistance to anticancer drugs using genome-wide RNA interference screening. First, we performed positive-selection screening. We infected esophageal cancer cells (KYSE170) with shRNA pool and then treated cells with cisplatin. We obtained a dozen sublines from KYSE170 that were resistant to cisplatin. We identified genes whose inhibition rendered esophageal cells resistant to cisplatin. Next, we performed negative-selection screening. We divided shRNA-infected KYSE170 cells into two groups and administered cisplatin to one group. Then we compared the abundance of each shRNA. We found that the inhibition of genes involved in nucleotide excision repair and histone modification increased cisplatin sensitivity of esophageal cancer cells.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：食道癌 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

食道癌周術期や放射線治療と併用する化学療法として、5-フルオロウラシルにシスプラチンを加えた FP 療法が一般的に行われている。しかし、食道癌根治治療後の再発率は依然として高い。標準化学療法とされている FP 療法に約半数の患者が自然耐性であることから、治療効果は不十分である。また、無効の患者にも化学療法が行わ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。

多数の基礎研究やトランスレーショナルリサーチが行われているにも関わらず、臨床における化学療法の効果予測や薬剤選択に有用なマーカーは非常に少ない。従来、抗癌剤の効果や有害事象を予測することを目的として、薬剤代謝酵素やトランスポーターの遺伝子多型が研究されてきた。さらに近年、DNA 修復に関わる遺伝子の多型がシスプラチンを含むプラチナ製剤の治療効果、有害事象発現の予測に有用であると報告されている。ただし、これらの検討は患者が生来持つ性質に焦点をあてており、腫瘍が形成し進行する過程でみられる遺伝子機能の変化は考慮されていない。

癌の分子病理学的な側面から眺めると、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と進展に関わっている。遺伝子変異、増幅、欠失とならんで、プロモーター領域の DNA メチル化にともな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ている。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感受性・耐性とも強く関連することが示唆されている。よって、発現を抑制することにより抗癌剤感受性を変化させる遺伝子の探索は重要な情報をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 食道癌細胞において、発現抑制が抗癌剤感受性変化をもたらす遺伝子のスクリーニング

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) は、任意の遺伝子の発現を抑制して、その影響を検討するための技術として広く利用されている。さらに近年、ヒト遺伝子を網羅的に発現抑制することが可能なライブラリーの構築がなされている。ヒト遺伝子を網羅的にノックダウンすることを目的とした shRNA 発現レンチウイルスプールを食道癌細胞株に導入して、抗癌剤感受性の変化をもたらす遺伝子を選別する。

- (2) 標的遺伝子発現抑制と抗癌剤感受性の関連を検討

スクリーニングで選別された候補遺伝子について、各々の発現を抑制することによって抗癌剤感受性が変化するかどうかを確認する。また候補遺伝子のうち、過去の文献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抗癌剤感受性との関連を考察する。さらに、抗癌剤感受性に影響をもたらす候補遺伝子のリストから、特定の機能が集中して現れる遺伝子セットを機能グループ解析により明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) snRNA 発現レンチウイルスライブラリーの食道癌細胞株への導入

プール型レンチウイルス shRNA ライブラリー (Decipher Lentiviral shRNA Library 27k) を食道癌細胞株である KYSE-30, KYSE-70, KYSE-170 株に導入し、安定発現細胞をピューロマイシン投与により選別した。レンチウイルスの導入効率やクローニングの簡便さから、以降 KYSE-170 株を主に使用して実験を進めた。

- (2) 抗癌剤耐性株の選別 (positive selection)

shRNA 安定発現細胞をシスプラチンの存在下で 72 時間培養したのち、抗癌剤耐性細胞をクローニングした。各クローンよりゲノム DNA を抽出し、PCR で各 shRNA 配列に特異的なバーコード配列を増幅してシーケンスした。

- (3) 発現抑制が抗癌剤感受性をもたらす遺伝子の選別 (negative selection)

レンチウイルスライブラリーを導入した KYSE-170 株を、抗癌剤を投与する実験用サンプルと投与しない対象サンプルに分け、実験用サンプルにシスプラチンを投与した後、実験用サンプルと対象サンプルの両者からゲノム DNA を抽出した。ゲノム中に挿入された各 shRNA 配列に特異的なバーコード配列を PCR にて増幅し、次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行なった。シスプラチン投与により増減したバーコード配列を対象サンプルと比較することで発現抑制がシスプラチン感受性をもたらす遺伝子を同定した。

- (4) スクリーニングで選別された遺伝子の発現抑制と抗癌剤感受性との関連

両スクリーニング (positive selection, negative selection) で選別された遺伝子の発現抑制が実際に抗

癌剤感受性の変化をもたらすか確認するため、shRNA がターゲットとしている遺伝子に対して RNAi をひきおこす二本鎖 RNA を作成した。ヒト遺伝子に相同配列のないネガティブコントロールの二本鎖 RNA を導入した KYSE-170 細胞とターゲット遺伝子に対する二本鎖 RNA を導入した細胞のシスプラチン感受性を比較検討した。さらに、選別された遺伝子を抑制した細胞でシスプラチン投与による細胞周期停止やアポトーシス導入の状態に変化があるか、フローサイトメータで解析した。

4. 研究成果

(1) Positive selection

snRNA 発現レンチウイルスライブラリー導入食道癌細胞 KYSE-170 にシスプラチン 10 µg/mL、72 時間投与し耐性細胞をクローニングした。shRNA のターゲットとなっている遺伝子が実際に発現抑制されていることを確認した。別途作製した二本鎖 RNA、もしくは shRNA 発現ベクターの導入によりシスプラチン耐性がもたらされる遺伝子を抽出した。

(2) Negative selection

ライブラリー導入食道癌細胞をシスプラチン投与する実験用サンプルと投与しない対象サンプルに分け、シスプラチン投与により増減したバーコード配列を次世代シーケンサーで比較した。発現抑制がシスプラチン感受性を大きく変化した遺伝子には、過去の文献情報などにより予測されていたヌクレオチド除去修復に関わる遺伝子が含まれており、実験系の妥当性が確認された。加えてヒストン脱アセチル化酵素やヒストンメチルトランスフェラーゼなどヒストン修飾に関わる遺伝子が複数個重複して抽出された。

ヒストン修飾に関わる遺伝子の抑制がシスプラチン感受性を高める可能性が示唆されたため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である vorinostat や trichostatin A の併用が食道癌細胞のシスプラチン感受性を変化させるか検討した。食道癌細胞株 (KYSE-30, KYSE-70, KYSE-170) を低濃度の vorinostat もしくは trichostatin A で前処置すると、シスプラチンの感受性が増加することが示された。さらにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とシスプラチンの併用は食道癌細胞株に相乗効果をもたらすことが示された。

(3) 本研究では、ヒト遺伝子を網羅する shRNA 発現ウィルスベクタープールを高効率かつレパートリーを保持した状態で食道癌細胞株に導入し、薬剤感受性に変化を与える遺伝子のスクリーニングを行なった。ヒトゲノム全塩基配列が利用可能となった現在、ターゲットとなる遺伝子配列を狙って表現型を得る方法として RNA 干渉は格好のツールとなっており、網羅的 RNAi スクリーニングは抗癌剤感受性変化という特定の表現型に影響する遺伝子群の探索に有用であった。さらに、ヒストン修飾に関わる遺伝子の抑制がシスプラチン感受性を高めるという結果より、合理的な薬剤併用のレジメンが確立できる可能性を示すことができた。

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6件)

- (1) Antimyeloma activity of bromodomain inhibitors on the human myeloma cell line U266 by downregulation of MYCL. Suzuki K, Yamamoto K, Arakawa Y, Yamada H, Aiba K, Kitagawa M. *Anticancer Drugs*. 2016 Sep;27(8):756-65. doi: 10.1097/CAD.0000000000000389. 査読あり
- (2) Early Response of Esophageal Cancer to Neoadjuvant Chemotherapy with Docetaxel-Cisplatin-5-Fluorouracil Represents Sensitivity: A Phase II Study. Matsumoto A, Nishikawa K, Yuda M, Tanaka Y, Tanishima Y, Arakawa Y, Ishibashi Y, Sakuyama T, Omura N, Mitsumori N, Aiba K, Yanaga K. *Anticancer Res*. 2016 Apr;36(4):1937-42. <http://ar.iiarjournals.org/content/36/4/1937.long> 査読あり
- (3) Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohya W, Yokoi K, Arakawa Y, Takita J, Suzuki H, Yamada H. *Int J Hematol*. 2015 Dec;102(6):723-8. doi: 10.1007/s12185-015-1892-z. 査読あり
- (4) Early measurement of urinary N-acetyl- β -glucosaminidase helps predict severe hyponatremia associated with

cisplatin-containing chemotherapy.
Arakawa Y, Tamura M, Sakuyama T,
Aiba K, Eto S, Yuda M, Tanaka Y,
Matsumoto A, Nishikawa K. J Infect
Chemother. 2015 Jul;21(7):502-6.
doi: 10.1016/j.jiac.2015.03.008.
査読あり

- (5) 荒川泰弘 I型トポイソメラーゼ阻害剤
系統別抗がん剤の副作用 抗がん剤
の副作用と支持療法 より適切な抗
がん剤の安全使用をめざして 日本
臨床増刊号 2015;1073:174-177. 査
読なし
- (6) 荒川泰弘 悪性腫瘍(固形癌)とDIC
(特集 DIC:病態に基づいた治療)
成人病と生活習慣病
2014;44(8):933-936. 査読なし

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、腫瘍・血液内科、講
師
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：

(4) 研究協力者

()