

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26461019
研究課題名(和文) 新規の遺伝子網羅的解析法による肝細胞癌分子標的薬に対する薬剤耐性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Comprehensive screening of genes resistant to Sorafenib in Hepatocellular carcinoma

研究代表者
阿部 雄太 (Abe, Yuta)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70327526
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：各細胞株のTTCを作成した。MTT assay法により薬剤指摘濃度を確認した後に樹立したTTCを用いてソラフェニブを添加した。その結果HepG2については約10種類、PLC/PRF/5については約20種類のコロニーがピックアップされた。ゲノムDNAを抽出しソラフェニブ耐性遺伝子の候補遺伝子を同定することが可能であった。DNAを抽出し、トランスポゾンにより挿入された箇所を制限酵素処理にて切り出しDNAを増幅させ、その塩基配列を同定し、遺伝子を同定した。複数の耐性コロニーに共通して出現している遺伝子が幾つか同定され、これが投与薬剤に対する耐性遺伝子候補としてピックアップされた。

研究成果の概要(英文)：We used a novel method involving transposons to screen and identify drug-resistant genes. Transposons are DNA sequences that move from one location on the gene to another. A modified piggyBac transposon was designed as an insertion mutagen, and a cytomegalovirus (CMV) promoter sequence was added to induce strong transcription. When the transposon is inserted to the upstream of a certain gene, the gene will be overexpressed while when inserted down or intragenically, it will be downregulated. After establishing a transposon-tagged cell library, we treated cell lines derived from Hepatocellular carcinoma. We performed splinkerette PCR and TOPO cloning on the resistant colonies. Bacterial colonies were sequenced, and next-generation sequencing was used to identify the overexpressed/downregulated sequences as candidate genes for Sorafenib resistance. We identified several candidate genes from 30 resistant colonies.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 化学療法 ソラフェニブ

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の治療法として近年まで進行期の肝細胞癌の全身化学療法は従来の抗癌剤では標準的な治療ではなかった。これは肝細胞で過剰発現する多剤耐性因子やP糖蛋白遺伝子などが薬剤耐性の一因であり、肝障害などにより化学療法が十分な量で行えなかったことが原因である。肝細胞癌は決定的な治療標的分子が未同定である一方、腎細胞がんと同様に栄養血管に富み、また動脈塞栓術が有効な治療であることなどから腫瘍血管を標的として薬剤の開発が進んだ。進行期の肝細胞癌に対する全身化学療法で最初に全生存期間の延長を示した薬剤はソラフェニブだけである。しかし、その治療予測マーカーや耐性のメカニズムは解明されていない。そこで我々は、肝細胞癌における薬物耐性遺伝子を同定するために、以下に示すトランスポゾンという全く新しい手法を用いることとした。トランスポゾンとは、ゲノム上を完全にランダムに移動(transposition)できる塩基配列であり、両側の回文構造の間に自分自身を切り出し(=カット)、ゲノム上のランダムな位置に挿入(=ペースト)する働きを持つトランスポゼースという酵素を併せ持っている。1940年にBarbara McClintockがトランスポゾンの転移によってトウモロコシの実に斑を生じることを発見し、その後Sleeping Beauty(魚類)、piggyBac(昆虫)などのトランスポゾンが発見され、これらはヒトやマウスの細胞でも機能することが示された。我々の共同研究者であるMassachusetts General HospitalのDr. Chenらは、このトランスポゾンから2つのプラスミドを作製した。1つはトランスポゾンの回文構造間に転写活性因子であるCMVプロモータとピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミド(pPB-SB-CMV-puro-SD)でありもう1つはトランスポゼースを発現ベクターへ組み込んだプラスミドである。これらプラスミドを細胞に導入することで、CMVプロモータをゲノム上のランダムな位置に「カット&ペースト」し、一つ一つの細胞がランダムな遺伝子を高発現する「細胞プール」を得ることができる。仮に1000万個の細胞にこのトランスポゾンを導入すれば、10000万通りのペーストのされ方があり、遺伝子発現も1000万通りとなる。Dr.Chenの試算によれば、CMVプロモータが約50Kbpをカバーすることが可能であることを考慮すると、全ゲノムを網羅することが可能となる。このトランスポゾンを導入した細胞(transposon tagged cell : TTC)に薬剤投与を行い、薬剤耐性コロニーを形成した場合、その細胞が高発現している遺伝子が投与薬剤に対する耐性遺伝子である可能性が考えられる。また、複数のコロニーで同一の遺伝子発現が増強されていれば、その遺伝子が薬剤耐性遺伝子である可能性はさらに高まる。

そこで我々はこのトランスポゾンの手法を用いて、複数の肝細胞癌細胞株およびソラフェニブを用いて肝細胞癌薬剤耐性に関する遺伝子の同定を図ることとした。トランスポゾンを用いた本研究はヒトゲノム上の全遺伝子を網羅可能であり、さらにソラフェニブ投与により得られた耐性株で高発現している遺伝子を同定するという点からも妥当性・確実性の高い研究であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、我々独自の全く新しい、トランスポゾンを利用した薬剤耐性遺伝子スクリーニング法を用いて、肝細胞癌細胞株における薬剤耐性遺伝子の同定を試みることを目的とする。本システムを用いることで、ヒトゲノム上に存在する全ての遺伝子を網羅的に対象としたスクリーニングが可能であり、しかも「任意の肝細胞癌細胞株」と「任意の薬剤」を用いて薬剤耐性に寄与すると考えられる遺伝子の検索が可能となる。

本研究において明らかにすべき事項は以下の点である

- (1) Transposon tagged cell の樹立
- (2) 薬剤耐性株の獲得
- (3) 薬剤耐性遺伝子の同定
- (4) 同定した薬剤耐性遺伝子の過剰発現株作製と薬剤耐性の評価
- (5) 臨床検体における遺伝子発現状況と薬剤耐性との相関の評価

前述の通り、各細胞へトランスポゾンをを用いて、CMVプロモータとピューロマイシン耐性遺伝子を導入し、ピューロマイシンによるセクションをかけることで、細胞一つ一つにおいてCMVプロモータがゲノム上のランダムな位置に挿入された細胞プールである、transposon tagged cell (TTC)を樹立する。このTTCに対して各種薬剤を用いて耐性株を作成し、遺伝子を同定する。その後同定した薬剤耐性遺伝子の発現ベクターを作成し、これを各種乳癌細胞へ導入することで高発現株を作製し、MTT assay法を用いてコントロールと比較し、薬剤耐性化が生じるか否かの評価を行う。

3. 研究の方法

- (1) Transposon tagged cell の樹立
酵素であるトランスポゼースが、トランスポゾン導入に必須であることを確認するため、酵素のあり・なしでピューロマイシンによるセクションを行った。

各細胞株においてピューロマイシンによる最小殺細胞濃度を測定し、これに従ってchemical transfection法によりトランスポゾンおよびトランスポゼースの両者を細胞株に導入後、ピューロマイシンを添加した。これにより、CMVプロモータおよびピューロマイシン耐性遺伝子がゲノム上に加えられた細胞のみが生き残ることができると考え

られる。これを transposon tagged cell (TTC) として以降の実験に使用した。

具体的に本システムに適用する細胞株は以下の通りである。肝細胞癌細胞株に加え、放射線耐性食道癌細胞株も同教室内で並行して行った(薬剤、放射線照射などは各癌腫による)。HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, TE-4, TE-15 食道癌細胞

(2) 薬剤耐性コロニーの樹立(肝細胞癌)

各種細胞株において、ソラフェニブに対する最小殺細胞濃度を MTT assay によって測定した。これを前述した TTC に適用し、single cell からコロニー形成を認めるところでピックアップし、培養を行った。これらは各種薬剤耐性株と考えられ、一部を凍結。一部を以降の研究に使用した。

本研究では、薬剤のみならず放射線耐性についてもこのシステムが適用できるか否かを検討するため、放射線耐性を食道癌細胞を用いて TTC 樹立を行った。

(3) 薬剤耐性遺伝子の同定

耐性コロニーをピックアップして、単離培養した後、ゲノム DNA を抽出して、トランスポゾンにより CMV プロモータが挿入された箇所を制限酵素にて切り出す。切断部位にリンカーを合成し、Splinkerette PCR を行って同部位の DNA を増幅し、TOPO クローニング法を用いてプラスミドベクターへクローニングを行う。これを鋳型として、シーケンスにより増幅した DNA の塩基配列を同定し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて遺伝子を同定する。

4. 研究成果

前述した細胞株に対して、TTC を作成した。すなわちそれぞれの細胞株ゲノム上のランダムな位置に CMV のプロモータ領域と抗生剤であるピューロマイシンの耐性遺伝子を導入した。我々は酵素であるトランスポゼースが、トランスポゾン導入に必須であることを確認するため、酵素のあり・なしでピューロマイシンによるセレクションを行った。その結果、前述のトランスポゾンがコードされたプラスミド (pPB-SB-CMV-puro-SD) のみの導入で、酵素を導入しなかった細胞株では、ピューロマイシンにより全滅したが、トランスポゼースを同時に導入した細胞株ではコロニー形成が認められた。この pPB-SB-CMV-puro-SD とトランスポゼースの double transfection を、細胞数 1000 万個というラージスケールで複数回行うことで、全ゲノムを網羅した TTC の樹立を行った。

我々まず予定していた各種肝細胞癌細胞株において、TTC 1 プールずつ樹立を試みたが、HepG2, PLC/PRF/5 にて成功したが Hep3B については樹立に至らなかった。MTT assay 法により薬剤指摘濃度を確認した後に樹立した TTC を用いてソラフェニブを添加した。その結果

は HepG2 については約 10 種類、PLC/PRF/5 に

ついては約 20 種類のコロニーがピックアップ可能であった。これに対して、ゲノム DNA を抽出し、前述の方法にてソラフェニブ耐性遺伝子の候補遺伝子を同定することが可能であった。

耐性コロニーを単離培養したあと DNA を抽出し、トランスポゾンにより挿入された箇所を制限酵素処理にて切り出し、Splinkerette PCR にて DNA を増幅させ、プラスミドベクターを用いて大腸菌内で更に増幅させた。続いて増幅した DNA の塩基配列を同定し、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて遺伝子を同定した。複数の耐性コロニーに共通して出現している遺伝子が幾つか同定され、これが投与薬剤に対する耐性遺伝子候補としてピックアップされた。同定した薬剤耐性遺伝子の選定は NEXTBIO RESEARCH 社の NextBio database system を用いて行う。本システムを用いて候補遺伝子の発現と対象薬剤を用いた臨床試験の結果を対比し、膨大な遺伝子リストから次の実験を行う遺伝子を選定する予定である。放射線耐性については、食道癌細胞株である TE-5, TE-15 を用いて研究を行った。これらに対する TTC を作成した後に、一定量の放射線照射を行い、耐性株を作成した。これらから耐性候補遺伝子の一つとして、MT-C01 のノックアウトが同定された。実際に MT-C01 ノックアウト細胞に対して放射線照射を行ったところ、細胞死の抑制と早期の増殖能力回復が認められた。これら放射線耐性は、アポトーシスに関わる caspase cascade の活性阻害を通じて生じることを解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件 査読あり)

1) Tsutsui M, Kawakubo H, Hayashida T, Fukuda K, Nakamura R, Takahashi T, Wada N, Saikawa Y, Omori T, Takeuchi H, Kitagawa Y. Comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015 Sep;47(3):867-74. doi: 10.3892/ijo.2015.3085.

〔学会発表〕(計 2 件)

1) 筒井麻衣、林田 哲トランスポゾンを用いた薬剤耐性遺伝子の網羅的解析法、第 22 回日本眼点医学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日~12 日、ホテルブエナビスタ(長野県松本市)

2) 林田 哲、トランスポゾンによる薬剤・放射線耐性遺伝子の新規網羅的解析法とその運用、第 49 回制癌剤適応研究会、2016 年 3 月 25 日、会津東山温泉御宿東風(福島県会津若松市)

〔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 阿部雄太

(Abe, Yuta)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70327526

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 林田哲

(Hayashida, Tetsu)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80327543

(4) 研究協力者

()