

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462028

研究課題名(和文)レトロポソンの制御によるがん治療開発

研究課題名(英文)Development of anti-cancer therapy by control of transposon

研究代表者

川上 和之(Kawakami, Kazuyuki)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00293358

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)：ヒトレトロポソンのLINE-1発現を抑制することで癌細胞の増殖が抑制された。LINE-1の局在はstress granuleにあることから、癌増殖抑制のメカニズムとしてmicroRNA発現性変化が示唆されたが、microRNAの発現性自体はLINE-1抑制による癌細胞増殖阻害に関係は無かった。一方、LINE-1 ORF2にコードされる逆転写酵素の阻害では癌細胞の増殖は抑制されず、治療ターゲットとしてLINE-1 ORF1蛋白の可能性を検証してゆく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Growth of colorectal cancer cell lines are inhibited by suppression of LINE-1. LINE-1 was located in stress granule, suggesting that microRNA expression is involved in the mechanism by which knockdown of LINE-1 inhibit cancer growth. However, further experiment shows no evidence that the microRNA expression is involved in the association between knockdown of LINE-1 and inhibiting cancer growth. Further experiment is needed for controlling LINE-1 ORF1 expression as a molecular target of cancer therapy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：レトロポゾン 抗がん剤 大腸がん

1. 研究開始当初の背景

レトロポゾン(RETROPOSON)はゲノム上を転位する機能をもつ配列であるトランスポソンの1種で、転写と逆転写(DNA→RNA→cDNA)を経てコピーアンドペースト機構により転位する。人における主要なレトロポゾン配列であるLINE-1は進化の過程でコピーアンドペースト機構によりそのコピー数を増大させてきたと考えられる。実際、ゲノムの約18%がLINE-1由来の配列であることがゲノムシーケンスプロジェクトにより解明された。LINE-1由来配列の多くは欠失や変異により転位能を失っているが、約6kbの完全長LINE-1は転位機能を保持している。LINE-1の活性化・転位促進はゲノムの不安定性に帰結するため、プロモーター領域のDNAメチル化や相補的2重鎖RNAの発現など複数の機構によりLINE-1の発現は抑制されている。申請者はDNAメチル化マーカーの探索研究においてLINE-1プロモーター領域のDNAメチル化を含め、多数の遺伝子DNAメチル化を解析してきた。その結果、LINE-1メチル化が大腸がんの予後や、経口フッ化ピリミジン系抗癌剤を用いた術後補助化学療法の効果予測する因子となることを発見した。さらに、予後や抗癌剤感受性と関連するメカニズムを解析する過程で、LINE-1の発現をRNA干渉により抑制するとがん細胞の増殖が抑制されること、脱メチル化剤によりLINE-1の発現を亢進させるとDNA切断による細胞障害性が亢進すること、を観察してきた。この2つの現象は相反する処置(LINE-1の抑制と亢進)がいずれもがん細胞の生存にとって不利に働くことを示唆している。これらの研究成果とLINE-1の持つゲノム構造改変機能に着目し、2つのがん治療戦略を想定した。すなわち、LINE-1を高発現する大腸がんに対しては、その発現抑制により細胞増殖を抑制すると同時にゲノムの構造改変能力を奪うことで癌の悪性化や抗がん剤耐性獲得能力を抑制できると考えた(LINE-1抑制戦略)。一方、LINE-1の低発現がんではその発現を亢進させることによりDNA障害性の細胞死を誘導できると考えた(LINE-1機能亢進戦略)。

2. 研究の目的

これまではヒト進化の名残である化石配列と考えられてきたLINE-1が一部の大腸がんが発現しているとの成果に基づき、LINE-1の機能を利用したがん治療を開発する。LINE-1は正常細胞で発現抑制されていることから、LINE-1を利用した治療法はがん特異的で有害事象の少ない治療法として期待できる。

3. 研究の方法

(1) RNA干渉を用いたLINE-1発現抑制と癌細胞増殖抑制メカニズムの解析

RNA干渉を用いてLINE-1の発現を抑制し、MTTアッセイ、コロニー形成アッセイにより細胞増殖抑制効果を解析する。癌細胞増殖抑制メカニズム解析のため、抗LINE-1抗体を用いてLINE-1の局在を解析する。また、同抗体を使用してLINE-1蛋白と複合体を形成する可能性がある蛋白を探索する。

(2) LINE-1発現抑制によるmicroRNA発現性解析

マイクロアレーを用いてLINE-1ノックダウンによるmicroRNA発現性を解析する。発現変化を認めたmicroRNAに関してreal-time RT-PCRおよびNorthern blotting法で発現性の変化を確認する。

(3) 既存の逆転写酵素阻害剤を用いたLINE-1機能抑制と癌細胞増殖抑制能の解析

LINE-1にコードされる逆転写酵素はHIVウイルスにコードされる逆転写酵素と相同性が高く、HIV治療薬として開発された複数の薬剤はLINE-1の逆転写酵素活性阻害剤としても利用できる。そこで、逆転写酵素阻害性のHIV治療薬を用いてLINE-1を高発現する大腸がん細胞(SW480, Caco2等)を処理し、MTTアッセイ、コロニー形成アッセイにより細胞増殖抑制効果を解析する。

(4) LINE-1の機能抑制因子であるAPOBECファミリー蛋白質の発現制御によるLINE-1機能誘導性の解析

APOBECファミリー蛋白質はLINE-1の転位抑制因子として複数の報告がある。LINE-1を高発現する大腸がんではAPOBECファミリー蛋白質によりLINE-1の転位が抑制され細胞障害から逃れている可能性がある。そこで、大腸がん組織および大腸がん細胞におけるAPOBECファミリー蛋白質の発現をRT-PCR、Western blottingで解析する。APOBECファミリー蛋白質が高発現する培養がん細胞があれば、RNA干渉を用いた抑制によりDNA切断や細胞増殖抑制効果が出現するかをリン酸化ヒストンH2A.Xの検出、MTTアッセイ、コロニー形成アッセイにより解析する。

4. 研究成果

(1) RNA干渉を用いたLINE-1発現抑制と癌細胞増殖抑制メカニズムの解析

LINE-1を高発現する大腸癌培養細胞、SW480およびCaco2をLINE-1 mRNAに対するsiRNAにより処理し、LINE-1の発現をノックダウンさせた。LINE-1発現の抑制により、いずれのがん細胞も増殖が抑制された。LINE-1 ORF1蛋白に対する多クローン抗体を作成し、その局在を確認したところ、stress granuleと呼ばれる細胞質内の顆粒状構造に局在を認め、

siRNA によるノックダウンにより stress granule への局在も消失した。

stress granule には micro RNA の代謝に関わる複数の蛋白成分が局在しており、LINE-1 の発現抑制によりこれらの蛋白発現が抑制された。LINE-1 ORF1 に対する抗体を用いた免疫沈降では、LINE-1 ORF1 と共沈する蛋白の存在が示唆され、正常細胞では通常発現しない LINE-1 ORF1 蛋白と複合体を形成する複数の蛋白が存在する可能性がある。これらの蛋白が癌細胞の増殖に関与するのか、あるいは LINE-1 抑制を介した癌治療に有用なターゲットになるかを今後検証してゆく必要がある。

(2) LINE-1 発現抑制による microRNA 発現性解析

上記の解析で LINE-1 蛋白が局在することが判明した Stress granule は micro RNA の機能に関与することが示唆されているため、LINE-1 ノックダウンによる micro RNA の発現変化をマイクロアレーを用いて解析した。その結果、複数の micro RNA に発現の変化を認め、その一部は癌遺伝子や癌抑制遺伝子の調節に関与することが報告されているものであった。

LINE-1 ノックダウンによる micro RNA の発現変化を、real-time RT-PCR および Northern blotting で確認したところ、いずれの解析法でも 2 倍以上の発現増加や減少を認め、かつ LINE-1 を高発現する大腸がん培養細胞、SW480 と Caco2 で共通した変化として 3 配列の micro RNA が候補として選択された。このうち LINE-1 ノックダウンにより発現増加を認めた 2 配列の micro RNA を化学合成し、SW480 と Caco2 へトランスフェクション処理した。micro RNA のトランスフェクションによる細胞増殖の変化を MTT assay で解析したが、がん細胞の増殖能に変化を認めなかった。残り 1 配列の micro RNA は LINE-1 ノックダウンにより発現低下を認めたため、当該 micro RNA に対する siRNA を合成しノックダウンによる変化を解析した。その結果、当該 micro RNA のノックダウンにより SW480 と Caco2 のいずれも増殖が抑制された。しかし、当該 micro RNA と LINE-1 の同時ノックダウンによる解析からは、当該 micro RNA の発現性自体は LINE-1 抑制による癌細胞増殖阻害に関係はなく、LINE-1 制御による癌治療開発には有用なメカニズムでないと結論された。

(3) 既存の逆転写酵素阻害剤を用いた LINE-1 機能抑制と癌細胞増殖抑制能の解析

核酸アナログや非核酸アナログの逆転写阻害剤を複数用いて、大腸癌培養細胞の増殖抑制能を解析した。その結果、いずれの薬剤でも生理的濃度の逆転写阻害剤ではがん細胞の増殖は抑制されなかった。高濃度の薬剤暴

露では細胞増殖が抑制されたが、LINE-1 高発現細胞である SW480、Caco2 と LINE-1 低発現細胞である HCT116、CaR-1 との間に細胞増殖抑制の差異は認めなかった。

この結果から LINE-1 ORF2 にコードされる逆転写酵素の阻害は癌治療のターゲットにはなりにくいと考えられた。一方、LINE-1 がコードする 2 つの蛋白のうち ORF1 蛋白を癌治療のターゲットとして制御する有用性に関しては今後さらに解析を進める必要がある。**(4) LINE-1 の機能抑制因子である APOBEC ファミリー蛋白質の発現制御による LINE-1 機能誘導性の解析**

APOBEC の発現性が LINE-1 の機能に関与しているのかを確認する目的で、LINE-1 高発現細胞である SW480、Caco2 と LINE-1 低発現細胞である HCT116、CaR-1 での APOBEC 発現性を解析した。APOBEC1, 2, 3A, 3B, 3C, 3F, 3G, 3H mRNA の発現性を real-time RT-PCR で解析したが、LINE-1 高発現と低発現細胞間で APOBEC の発現性に相違は認められなかった。この結果から、APOBEC 蛋白の機能抑制を介した癌治療戦略に関しては短期間での成果は期待できないと判断しこれ以上の解析は中止した。

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 3 件)

KRAS mutation analysis of single circulating tumor cells from patients with metastatic colorectal cancer.

Kondo Y, Hayashi K, Kawakami K, Miwa Y, Hayashi H, Yamamoto M.

BMC Cancer. 17(1):311, 2017. doi:

10.1186/s12885-017-3305-6. 査読有

Phase II study of bevacizumab and irinotecan as second-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer previously treated with fluoropyrimidines, oxaliplatin, and bevacizumab.

Kuramochi H, Ando M, Itabashi M, Nakajima G, Kawakami K, Hamano M, Hirai E, Yokomizo H, Okuyama R, Araidai T, Yoshimatsu K, Kameoka S, Hayashi K.

Cancer Chemother Pharmacol. 79(3):579-585, 2017. doi: 10.1007/s00280-017-3255-3.

査読有

消化器がん化学療法の最先端：大腸癌。

川上和之, 林和彦.

医学と薬学. 71:340-343, 2014. 査読無

[学会発表](計 2 件)

A phase II study of bevacizumab and irinotecan as second-line therapy for

patients with metastatic colorectal cancer previously treated with fluoropyrimidine, oxaliplatin, and bevacizumab.

Nakajima G, Kuramochi H, Ando M, Itabashi M, Kawakami K, Hamano M, Hirai E, Iino T, Yokomizo H, Okuyama R, Araidai T, Yoshimatsu K, Kameoka S, Hayashi K
American Association of Cancer Research
Annual Meeting 2016, 2016/4/19, New Orleans (U.S.A)

Molecular profiling of single circulating tumor cells of patients with colorectal cancer

Kondo Y, Miwa Y, Kanazawa A, Kinoshita S, Hayashi H, Higashimoto H, Omura M, Nakajima G, Takeshita N, Kawakami K, Hayashi K

第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/8、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上 和之 (KAWAKAMI KAZUYUKI)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00293358