

抗癌剤シスプラチン (CDDP) の感受性に関する遺伝子群の検索

丹沢秀樹¹、鶴澤一弘¹、小河原克訓¹、中村 恵¹、小池博文¹、
加藤久視¹、浜本哲章¹、藤田茂之²、中谷 現²

¹ 千葉大学大学院医学研究院臨床分子生物学

² 和歌山県立医科大学医学部歯科口腔外科学

シスプラチン (CDDP) は、抗癌剤の化学療法の中心的薬剤である。薬剤の副作用はほぼ 100% 近くの患者に出現するが、臨床的効果は必ずしも良好とはいえず、症例によってその効果にばらつきがあり、一部の患者には全く奏効しない (1)。この耐性機構の解明と耐性克服方法の開発を行うために、シスプラチン耐性を規定する遺伝子群の同定を目的とした。

薬剤耐性は図 1 に示すように、単に薬剤を代謝・排泄する機構ばかりではなく、増殖・分裂など多くの細胞の機能に関連している。

CDDP は図 2 に示すように、DNA に結合し、正常な DNA 複製・細胞分裂を妨げることにより抗癌作用を発現する。CDDP 耐性関連因子としては表 1 に示すような因子が報告されているが、未だに、CDDP 感受性・耐性を実際の症例で予測することは困難である。

【CDDP 耐性細胞株の樹立】

2 種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株 (H-1, Sa-3) を独自に樹立した。それら 2 種類の口腔扁平上皮癌由来細胞株の他に KB 細胞をシスプラチン添加培養液で継続して培養し、それぞれ 3 種類の CDDP 耐性細胞株 (H-1R, Sa-3R, KBR) を樹立した。さらに、各親株・耐性株を CDDP で処理し、MTT アッセイをおこない、50% 増殖抑制濃度 (IC50) を増殖曲線から求めた (2)。図 3 に H-1 と H-1R の MTT アッセイの結果を代表例として示す。H-1 と H-1R の相対的な耐性度は約 10 倍、Sa-3 と Sa-3R の相対的な耐性度は約 7.5 倍、KB と KBR の相対的な耐性度は 8.6 倍であった。

これらの 3 種類の細胞株が CDDP 耐性であることを遺伝子学的にも証明するため、薬剤耐性機構のうち、ABC トランスポーター遺伝子の発現状況を RT-PCR 法によって解析した。CDDP 耐性と関連があるといわれる P-糖タンパク質 (MDR1, MRP1, MRP2) について調べたところ、耐性株では 3 種類の P-糖タンパク質すべての強発現が認められた (図 4 にその代表例を示す)。

【独自開発マイクロアレイによる CDDP 感受性・耐性関連遺伝子の検索】

次に、千葉大学大学院医学研究院機能ゲノム学講座と共同開発したマイクロアレイ (3) を用いた解析により、耐性株において 2 倍以上の発現亢進をした遺伝子と 0.5 倍以下の発現減弱が認められた遺伝子を抽出した (表 2-5)。

これらの遺伝子の中から、機能や文献の検索を通じて CDDP 耐性と関係ありそうな遺伝子についてそれぞれの細胞中での発現量を確認した。

我々が開発した口腔疾患診断用マイクロアレイの結果を再確認する結果となった (図 5)。

【臨床検体による CDDP 耐性関連遺伝子検索】

さらに、臨床検体によって抗癌剤の奏効率を予測しえる遺伝子群の検索を行った。特許等の関係で、ここでは印刷中論文で扱った 1 つの遺伝子 Caveolin-1 に絞って記載する。

Caveolin-1 遺伝子は染色体 7q31.1 に存在する新規癌抑制遺伝子である。Caveolin-1 遺伝子の強発現は前立腺癌、食道癌、大腸癌、乳癌などで検出されており (4-9)、Caveolin-1 遺伝子の強発現はこれらの癌の転移や予後との関係が報告されている (9)。しかし、発現レベルと臨床的諸指標との関連は、さまざまに報告され、今ひとつ明確さに欠け、さらに、CDDP 耐性・感受性との関連は報告されていない。

和歌山医科大学医学部歯科口腔外科学講座における臨床サンプルを用いて CDDP の効果と Caveolin-1 タンパク発現状態を比較したところ、表 6 のように有意な相関を認めた。いくつかの同様なマーカーを組み合わせることで、実際の臨床で役に立つ CDDP 感受性・耐性判定法を開発することが実現できることが期待される。

【ヒト全遺伝子搭載マイクロアレイとクラスター解析による CDDP 感受性・耐性関連遺伝子の探索】

独自に樹立した 3 種類の CDDP 耐性細胞株 (H-1R, Sa-3R, KBR) について、Affymetrix 社製 GeneChip™ により耐性株とその親株である感受性株の各遺伝子の発現状態を比較した。図 7 に示すように 3 種類の CDDP 耐性細胞株において共通に強発現を示した遺伝子が 17 種類、共通に発現減弱した遺伝子が 10 種類明らかになった。現在、これらの遺伝子の機能解析を行っている。

さらに、これらの遺伝子発現状態から QT クラスタリング解析を行った。図 8 に示すように、耐性株と感受性株における遺伝子発現の差を 3 種類の細胞種それぞれ

で各軸方向にとると、球状星団のように全ての遺伝子がプロットされる (図 8 左)。それらの遺伝子間の距離が少なく太陽系のように関連を持った群 (クラスター) が 15 種類、図 8 右図の着色群のように検出された。

これらの 15 種類のクラスターを 2 次的に表現したのが図 9 である。

以上のように、基礎解析と臨床解析を組み合わせ、かなり CDDP 感受性・耐性関連遺伝子を絞り込めた。各クラスターや、個々の遺伝子の解析により、ごく近い将来に、実際の臨床に有用な CDDP 感受性・耐性判定法確立が期待できる。

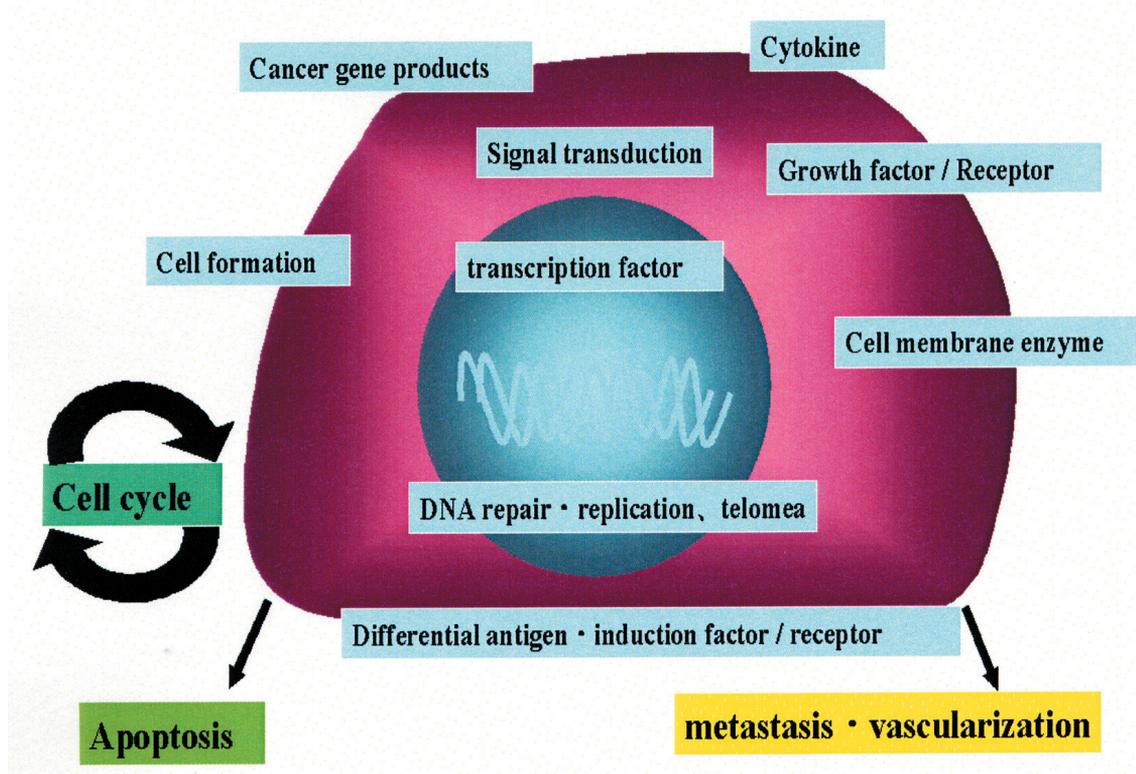


図 1. 薬剤耐性を決定する分子標的

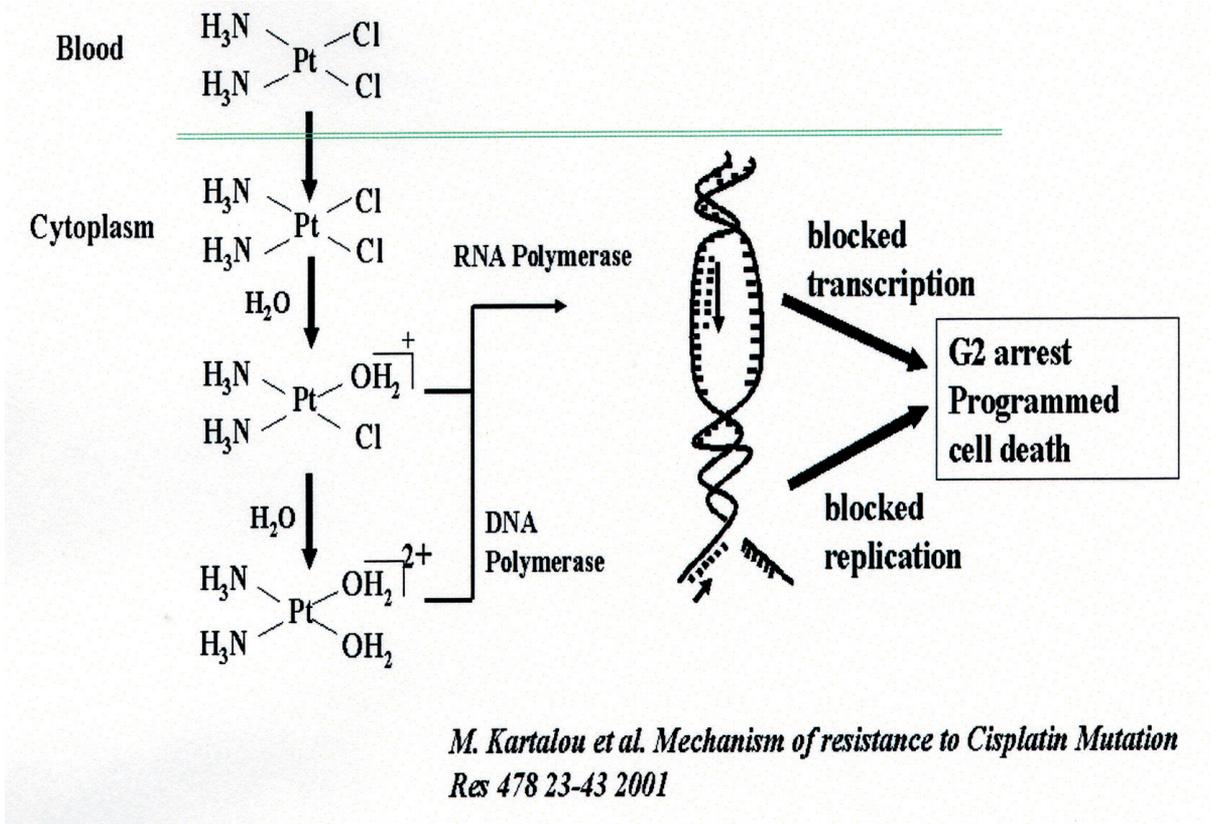


図 2. CDDP の作用機序

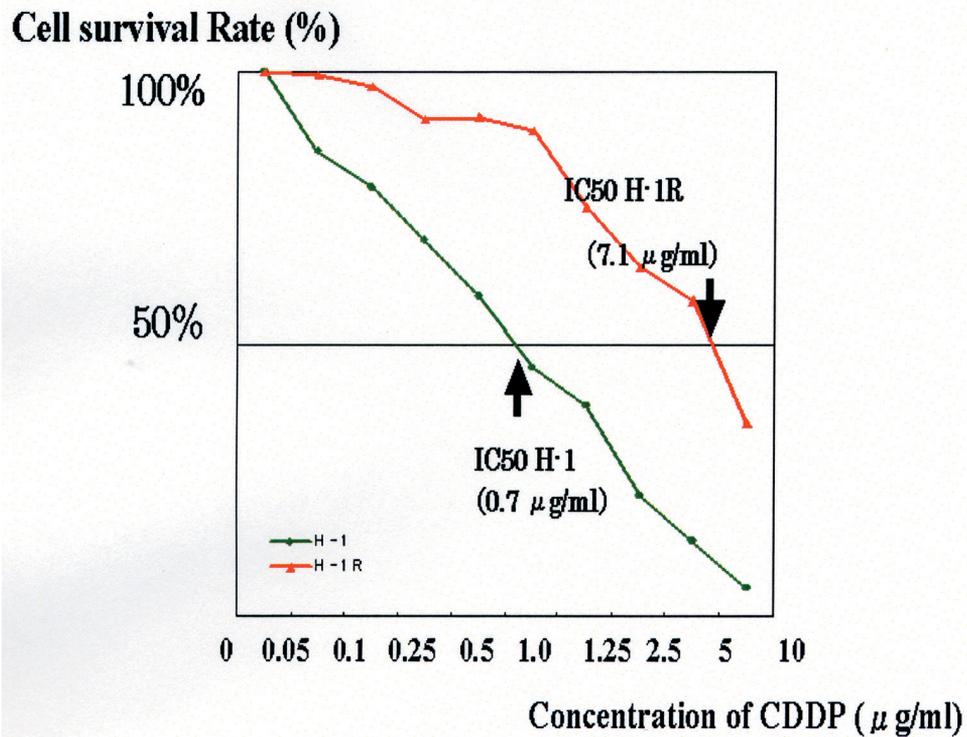


図 3. MTT アッセイの代表例。H-1 と H-1R 細胞

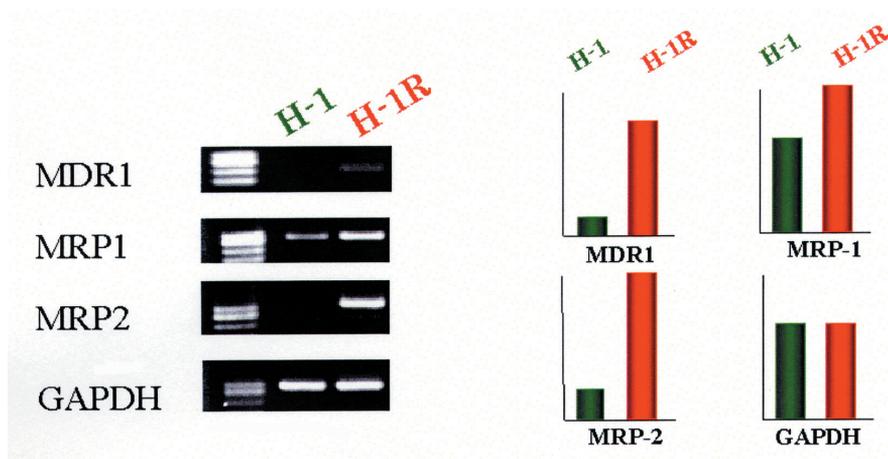


図 4. H-1 と H-1R 細胞における ABC トランスポーター遺伝子の発現量の比較 (Semiquantitative RT-PCR)

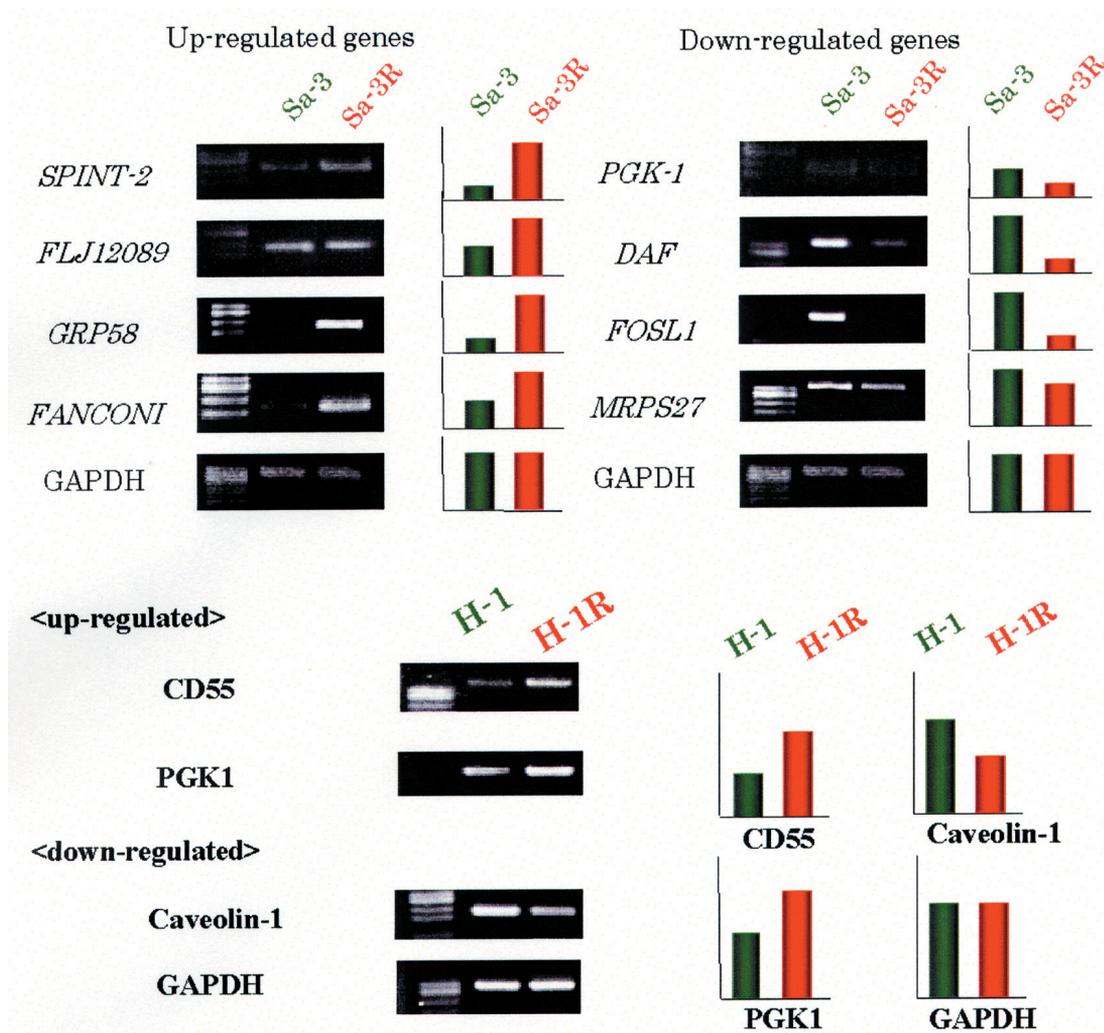


図 5. Semiquantitative RT-PCR による各細胞中における候補遺伝子群の mRNA 発現状態

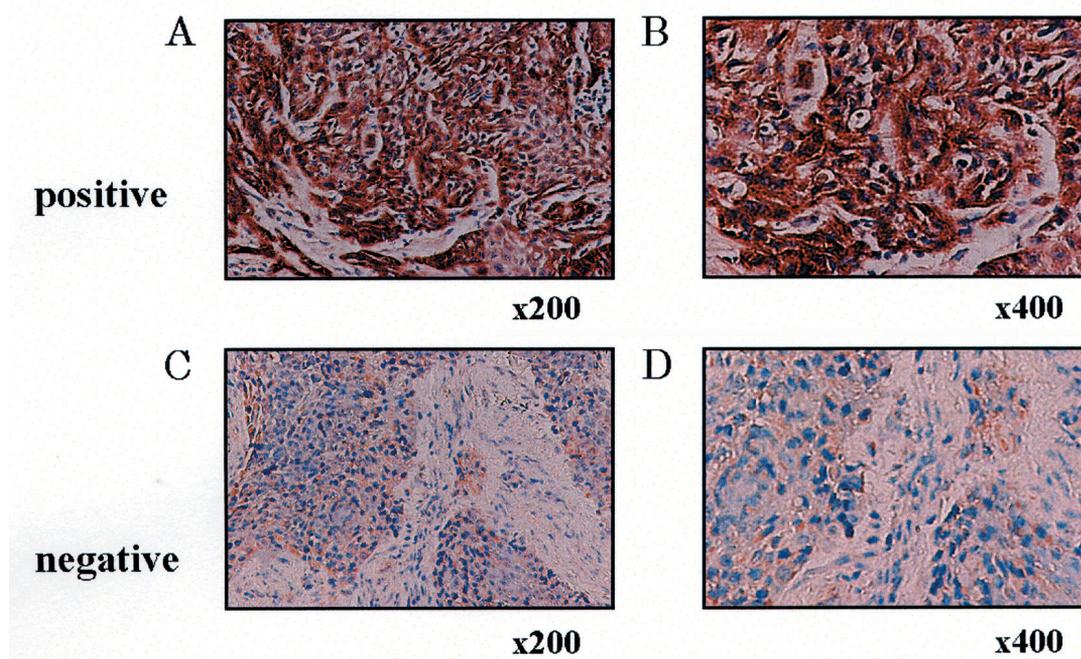


図 6. 免疫染色による Caveolin-1 タンパクの口腔癌組織における発現の代表例

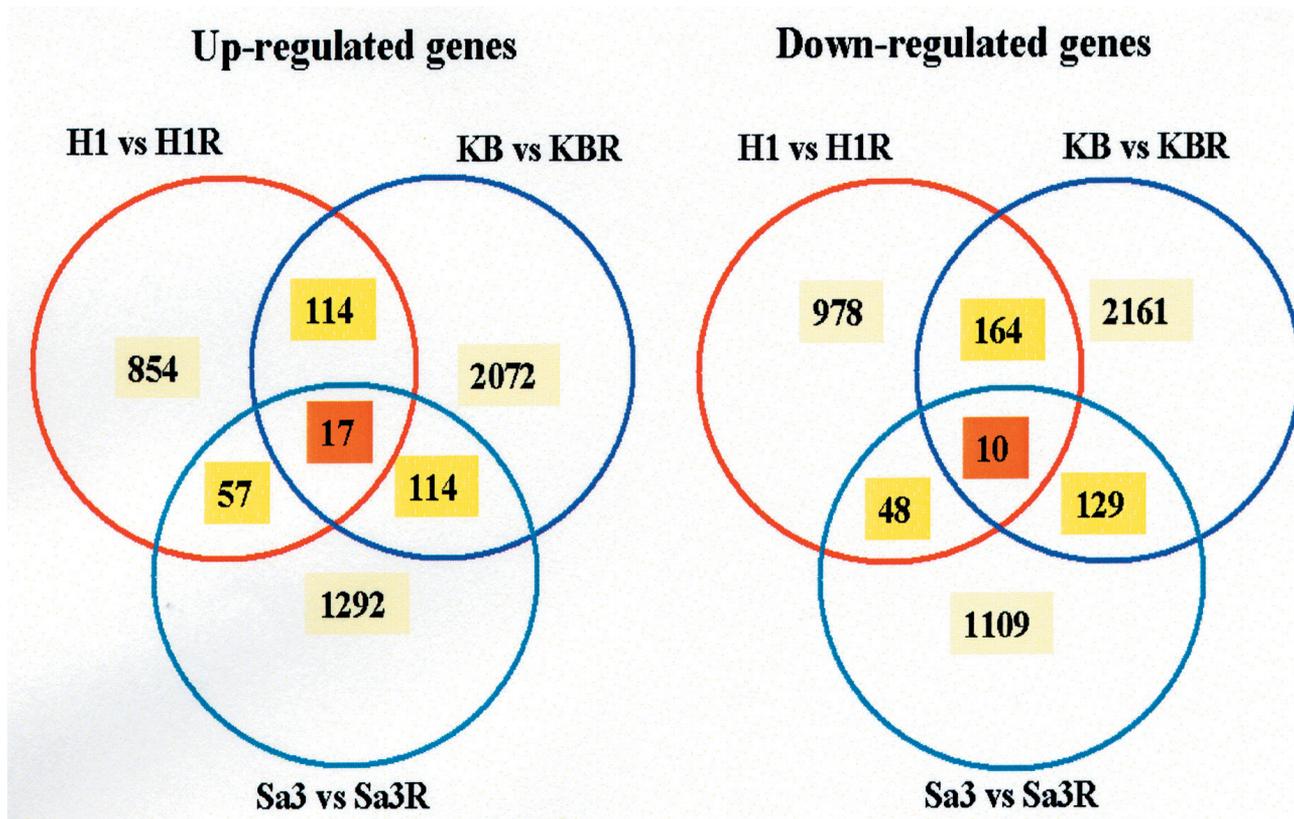


図 7. 3 種類の CDDP 耐性細胞株における発現増強遺伝子数。(GeneChip 解析)

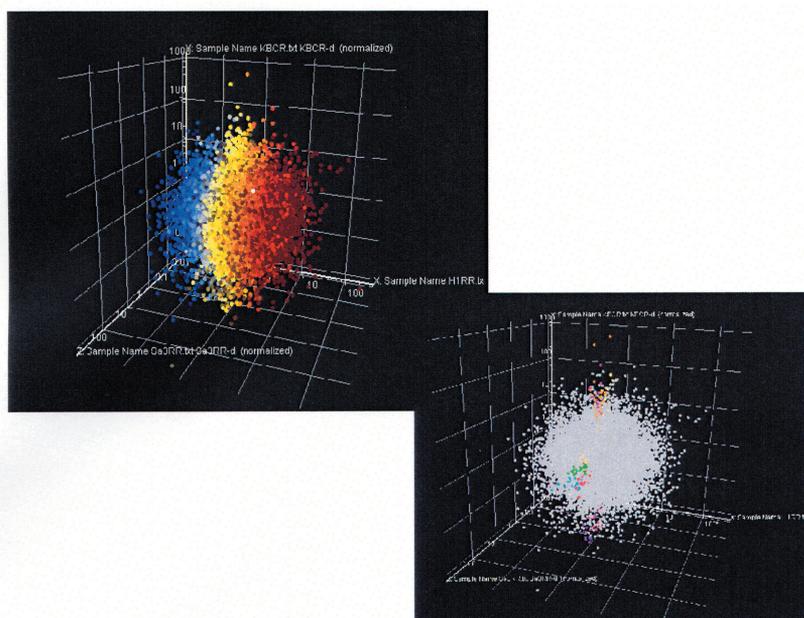


図 8. QT クラスタリング解析。各細胞種の耐性株と感受性株における遺伝子発現量の差を、各座標軸に割り振って全ての遺伝子を 3 次元的にプロットした。縦軸 Y が KBR-KB、右軸 X が H-1R-H1、左軸 Z が Sa-3R-Sa-3 である。

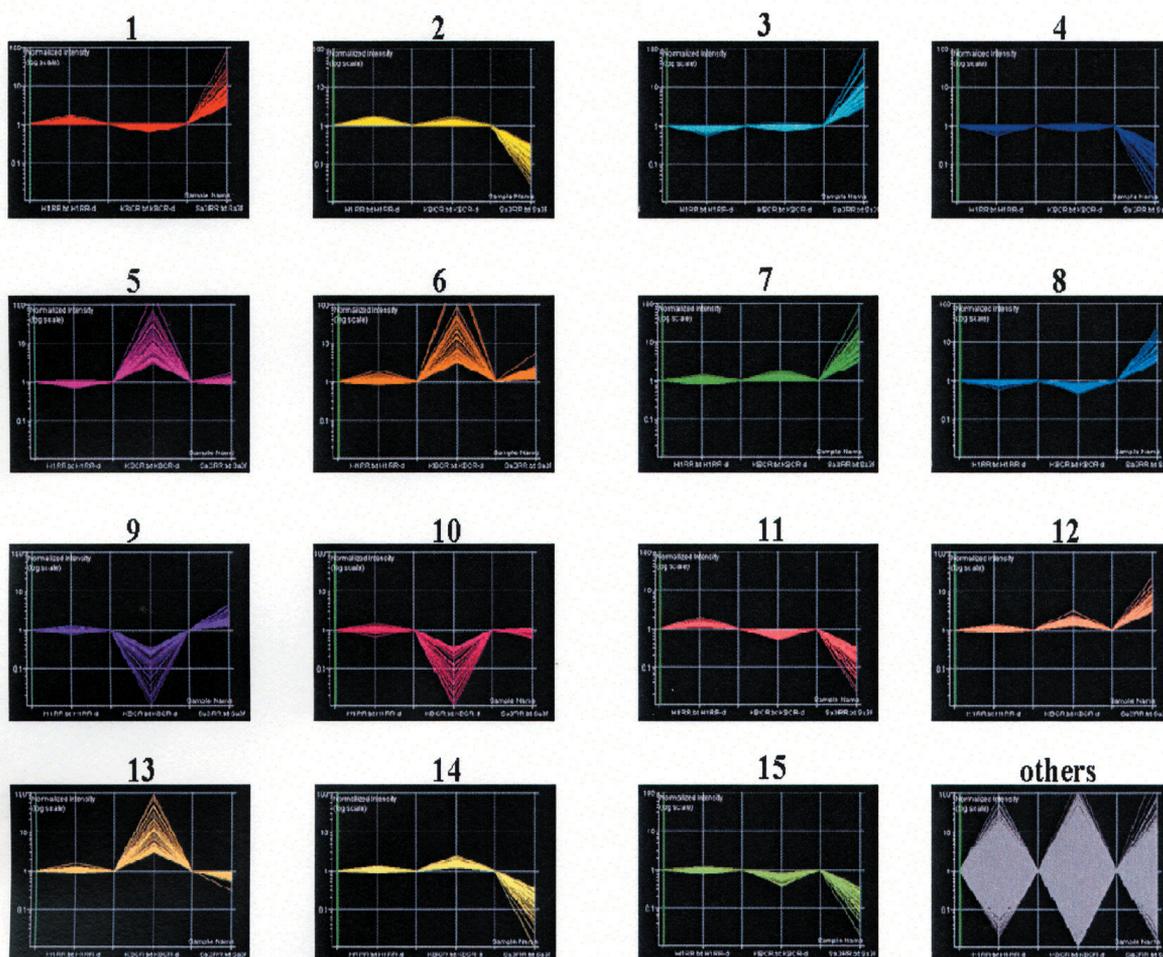


図 9. QT クラスタリング解析 (2 次元図。左から H-1R-H1, KBR-KB, Sa-3R-Sa3)

表 1. 現在までに報告されている CDDP 耐性関連因子

Nucleus	DNA repair	ERCC1
	transcription	mismatch repair enzyme transcription factor(YB-1) tumor suppressor gene (p53, P73)
	transmutation of DNA structure	DNA topoisomerase I / II
Cytoplasm	low molecular	glutathione
	detoxication/ conjugation	metallothionein、 p450、 glutathion-S-transferase
	oxidation reduction	thioredoxin
	activation of drugs	esterase、 asparaginase dihydropyrimidine dehydrogenase
	mitochondria	Bcl-2, Bax
Cell membrane	ABC-transporter	MRPs, P-type ATPase (ATP7B)
	other transporters	nonP-typeV-ATPase (proton pump)

表 2. H-1R 細胞株における発現増強遺伝子

UniGene ID	Description	Chromosomal Position	1 time	2 times
Hs.144904	ETF1;Eukaryotic translation termination factor 1	5q31.1	3.580559	1.042839
Hs.431175	AKR1C1;Aldo-keto reductase family 1, member C1	10p15	1.319533	3.039862
Hs.7935	BTBD3;BTB (POZ) domain containing 3	20p12.1	1.725262	1.954609
Hs.1369	DAF;Decay accelerating factor for complement (CD55)	1q32	1.789262	3.014971
Hs.71787	MRPS7;Mitochondrial ribosomal protein S7	17q23	1.062092	1.162225
Hs.78771	PGK1;Phosphoglycerate kinase 1	10q13	1.06671	1.444409
Hs.272168	TDE1;Tumor differentially expressed 1	20q13.1	1.086489	1.168551
Hs.279923	Homo sapiens nucleostemin (NS), mRNA	3p21	18.73448	1.613566
Hs.77324	ETF1;Eukaryotic translation termination factor 1	5q31.1	17.06531	2.325373
Hs.4835	EIF3S8;Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8,	16p11.2	1.267323	1.095418
Hs.125453	ASPARYL- tRNA SYNTHETASE; DARS	2q22.1	18.42731	1.159934
Hs.177584	OXCT3;3-oxoacid CoA transferase	5p13	1.201602	1.705567
Hs.1023	Human mRNA for brain pyruvate dehydrogenase	xp22.2	19.7982	1.277041
Hs.76053	Homo sapiens RNA helicase p68 (HUMP68) gene	17q23	2.609233	1.150328
Hs.283609	MBNL2;Muscleblind-like 2 (Drosophila)	13q32.2	17.04107	1.112969
Hs.5337	IDH2;Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	15q26.1	18.17548	1.012813
Hs.326198	TCF4;Transcription factor 4	18q21.1	18.52092	1.353824
Hs.177516	HDLBP;High density lipoprotein binding protein (vigilin)	2q37	17.41771	1.103505
Hs.272499	DHRS2;Dehydrogenase/ reductase (SDR family) member 2	14q11.2	19.11377	1.178475
Hs.2430	TCFL1;Transcription factor-like 1	1q21	19.10465	1.044662
Hs.100555	DDX18;DEAD/H (Asp- Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 18 (Myc-regulated)	2q14.2	3.523291	1.021265
Hs.1369	DAF;Decay accelerating factor for complement (CD55)	1q32	4.350972	1.959655
Hs.301613	JTV1; tRNA SYNTHETASE COFACTOR	7p22	16.14924	2.561539
Hs.288936	MRPL9;Mitochondrial ribosomal protein L9	1q21	17.95079	1.414901
Hs.33084	SLC2A5;Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter)	1p36.2	18.37217	1.78339
Hs.78683	USP7;Ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)	16p13.3	18.6255	1.127629
Hs.120824	DI1D1;Disrupted in bipolar affective disorder 1	11q23	18.57689	1.455778
Hs.100426	BRMS1;Breast cancer metastasis-suppressor 1	11q13	1.31262	1.404437
Hs.3887	PSMD1;Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-	2q37.1	19.0345	1.661968
Hs.57209	LBH;Likely ortholog of mouse limb-bud and heart gene	2p23.2	5.537781	1.216241
Hs.9081	FRS3;Phenylalanyl-tRNA synthetase beta- subunit	2q36	17.78492	1.062751
Hs.431175	AKR1C1 aldo-keto reductase family 1, member C1	10p15	20.88838	2.602959
Hs.32353	MAP3K4;Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	6q25.3	3.055927	1.028112
Hs.28578	MBNL1;Muscleblind-like (Drosophila)	3q25	18.94951	1.02063

表 3. H-1R 細胞株における発現減弱遺伝子

UniGene ID	Description	Chromosomal Position	Ratio	
			1 time	2 times
Hs.84136	PITX1; Paired-like homeodomain transcription factor 1	5q31	-1.09628	-2.57028
Hs.75799	PRSS8; Protease, serine, 8 (prostasin)	16p11.2	-1.04874	-3.64835
Hs.356019	RPS5; Ribosomal protein S5	19q13.1	-1.01598	-1.76812
Hs.75799	PRSS8; Protease, serine, 8 (prostasin)	16p11.2	-1.19486	-3.78799
Hs.80342	KRT15; Keratin 15	17q21.2	-1.78353	-2.76378
Hs.74034	caveolin 1 (CAV1), a 21- to 24- kD integral membrane protein	7q31.1	-1.3073	-2.05732
Hs.397609	ribosomal protein S16	19q13.1	-1.02243	-2.07074
Hs.173902	protein phosphatase 2, regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	19q13.41	-1.07461	-1.12346
Hs.57301	HMGA1; High mobility group AT-hook 1	6p21	-1.94581	-3.48411
Hs.446415	SCNN1A; Sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	12p13	-1.24339	-3.11115
Hs.433581	SFRS11; Splicing factor, arginine/serine-rich 11	1p31	-1.07137	-1.33042
Hs.75452	HSPA1A; Heat shock 70kDa protein 1A	6p21.3	-1.26287	-2.25385
Hs.118787	TGFBI; Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	5q31	-1.33833	-1.79278
Hs.69771	complement factor B preproprotein; PROPERDIN FACTOR B	6p21.3	-1.03597	-1.71156
Hs.43481	DTNBP1; Dystrobrevin binding protein 1	6p22.3	-1.16536	-1.57842
Hs.378011	RPL12; Ribosomal protein L12	9q34	-1.70962	-1.61525
Hs.179526	thioredoxin interacting protein	1q21.2	-2.39822	-1.38936

表 4. Sa-3R 細胞株における発現増強遺伝子

Uni Gene No.	Gene Name	Description	Chromosomal position	Ratio ^a
Hs.300439	<i>FLJ12089</i>	Hypothetical protein FLJ12089	19p13.2 1	19.93
Hs.125180	growth hormone receptor	growth hormone receptor	5p13	17.09
Hs.42343	<i>MYST1</i>	MYST histone acetyltransferase 1	16p11.2	11.89
Hs.79086	<i>MRPL3</i>	Mitochondrial ribosomal protein L3	3q21	10.03
Hs.7935	BDB(POZ) domain	BDB(POZ) domain containing 3	20p12.1	9.69
Hs.77324	<i>ETF1</i>	Eukaryotic translation factor 1	5q31.1	8.73
Hs.13751	<i>GRP58</i>	Glucose regulated protein 58kDa	15q15	19.67
Hs.108502	<i>BSPRY</i>	B-box and SPRY domain containing	9q32	2.83
Hs.31439	<i>SPINT2</i>	Serin protease inhibitor, Kunitz type 2	19q13.1	2.51
Hs.69517	<i>FANCONI</i>	Sequence 1 from Patent WO9845428.unnamed	8q24	2.08
Hs.57301	<i>HMGA1</i>	high mobility group AT-hook 1	6p21	2.05

Ratio^a: Relative mRNA Expression log Ratio

表 5. Sa-3R 細胞株における発現弱遺伝子

Uni Gene No.	Gene Name	Description	Chromosomal position	Ratio ^a
Hs.264190	VPS35	Va scular protein sorting 35 (yeast)	16q12	-8.28
Hs.57301	HMG1	High mobility group AT-hook 1	6q21	-8.23
Hs.80288	HSP70	Heat-Shock protein, 70-KD	6p21.3	-6.43
Hs.406620	Ribosomal protein S10	Ribosomal protein S10	6p21.31	-2.38
Hs.386741	FOSL1	FOS-like antigen 1; FRA-1	11q13	-2.33
Hs.379018	MRPS27	Mitochondrial ribosomal protein S27	5q13.2	-2.02
Hs.78771	ANXA7	Annexin A7	10q21.1	-1.89
Hs.1369	Transcription factor DP2	Transcription factor DP2	3q23	-1.72
Hs.283565	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	10q13	-1.81
Hs.122669	DAF	Decay accelerating factor for component (CD55)	1q32	-1.58

Ratio ^a : Relative mRNA Expression log Ratio

表 6. 口腔扁平上皮癌における CDDP の奏功状態と Caveolin-1 タンパク発現の相関

		(+)	(-)	P
CR	18	16	2	
PR	5	3	2	
NC	7	1	6	
		20	10	

文献

- 1) Ensley J, Crissman J, Kish J, Jacobs J, Waever A, Kinzie J, Cummings G, Al-Sarraf M. (1986) The impact of conventional morphologic analysis on response rates and survival in patients with advanced head and neck cancers treated initially with cisplatin-containing combination chemotherapy. *Cancer* 57, 711- 717.
- 2) Carnichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated calorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-942.
- 3) Moriya T, Seki N, Shimada K, Kato M, Yakushiji T, Nimura Y, Uzawa K, Takiguchi M, Tanazawa H. (2003) In-house cDNA microarray analysis of gene expression profiles involved in SCC cell lines. *Int J Mol Med.* 12(4):429-35.
- 4) Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "pre-assembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273, 5419-5422.
- 5) Nasu Y, Timme TL, Yang G, Bangma CH, Li L, Ren C, Park SH, DeLeon M, Wang J, Thompson TC. (1998) Suppression of caveolin expression induces androgen sensitivity in metastatic androgen-insensitive mouse prostate cancer cells. *Nat Med.* 4, 1062-1064.
- 6) Timme TL, Goltsv A, Tahir S, Li L, Wang J, Ren C, Johnston RN, Thompson TC. (2000) Caveolin-1 is regulated by c-myc and suppress c-myc induced apoptosis. *Oncogene.* 19, 3256-3265.
- 7) Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC. (1998) Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1873-1880.
- 8) Fine SW, Lisanti MP, Galbianti F, Li M. (2001) Elevated expression of caveolin-1 in adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Pathol.* 115, 719-724.
- 9) Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. (2002) Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer.* 94, 929-933.