

## がん細胞のシスプラチン耐性原因遺伝子の機能解析

### [1] 組織

代表者：松本 英樹  
 (福井大学・高エネルギー医学研究センター)  
 対応者：福本 学  
 (東北大学・加齢医学研究所)  
 分担者：成田 憲彦 (福井大学・医学部)  
 藤枝 重治 (福井大学・医学部)  
 研究費：物件費 100,000円

### [2] 研究経過

#### (2-1) 研究目的

がん治療研究において新たながん治療戦略の開発は、近年益々その重要性を増している。本共同研究は、その様な社会的背景に鑑み、がん細胞のシスプラチン耐性獲得を担う遺伝子を明らかにすることを目的とする。

#### (2-2) 研究の概要

がん細胞の放射線照射後の遺伝子発現の網羅的解析

- (1) 福井大学において樹立したシスプラチン耐性細胞株 (IMC3CR) とその親株 (IMC3) をシスプラチン (1  $\mu$ g/ml) 処理し、その後の遺伝子発現動態をPCRアレイにより網羅的に解析し、シスプラチン処理後の遺伝子発現の変化を明らかにした。
- (2) (1)の遺伝子発現プロファイルを解析し、シスプラチン耐性能獲得に関与していると思われる遺伝子Aの発現動態をRT-PCR、ウェスタンブロット、siRNA干渉アッセイ等により精査した。
- (3) (2)の結果、遺伝子Aがシスプラチン耐性機構において重要な役割を果たしていることが示唆された。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

#### 1. シスプラチン処理後のシスプラチン耐性細胞の遺伝子発現変化

シスプラチン耐性細胞 (IMC3CR) をシスプラチン (1  $\mu$ g/ml) 処理し、6 時間後に全RNAを抽出し、RT-PCR array (Qiagen社のDNA Damage signaling pathway) を用いて、遺伝子発現動態を解析し、発現量が1.5倍以上に亢進している遺伝子を25種見出した。これらの

遺伝子の内、遺伝子Aに着目して、遺伝子発現、タンパク質発現、シスプラチン感受性等を精査した (具体的な遺伝子の名称は伏せさせて戴きます)。

- (1) PCRアレイによる網羅的遺伝子発現解析  
25種の遺伝子が、未処理のものと比較して1.5倍以上に発現量が上昇していた (表1)。
- (2) RT-PCR解析において、IMC3CR細胞の遺伝子Aの発現量は親株であるIMC3細胞の約6倍であった (図1)。
- (3) シスプラチン処理による遺伝子Aの発現誘導は、IMC3細胞で1.5倍程度であったのに対し、IMC3CR細胞では約40倍に亢進していた (図2)。
- (4) ウェスタンブロットによりsiRNA処理による遺伝子A産物 (タンパク質) の発現抑制を確認した (図3)。
- (5) siRNA処理したIMC3CRのシスプラチン感受性は約5倍亢進し、遺伝子Aがシスプラチン耐性機構において重要な機能を担っていることが示唆された。

表1. IMC3CR 細胞におけるシスプラチン処理後の遺伝子発現動向。

Ratio	Genes up-regulated by cisplatin
1.64	ATR
2.25	BTG2
1.65	CIDEA
1.52	EXO1
1.99	FANCG
1.65	GADD45G
1.65	GML
2.83	IP6K3
2.23	XRCC6BP1
1.51	MAPK12
1.79	MRE11A
1.61	NBN
2.28	PCBP4
1.51	PCNA
1.55	PMS1
1.64	PNKP
1.88	RAD51L1
1.84	RAD9A
1.80	RBBP8
1.88	<b>A gene</b>
1.53	SMC1A
1.96	TP73
1.73	XPA
1.66	XRCC2
2.77	XRCC3

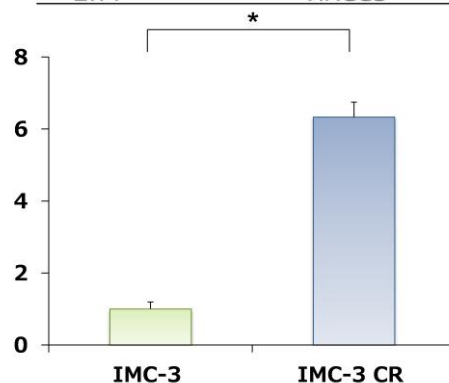


図1. 遺伝子Aの発現動態。

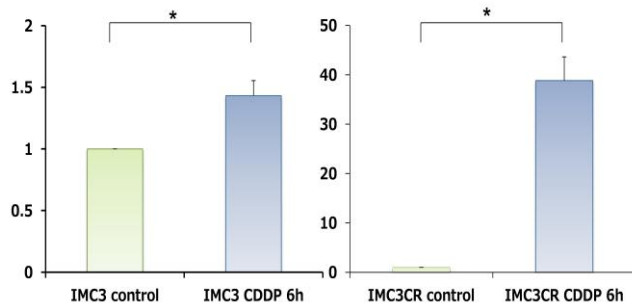


図2. シスプラチン (1 µg/ml) 処理による遺伝子 A の発現亢進.

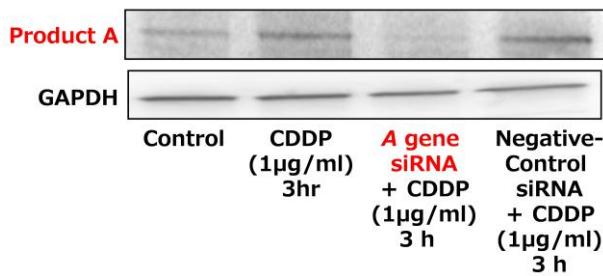


図3. IMC3CR 細胞における siRNA による遺伝子 A 産物の発現抑制.

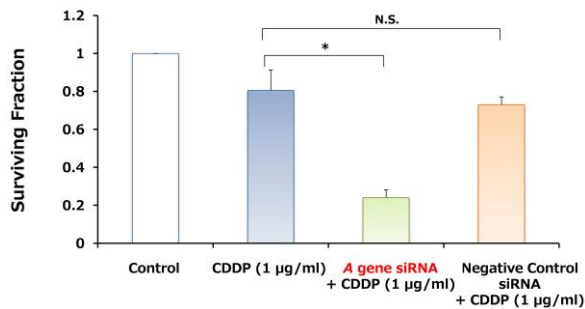


図4. 遺伝子 A siRNA 処理によるシスプラチン感受性の増感.

### (3-2) 波及効果と発展性など

低濃度シスプラチン条件下で馴養することにより樹立したシスプラチン耐性細胞 (IMC3CR) のシスプラチン耐性獲得に関与する遺伝子を 25 種同定し、それらの内、遺伝子 A について精査し、この遺伝子がシスプラチン耐性機構において重要な機能を担っていることが示唆された。今後、さらに遺伝子 A の機能解析を行い、シスプラチン耐性機構を克服する治療戦略の構築を目指す。がん細胞のシスプラチン耐性獲得のメカニズムの解明は、集学的がん治療における新規治療方法の開発につながる重要な成果になると確信している。

### [4] 成果資料

(原著および総説)

- Otsuka, K., Hamada, N., Magae, J., Matsumoto, H., Hoshi, Y., Iwasaki, T.: Ionizing radiation leads to the replacement and de

novo production of colonic Lgr5+ stem cells.

*Radiat. Res.*, in press.

- Tomita, M., Maeda, M., Kobayashi, K., Matsumoto, H.: Dose response of soft x-ray-induced bystander cell killing affected by *p53* status. *Radiat. Res.* 179: 200-207, 2012.

(国際学会)

- Matsumoto, H.: The evidence that low dose radiation involves non-targeted effects in targeted effects. **The Sugahara Memorial International Symposium.** Kyoto (Japan), 2012.
- Matsumoto, H.: How to approach the microbeam experiments. -from broad- to micro-beams. **The 2<sup>nd</sup> Microbeam Experiment Training Course in the 10<sup>th</sup> International Workshop for Microbeam Probes of Cellular Radiation Response.** New York (USA), 2012. (Invited)
- Matsumoto, H.: Stress-induced, NO-mediated bystander responses for protecting cells themselves. **The 11th International Congress of Hyperthermic Oncology (ICHO) & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (JCTM).** Kyoto (Japan), 2012. (Invited)
- Matsumoto, H.: Development of first-aid medicines for emergency acute exposure by accident of nuclear power plant. **The 58th Annual Meeting of the Radiation Research Society.** San Juan (Puerto Rico), 2012.
- Matsumoto, H.: Nitric oxide is a key molecule serving as a bridge between radiation-induced bystander and adaptive responses. **The 3rd International Symposium of RIRBM, Hiroshima University.** Hiroshima (Japan), 2013. (Invited)

(特別/招待講演)

- 松本英樹: Radiosurgery のための Radiation Biology. 第3回放射線外科学会. 大阪市, 2012.
- 松本英樹: 低線量被ばくを考える. 第10回九州放射線治療システム研究会. 福岡市, 2012.
- 松本英樹: 私と放射線生物学. 日本放射線影響学会学会賞受賞講演. 日本放射線影響学会第55回大会. 仙台市, 2012.