

癌分子標的治療薬への耐性獲得における 長鎖非コード RNA の役割

名古屋大学大学院
医学系研究科 特任助教 織田進吾

【背景及び目的】

国内における肺癌患者数は増加傾向にあり、その薬物治療は患者の quality of life (QOL) を左右するため非常に重要である。肺癌治療において分子標的薬である上皮成長因子受容体-チロシンキナーゼ阻害薬 epidermal growth factor receptor (EGFR)-tyrosine kinase inhibitor (TKI) (ゲフィチニブやエルロチニブ等) が使用されるが、その獲得耐性は癌の再発を招き、患者 QOL を著しく損なう。従って、耐性機構を明らかにし、新たな創薬標的を探索することが望まれる。

Long non-coding RNA (lncRNA, 長鎖非コード RNA) は 200 ヌクレオチド以上のタンパク質をコードしない RNA 分子である。LncRNA はタンパク質をコードする遺伝子数以上存在すると言われおり、クロマチンリモデリング、転写調節、転写後調節、蛋白の安定化など、非常に多岐の機能を有することがわかってきた¹⁾。LncRNA の発現パターンの異常が生物学的反応の破綻を引き起こし、疾患に繋がることも示されている。癌関連研究においても、数十種類ではあるものの lncRNA が発癌や転移に関与することが明らかにされた²⁾。しかし、EGFR-TKIs の獲得耐性機構について lncRNA に焦点を当てた研究は存在しない。本研究では、癌分子標的治療薬への耐性獲得における lncRNA の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

マイクロアレイ: エルロチニブ感受性肺癌細胞株 (PC-9) 及び非感受性肺癌細胞株 (ER3) より total RNA を抽出した。Total RNA より cRNA を合成し、SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver. 2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) にハイブリダイズした。

ノックダウンによる細胞生存率への影響: PC-9 細胞または ER3 細胞を 96 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、同時に 10 nM siRNA (LOC440173, Lnc-GPBP1-3, ZNF503-AS1 及び LOC401164) を Lipofectamine RNAiMAX (Life technologies, Gaithersburg, MD) で導入した。6 時間後に 0.001 μ M から 1 μ M の erlotinib を処置し、96 時間後に cell counting kit-8 (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan) にて細胞生存率を測定した。

過剰発現による細胞生存率への影響: PC-9 細胞または ER3 細胞を 96 well プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、12 時間後に lncRNA 発現プラスミド (LOC440173 及び LOC401164) を X-tremeGENE HP DNA transfection reagent (Roche, Basel, Switzerland) で導入した。3 時間後に 0.01 μM から 1 μM の erlotinib を処置し、96 時間後に CCK-8 にて細胞生存率を測定した。

【結果及び考察】

TKI 耐性/非耐性細胞株における lncRNA 発現: Erlotinib 感受性肺癌細胞株 (PC-9) と非感受性肺癌細胞 (ER3) を用いたマイクロアレイを実施し、両細胞において発現量に差が認められる lncRNA を探索したところ、4 種類の lncRNA について real-time PCR でのバリデーションが得られた (Table 1)。

Table 1. Relative expression levels of lncRNAs in PC-9 and ER-3 cells determined by real-time PCR.

LncRNA		Length (base)	Relative expression	
Gene Name	Accession No.		PC-9	ER3
LOC440173	NR_027471	2018	1	522
Lnc-GPBP1-3	TCONS_00009974	1292	12	1
ZNF503-AS1	NR_038223	1867	64	1
LOC401164	NR_033869	483	34	1

Data are the mean (n = 3).

LncRNA ノックダウンによる細胞生存率への影響: ER3 細胞で高発現する lncRNA である LOC440173 を ER3 細胞にて siRNA でノックダウンしたところ、エルロチニブ処置による細胞死が増強された (Fig. 1)。一方で、PC-9 細胞で高発現する Lnc-GPBP1-3, ZNF503-AS1 及び LOC401164 を PC-9 細胞にてノックダウンしたところ、エルロチニブ処置による細胞死が減弱した。以上の 4 つの lncRNA はエルロチニブ耐性に寄与することが示唆された。

LncRNA 過剰発現による細胞生存率への影響: 上記のうちノックダウンによる影響が顕著であった LOC440173 及び LOC401164 の発現プラスミドを作製し、それぞれ PC-9 または ER3 細胞に過剰発現させ、エルロチニブ処置による細胞死への影響を検討した。しかし、過剰発現による細胞死への影響は認められなかった。プラスミド導入量の最適化が必要であると考えられる。

【結論】

本研究では、TKI 耐性に関与し得る lncRNA として LOC440173, Lnc-GPBP1-3,

ZNF503-AS1 及び LOC401164 を見出した。今後、lncRNA が TKI 耐性に関与する機序を中心に検討を進めて行く予定である。

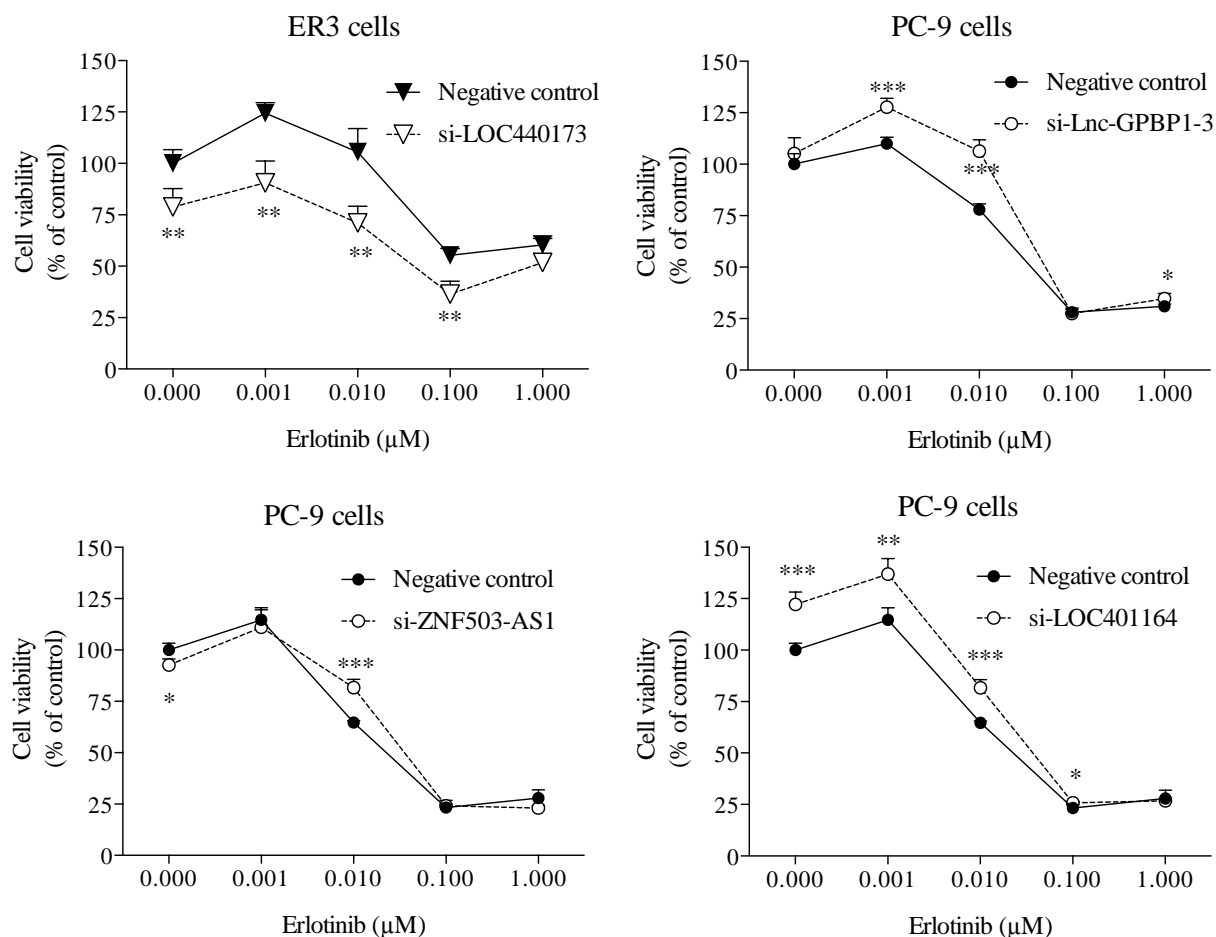


Fig. 1. Effects of lncRNA knockdown on erlotinib-induced cell toxicity in PC-9 or ER-3 cells. Data are the mean \pm SD (n = 4). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, compared to negative control-treated cells.

【参考文献】

- (1) Fitzgerald, K. A., and Caffrey, D. R. (2014) Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 26, 140-146.
- (2) Qiu, M. T., Hu, J. W., Yin, R., and Xu, L. (2013) Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research. *Tumour Biol.*, 34, 613-620.