

令和元年6月19日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10471

研究課題名(和文) マイクロRNAによる炎症性サイトカイン制御機構の解明と新規治療への展開

研究課題名(英文) Analysis of regulatory mechanism of inflammatory cytokine by miRNAs and development to novel treatment.

研究代表者

大澤 英之 (Ohzawa, Hideyuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60458271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬物療法抵抗性に関連するマイクロRNAを明らかにするために、乳癌の術前化学療法症例の治療前針生検体を用いて網羅的解析を行った。非病理学的奏功例で高発現であったmiR-205は、エストロゲン受容体陽性HER2陽性乳癌細胞株において、薬物療法感受性を変化させ、IL-6分泌を亢進させた。また、この機序には何らかのポジティブフィードバックが存在することが考えられた。本研究によって、マイクロRNAと炎症性サイトカインのネットワークが癌薬物療法抵抗性に関連する機序と、新規診断法や治療法の一つとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実臨床では、分子標的薬の進歩によって癌薬物療法の選択肢が増えているにも関わらず、薬剤抵抗性が生じて治療に難渋することもある。乳癌の分野では炎症性サイトカインを標的とした治療はなく、マイクロRNAを利用した診断と治療も未だ実用化されていない。本研究を通して癌の薬剤抵抗性の機序を解明し、マイクロRNAやサイトカインのネットワークを標的とした新規バイオマーカーや治療標的を見出すことで、癌薬物療法の新たな治療戦略構築や治療の個別化に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive microRNA analysis using pre-treatment needle biopsy specimens from patients with breast cancer received neoadjuvant chemotherapy, in order to clarify microRNAs associated with drug resistance. In candidate miRNAs, miR-205, which was highly expressed in cases with non-pathologically complete response, altered drug sensitivity and enhanced IL-6 secretion in estrogen receptor positive HER2-positive breast cancer cell lines. A positive feedback was thought to exist in this mechanism. This study has shown that the network of microRNAs and inflammatory cytokines have associated with drug resistance and might be one of novel diagnostic and therapeutic methods.

研究分野：癌薬物療法

キーワード：マイクロRNA 炎症性サイトカイン 乳癌 化学療法 分子標的療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は本邦の女性が最も多く罹患する癌である。近年、乳癌に対する薬物療法が進歩する中で、薬剤に対する抵抗性が問題となっている。今後の治療成績向上のためには薬剤抵抗性の克服が必須であるが、薬剤抵抗性を獲得する機序は十分に解明されていない。本邦では乳癌の罹患率だけでなく死亡率も増加しつつあることから、治療成績の改善には薬剤抵抗性の克服が必須である。炎症性サイトカインと癌との関連は以前から知られており、中でも IL-6 は多くの癌において腫瘍形成性が指摘されている。細胞内には IL-6 を持続的に活性化させるポジティブフィードバックが存在し、癌細胞の増殖分化に関与すること (Iliopoulos D et al. Cell 2009) が報告されている。実臨床では、分子標的薬の進歩によって癌薬物療法の選択肢が増えているにもかかわらず、薬剤抵抗性が生じて治療に難渋することもある。乳癌の臨床では炎症性サイトカインを標的とした治療はなく、マイクロ RNA を利用した診断と治療は未だ実用化されていない。マイクロ RNA と炎症性サイトカインのネットワークに関連した機序を明らかにして診断や治療に応用できれば、癌薬物療法の新たな治療戦略の構築や個別化に貢献することができると考えた。

2. 研究の目的

マイクロ RNA はタンパク質をコードしない 18~24 塩基程度の内在性 small RNA として発見され、標的遺伝子の転写阻害や転写後の翻訳抑制を介して癌の増殖や進展に重要な役割を担っている。通常の病理診断に用いられるパラフィン包埋サンプルからの遺伝子産物は不安定だが、マイクロ RNA は FFPE 内でも比較的安定して保存されていることから、これまで長期間に渡って蓄積された臨床検体を用いたレトロスペクティブな解析が可能である。癌におけるマイクロ RNA 発現は臓器やサブタイプによって異なることから、癌患者の予後や薬剤感受性に関連したバイオマーカーや治療の標的として注目されている。本研究では、マイクロ RNA を介した炎症性サイトカインの活性化が、腫瘍の増殖と薬剤抵抗性に関与するという仮説を立て、マイクロ RNA を介した炎症性サイトカインの制御機構を明らかにすることで、マイクロ RNA やサイトカインネットワークが新たな治療の標的や薬剤抵抗性のバイオマーカーとなり得るかどうかを検証し、新規診断・治療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 術前化学療法非奏功症例に特徴的なマイクロ RNA の同定

術前化学療法を施行したエストロゲン受容体陽性 HER2 陽性乳癌患者の化学療法前針生検検体を用いて、腫瘍部分をレーザーマイクロダイセクションで選択的に採取し、マイクロ RNA 発現を網羅的に解析し治療効果に関連するマイクロ RNA を同定する。同定されたマイクロ RNA を乳癌細胞株にトランスフェクションさせて、薬剤感受性試験を行う。

(2) マイクロ RNA による薬剤抵抗性と炎症性サイトカイン制御機構の解明

同定されたマイクロ RNA が導入された乳癌細胞株からの炎症性サイトカイン分泌を測定し、細胞内の遺伝子発現経路を評価することで炎症性サイトカインの制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 乳癌の術前化学療法を受けたエストロゲン受容体陽性 HER2 陽性乳癌患者の針生検検体を用いた。病理学的奏功 (pCR) 症例 3 例と非病理学的奏功 (no pCR) 5 症例の化学療法前針生検検体から腫瘍部分をレーザーマイクロダイセクションで選択的に採取し、マイクロ RNA 発現を評価した。no PCR 症例で miR-205-5p の発現が有意に高かった (図 1)。

乳癌細胞株 BT-474 と MDA-MB231 に miR-205-5p をトランスフェクションし、ドセタキセルとトラスツズマブを用いて薬剤感受性試験を行ったところ、エストロゲン受容体陽性 HER2 陽性の乳癌細胞株である BT474 では、miR-205-5p の導入により細胞生存率が上昇し、薬剤抵抗性が変化したことが示唆された。一方、エストロゲン受容体陰性 HER2 陰性の乳癌細胞株である MDA-MB231 ではドセタキセル添加で生存率に若干の変化が見られたが、トラスツズマブでは変化が見られなかった (図 2)。

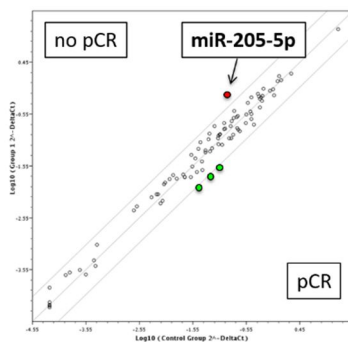


図1

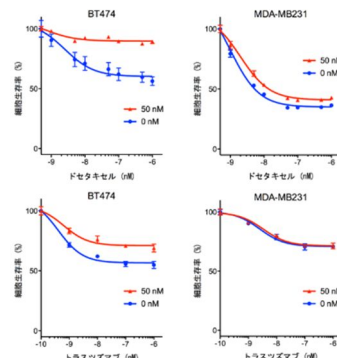


図2

(2) miR-205 をトランスフェクションさせた乳癌細胞株 BT-474 での遺伝子発現を PCR アレイで評価したところ、IL-6 遺伝子発現が上昇し、細胞外への IL-6 の分泌がみられるようになり (図 3) JAK-STAT 経路の遺伝子発現が亢進していた (図 4)。同時に IL1-A と IL-8 の遺伝子発現も亢進しており、マイクロ RNA が JAK-STAT 経路などを通じて炎症性サイトカインを制御していることが示唆された。IL-6 を BT-474 に添加したところ、miR-205-5p の発現が亢進していることから、ポジティブフィードバックが存在する可能性があり、炎症性サイトカインの制御に関与している機序が考えられた。

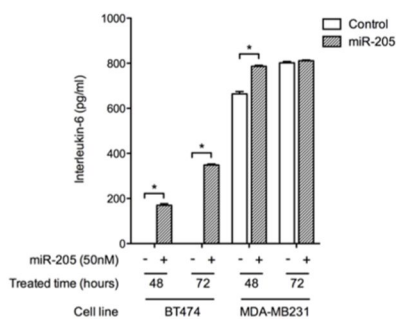


図3

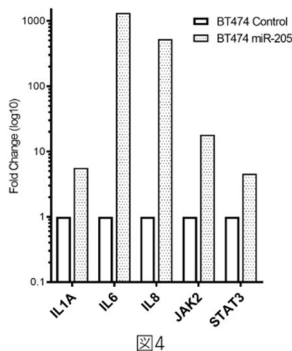


図4

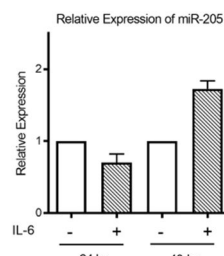


図5

< 参考文献 >

Iliopoulos D, et al. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. Cell 139(4):693-706, 2009.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Ohzawa H, Miki A, Teratani T, Shiba S, Sakuma Y, Nishimura W, Noda Y, Fukushima N, Fujii H, Hozumi Y, Mukai H, Yasuda Y. Usefulness of miRNA profiles for predicting pathological responses to neoadjuvant chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Oncol Lett 13(3):1731-1740 (2017) doi: 10.3892/ol.2017.5628. 査読有り

[学会発表](計 1 件)

Joji Kitayama, Hideyuki Ohzawa, Atsushi Miki, Takumi Teratani, Satomi Shiba and Naohiro Sata. miRNA profiles and the response of neoadjuvant chemotherapy in epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. Anti-Cancer Treatment Japan, 2018年 5月 18-19日 都市センターホテル, 東京

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三木 厚
ローマ字氏名：(MIKI, atsushi)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：20570378

研究分担者氏名：寺谷 工
ローマ字氏名：(TERATANI, takumi)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：70373404

研究分担者氏名：北山 丈二
ローマ字氏名：(KITAYAMA, joji)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：20251308

研究分担者氏名：佐田 尚宏
ローマ字氏名：(SATA, naohiro)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：20261977

研究分担者氏名：藤井 博文
ローマ字氏名：(FUJII, hirofumi)
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：80438613

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。