

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18037

研究課題名（和文）タキサン系薬剤に対する抵抗性メカニズムの解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of resistance mechanisms to taxanes and development of new therapeutic agents

研究代表者

浅野 倫子（Asano, Tomoko）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：70624427

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：乳癌のキードラッグであるタキサン系薬剤に抵抗性を来す乳癌があり、その抵抗性機序として報告されているチューブリン遺伝子とTEKT4遺伝子に着目した。ゲノム変異を誘導するAPOBEC3F遺伝子がチューブリン遺伝子とTEKT4遺伝子の体細胞変異を引き起こすことが、タキサン系薬剤抵抗性の原因となる可能性に着目しAPOBEC3Fを治療標的とした新規治療薬の開発を目的とし研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、当院で手術を施行した約500例の乳癌症例のうち、術後化学療法としてタキサン系薬剤を使用した124症例を対象に、APOBEC3FのmRNA発現と臨床病理学的因子および予後を検討した。APOBEC3Fが高発現だと予後不良であることが示唆された。

このことから、APOBEC3Fを標的とした治療を開発することは、乳癌周術期のキードラッグであるタキサン系薬剤への抵抗性を示す乳癌への克服を目指すことが可能である。

研究成果の概要（英文）：We focused on the tubulin gene and TEKT4 gene, which have been reported as a possible mechanism of resistance to taxane, the key drugs for breast cancer. We focused on the possibility that the APOBEC3F gene, which induces genomic mutations, causes somatic mutations in the tubulin gene and TEKT4 gene, which in turn causes resistance to taxane, and conducted research to develop new therapeutic agents targeting APOBEC3F.

研究分野：APOBEC3F

キーワード：乳癌 薬剤抵抗性 APOBEC

様式 C-19、F-19-1、Z 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳がんは、日本人女性のがん罹患率の第一位であり、死亡数は増加の一途を辿っている。薬物療法は乳がんの治療において重要な役割を担っているものの、化学療法に抵抗性を示す予後不良な乳がんが存在し、その治療成績の向上が緊急の課題となっている。タキサン系薬剤は、乳がん治療におけるキードラッグの一つであるが、タキサン系薬剤に抵抗性を示す乳がんがしばしば経験され、大きな臨床的課題となっている。近年、次世代シーケンサー (Next generation sequencer: NGS) の登場により、膨大かつ正確なゲノム情報が短時間で得られるようになり、乳がん領域においても、NGS の登場が薬剤抵抗性メカニズムの解明に新たな展開をもたらした。最近、タキサン系薬剤に対する抵抗性には、チューブリン遺伝子スーパーファミリーの体細胞変異と、TEKT4 という微小管を安定させる蛋白をコードする遺伝子の体細胞変異が関与していることが報告された。私たちはこれまでに、「タキサン系薬剤の抵抗性には、がん細胞のなかの様々な遺伝子の体細胞変異が関与しているのではないか」との仮説を立て、タキサン系薬剤に抵抗性を示した症例を対象に、NGS を用いた網羅的全エクソンシーケンス解析を行った。その結果、タキサン系薬剤の抵抗性に深く関与する 4 つの候補遺伝子を発見した。

次に、当施設の乳がん症例を用いて、それら 4 つの候補遺伝子の発現と予後との関連性を検討した。その結果、術後化学療法としてタキサン系薬剤を使用した 124 例を対象とした解析では、4 つの候補遺伝子のうち、APOBEC3F 遺伝子の高発現症例の予後がきわめて不良であることを始めて見出した。APOBEC3F は、ヒトシチジン脱アミノ化酵素 APOBEC3 ファミリーの一つで、ゲノム変異を誘導する遺伝子である。APOBEC 遺伝子ファミリーは、ヒトの外敵であるウイルス感染に対抗するために進化してきた遺伝子である。APOBEC3 タンパクは、一本鎖 DNA に特異的に結合し、シトシン (C) を脱アミノ化反応させることでウラシル (U) へと変換する DNA/RNA 編集酵素の一つである。そのまま DNA 複製が起こると、C T 変異が誘導される。様々ながんにおけるゲノム変異において、C T 変異が圧倒的に多いことから、これらのゲノム変異は APOBEC3 タンパクが主因ではないかと考えられている。

2. 研究の目的

本研究は、乳がんを対象に、タキサン系薬剤に対する抵抗性の克服を目指して、ゲノム変異を誘導する APOBEC3F 遺伝子を標的とする新たな分子標的治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では APOBEC3F 遺伝子を標的としてタキサン系薬剤抵抗性の克服を目指した新規治療薬の開発を目的とする。このため、以下の項目 A から C を明らかにする。

A：乳がん臨床検体を用いた検討： APOBEC3F 遺伝子の mRNA および蛋白発現量の検討 チューブリン遺伝子スーパーファミリーと TEKT4 遺伝子の体細胞変異解析

B：乳がん細胞株を用いた検討： アデノ随伴ウイルスを用いた APOBEC3F 遺伝子発現ウイルスベクターの作製 乳がん細胞株に対する APOBEC3 F 遺伝子強制発現の影響に関する検討： 1) 細胞増殖能の検討、2) チューブリン遺伝子スーパーファミリーと TEKT4 遺伝子の体細胞変異の有無の検討、3) タキサン系薬物療法の効果の検討。 乳がん細胞株に対する APOBEC3F 遺伝子ノックダウンの影響に関する検討： 上記の 1) から 3) と同様の検討を行う。

C：Xenograft モデルを用いた検討： 乳がん細胞株に、アデノ随伴ウイルス APOBEC3F 遺伝子発現ベクターを導入し、強制発現株とコントロールの親株をヌードマウスの皮下組織に植え付け、タキサン系薬剤の効果を比較検討する。

4. 研究の成果

APOBEC3F に関してこれまでに行った実験として、TaqMan RT-PCR システムを用いて、約 500 例の乳がん症例のうち、術後化学療法としてタキサン系薬剤を使用した 124 例を対象に、乳がん凍結標本から RNA を抽出し、APOBEC3F の mRNA 発現と臨床病理学的因子および予後を検討。結果、APOBEC3F 高発現は極めて予後不良であった。また、腫瘍径、腋窩リンパ節転移の有無、核異型度、ER、PgR、HER2、化学療法の有無、APOBEC3F mRNA の発現を無再発生存期間、全生存期間について単変量、多変量解析を行った結果、無再発生存率の Cox 比例ハザードモデルで、核異型度や ER、PgR と同様に APOBEC3F 発現量は単変量で有意な予後因子となったが、多変量解析では APOBEC3F は有意な予後因子とはならなかった。また、症例数を約 600 例に増やし予後解析すると、APOBEC3F 高発現は予後不良な傾向にあったが、統計学的な有意差はなかった。蛋白発現についても同様であった。乳がん細胞株を用いて APOBEC3F の mRNA 発現を TaqMan RT-PCR にて測定したところ、乳がん細胞株のうち、MCF7 より T47D に高発現であることを確認した。この T47D を用いて APOBEC3F 発現を siRNA にてノックダウンさせ、WST-1 アッセイにて細胞増殖能の変化を確認した。Negative control と比較して、siRNA の濃度を高濃度にするほど細胞増殖能が低下した。また、細胞増殖能の指標となる CCND1 や MKI67 との相関も確認したところ、CCND1 とは相関はなかったが、MKI67 とは相関関係を認めた。以上より、APOBEC3F は高発現だと予後が悪いことが示唆された。

図 1：乳がん細胞株を用いた細胞増殖能の検討

乳がん細胞株に APOBEC siRNA を 10pmol、100pmol、Negative Control (NC) にて細胞増殖をそれぞれ 24 時間、48 時間、96 時間で比較検討した。

NC と比較し、APOBEC siRNA 10pmol、100pmol と濃度が高濃度になるほど細胞増殖は低下した。

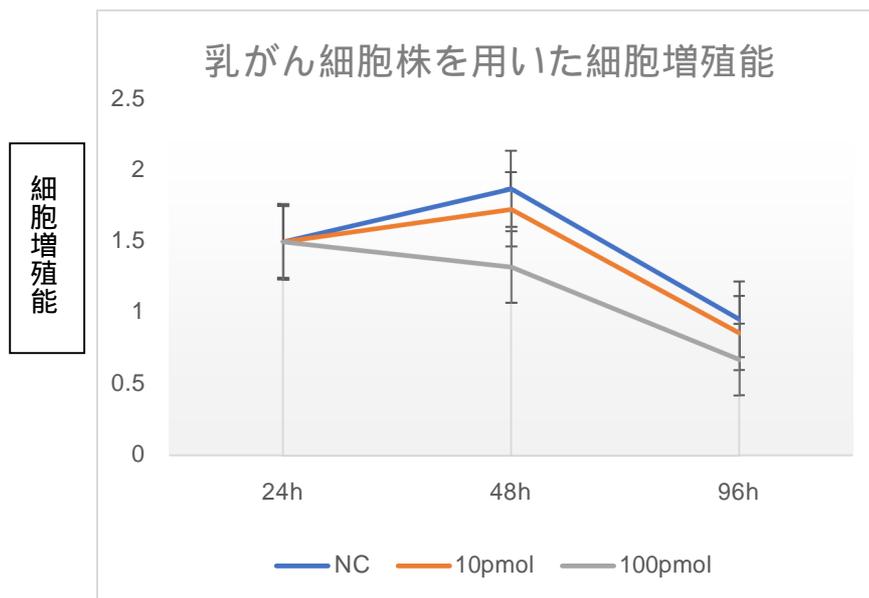


図 2：APOBEC3F mRNA と KI67 mRNA の相関関係

APOBEC3F と MKI67 は正の相関を認めた。($p < 0.001$)

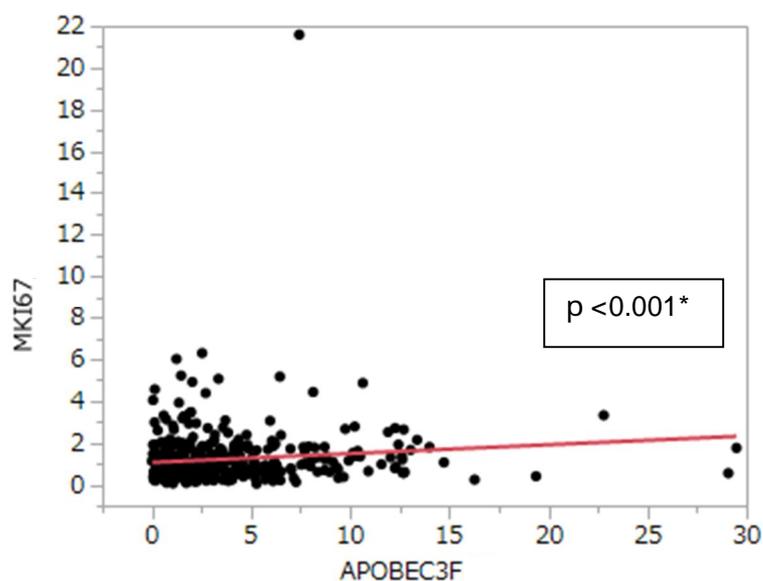
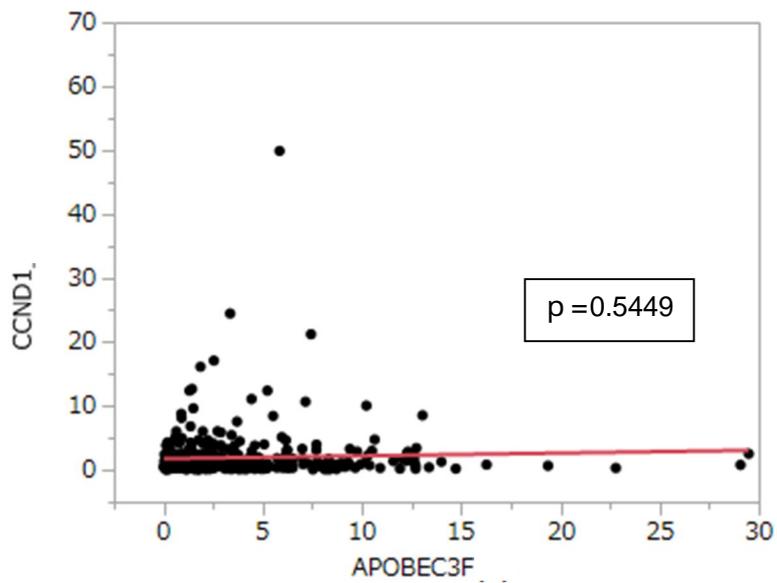


図3 : APOBEC3F mRNA と CyclinD1 mRNA の相関関係
APOBEC3F と CCND1 は明らかな正の相関関係はなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wanifuchi-Endo Yumi, Kondo Naoto, Dong Yu, Fujita Takashi, Asano Tomoko, Hisada Tomoka, Uemoto Yasuaki, Nishikawa Sayaka, Katagiri Yusuke, Kato Akiko, Terada Mitsuo, Sugiura Hiroshi, Okuda Katsuhiko, Kato Hiroyuki, Takahashi Satoru, Toyama Tatsuya	4. 巻 23
2. 論文標題 Discovering novel mechanisms of taxane resistance in human breast cancer by whole exome sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤（鰐淵）友美、高橋智、近藤直人、波戸ゆかり、久田知可、西本真弓、西川さや香、遠山竜也
2. 発表標題 ゲノム解析を用いた乳癌におけるタキサン抵抗性機序の解明
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------