

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08670

研究課題名（和文）タモキシフェン耐性乳がんを標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Investigation of therapeutic targets against endocrine-resistant breast cancer cells

研究代表者

高橋 陵宇（Takahashi, Ryou-u）

広島大学・医系科学研究科（薬）・准教授

研究者番号：10625510

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者はエストロゲン受容体（ER）陽性乳がんにおいて抗がん剤耐性が獲得される要因の1つとして非翻訳型RNAのmicroRNA-27b（miR-27b）の発現低下を報告している。その後の解析から、ホルモン療法に耐性を示す乳がん細胞においてもmiR-27bの発現低下が誘導されることを見出している。本研究では、miR-27bの発現を指標としてタモキシフェン耐性乳がん細胞の性状解析を行うことを目的とした。その結果、miR-27bの発現が低下した乳がん細胞ではERの発現低下と膜タンパク質のCEACAM6の発現が亢進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ER陽性のルミナルタイプの乳がんは乳がん症例の約7割を占める。ルミナル症例の約2割ではホルモン療法に耐性が見られ再発の可能性が高い。本研究では、ルミナル症例が予後不良となる一因としてERの発現低下などのルミナル形質の喪失される可能性を示した。また、ERの発現低下した細胞においてCEACAM6の発現が亢進することも明らかにした。以上の成果から、本研究はルミナル症例においてホルモン療法の奏効性を予測できる新規マーカーとしてCEACAM6が有用である可能性を示した。また、CEACAM6陽性乳がん細胞を対象とした治療標的分子を同定することで難治性のルミナル症例の予後不良を改善できることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that down-regulation of microRNA-27b (miR-27b) induced the docetaxel resistance in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. After these findings, we found that miR-27b was down-regulated in endocrine-resistant breast cancer cells. In this study, we aimed to analyze the characteristics of endocrine-resistant breast cancer cells via evaluating miR-27b expression. We found that ER was down-regulated in miR-27b down-regulated cells. We also observed the elevated expression of CEACAM6 in miR-27b down-regulated cells. Therefore, our current study identified CEACAM6 as a novel marker for hormone therapy-resistant breast cancer cells.

研究分野：分子生物学，がん，細胞老化

キーワード：乳がん 非翻訳型RNA 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

乳がんはホルモン受容体や HER2 受容体の発現に基づきサブタイプが分類され、その治療方針が決定される。国内外においてホルモン受容体陽性乳がんであるルミナル症例は全症例中の約 70%を占めており、そのうち約 20%が予後不良症例であることが報告されている(Dai, X et al., Am. J. Cancer Res. 2015, がん統計'19)。そのため、ホルモン療法および化学療法における奏功性を予測できるバイオマーカーの開発、さらには、予後不良に関わる細胞集団を標的とした治療方法を開発することは重要なテーマと考えられる。一方で、サブタイプ分類の課題の 1 つとして治療過程においてサブタイプの変容が生じるかどうかを十分に検討されていないことが挙げられる。サブタイプ変化と治療奏効性に関連性が存在した場合、その分子メカニズムを解明することは新たな治療標的分子の同定につながると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、1) 非翻訳型 RNA である microRNA-27b (miR-27b) の発現が低下した細胞集団においてホルモン受容体の 1 つである Estrogen(ER)受容体の発現が著しく低下すること、さらには、2) そのような細胞集団においてルミナル形質の維持に必須である転写因子の GATA3 や FOXA1 の発現も低下していることを見出している。本研究では、miR-27b の発現を指標として「ホルモン療法および化学療法に抵抗を示す細胞集団の性状解析を行うこと」、さらには、ER 受容体などの発現が低下した乳がん細胞を標的とした治療法の開発を目指して「新規治療標的分子の同定を行うこと」を目的に研究を行う。

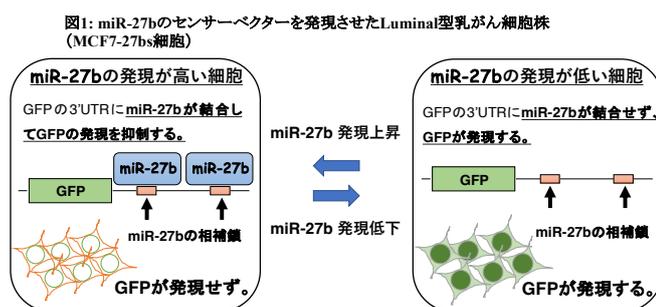
3. 研究の方法

1) 実験方法 1: miR-27b の発現を指標とした乳がん細胞の単離方法確立

miRNA は主にその標的となる遺伝子の 3'非翻訳領域 (3' untranslated region: 3'UTR) に結合することで遺伝子発現を負に制御する。この性質を利用し、GFP 遺伝子の 3'UTR に miR-27b の相補鎖を挿入したプラスミド (miR-27b Sensor vector: 27bs) を作製し、miR-27b の発現が低下している細胞の可視化を試みる (図 1)。

ER 陽性の乳がん細胞である MCF7 細胞に Sensor vector を導入し細胞株を

樹立し (MCF7-27bs)、タモキシフェン耐性化に伴い miR-27b の発現が低下するかを検討するために、タモキシフェンを 1 ヶ月間 MCF7-27bs 細胞に添加した後に、セルソーターにより GFP 陽性細胞を定量する。また、GFP 陽性細胞 (GFP+) と GFP 弱陽性あるいは発現していない細胞 (GFP^{low/-}) をセルソーターにより分離し、GFP+細胞と GFP^{low/-}細胞を用いて ER、FOXA1 および GATA3 の発現をウェスタンブロットにより検討する。同様の解析をルミナルタイプのヒト乳がん細胞株 T47D 細胞を用いても行う。



2) 実験方法 2: ER 発現低下細胞を検出できる表面マーカーの同定

ER 発現低下細胞において発現が亢進する膜タンパク質を同定するため、miR-27b をノックダウンした MCF7 細胞とコントロールの細胞を用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行なう。また、タンパクレベルでの発現も評価するため、セルソーターを用いた解析も行う。

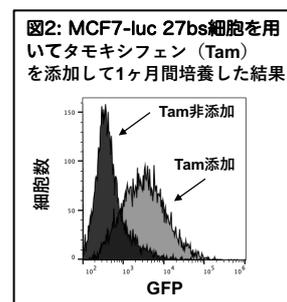
3) 実験方法 3: ER 発現低下細胞の性状解析

ER 発現低下細胞の性状解析を行うことを目的に実験方法 2 で同定した膜タンパク質の発現が亢進した細胞集団と低下した細胞集団をセルソーターにより単離し、RNA sequence により発現プロファイルを作成する。また、このプロファイルを用いてどのような pathway が活性化されるかを検討する。

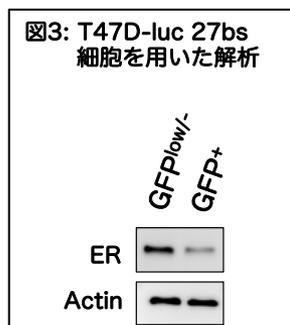
4. 研究成果

1) miR-27b の発現を指標とした乳がん細胞の単離方法確立について

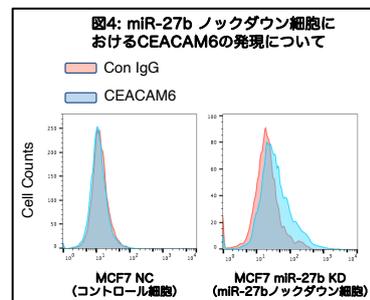
miR-27b の Sensor Vector を発現した MCF7-27bs 細胞に 1 μM の Tamoxifen (Tam) を添加し細胞培養を 1 ヶ月間行なった。Tam 未添加の MCF7-27bs 細胞と比較して GFP 陽性細胞が有意に増加することが明らかとなった (図 2)。



上記と同様の解析を T47D-27bs 細胞を用いて行い、GFP+細胞と GFP^{low}/細胞をセルソーターにより分離し、ER の発現をウェスタンブロットにより検討した。その結果、T47D-27bs においても ER の発現低下が確認された (図 3)。以上のことから、ER が発現低下した細胞において miR-27b の発現が低下していることが明らかとなった。

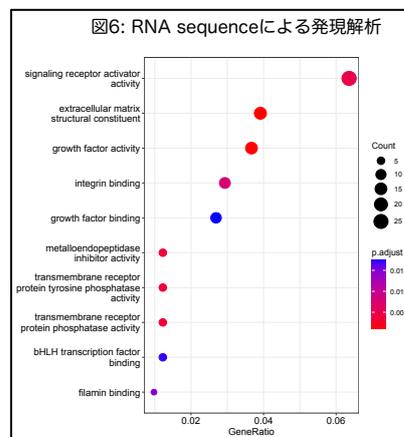
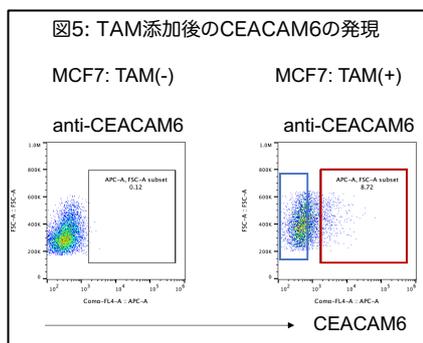


2) ER 発現低下細胞を検出できる表面マーカーの同定について
ER 発現低下細胞において miR-27b の発現が低下していたことから、ER 発現低下細胞として miR-27b をノックダウンした MCF7 細胞 (MCF7 miR-27b KD) を用いた解析を行なった。コントロールの細胞 (MCF7 NC) と MCF7 miR-27b KD とを用いて DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行なった。その結果、miR-27b の発現が低下した MCF7 細胞では膜タンパク質である CEACAM6 の発現が亢進していることが明らかとなった。また、セルソーターを用いた解析からも同様の結果が得られた (図 4)。



3) ER 発現低下細胞の性状解析について

MCF7 細胞に TAM を添加後に CEACAM6 陽性細胞が増加するかをセルソーターにより検討した。その結果、TAM を添加して 72 時間後において CEACAM6 陽性細胞が検出された (図 5)。CEACAM6 陰性細胞と陽性細胞をセルソーターにより分取し、RNA sequence による発現解析を行なった。RNA sequence の結果から pathway 解析を行い、CEACAM6 陽性細胞において特異的に活性化されるパスウェイが明らかとなった (図 6)。今後は、このパスウェイをもとに CEACAM6 陽性細胞が ER 陽性乳がんの悪性化にどのように寄与するかを検討する。特に CEACAM6 陽性細胞で発現亢進がみられた遺伝子群を対象として機能解析を行い、新たな治療標的分子の探索を行う。また、CEACAM6 がホルモン療法の奏効性を評価する有用なマーカーになりうるかについても検討を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Han Jiayan, Hayashi Soichiro, Takahashi Ryou-u, Hirohata Ryosuke, Kurokawa Tomoaki, Tashiro Mizuki, Yamamoto Yuki, Okada Morihito, Tahara Hidetoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Leukocyte Telomeric G-Tail Length Shortening Is Associated with Esophageal Cancer Recurrence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 7385 ~ 7385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm11247385	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 該当する
1. 著者名 Basak Moumita, Chaudhary Dharmendra Kumar, Takahashi Ryou-u, Yamamoto Yuki, Tiwari Swasti, Tahara Hidetoshi, Mittal Anupama	4. 巻 9
2. 論文標題 Immunocyte Derived Exosomes: Insight into the Potential Chemo-immunotherapeutic Nanocarrier Targeting the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 20 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsbmaterials.2c00893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yano Kimiyoshi, Takahashi Ryou-u, Shiotani Bunsyo, Abe Junko, Shidooka Tomoki, Sudo Yuki, Yamamoto Yusuke, Kan Shisei, Sakagami Hiroki, Tahara Hidetoshi	4. 巻 297
2. 論文標題 PRPF19 regulates p53-dependent cellular senescence by modulating alternative splicing of MDM4 mRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100882 ~ 100882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100882	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 -
1. 著者名 Kohama Isaku, Asano Naofumi, Matsuzaki Juntaro, Yamamoto Yusuke, Yamamoto Tomofumi, Takahashi Ryou-u, Kobayashi Eisuke, Takizawa Satoko, Sakamoto Hiromi, Kato Ken, Fujimoto Hiroyuki, Chikuda Hirotaka, Kawai Akira, Ochiya Takahiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Comprehensive serum and tissue microRNA profiling in dedifferentiated liposarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 623-630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12884	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 -

1. 著者名 Nose Daisuke, Shiga Yuhei, Takahashi Ryou-u, Yamamoto Yuki, Suematsu Yasunori, Kuwano Takashi, Sugihara Makoto, Kanda Miyuki, Tahara Hidetoshi, Miura Shin-ichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Association Between Telomere G-Tail Length and Coronary Artery Disease or Statin Treatment in Patients With Cardiovascular Risks A Cross-Sectional Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 338 ~ 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circrep.CR-23-0038	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 -

1. 著者名 MISEV Consortium (Takahashi Ryou-u)	4. 巻 13
2. 論文標題 Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	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) 10.1002/jev2.12404	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 該当する

1. 著者名 Yamamoto Yuki, Takahashi Ryou-u, Kinehara Masaki, Yano Kimiyoshi, Kuramoto Tatsuya, Shimamoto Akira, Tahara Hidetoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Downregulation of Histone H3.3 Induces p53-Dependent Cellular Senescence in Human Diploid Fibroblasts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 543 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes15050543	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 高橋陵宇
2. 発表標題 RPF19 regulates p53-dependent cellular senescence by regulating alternative splicing of MDM4 mRNA
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田 茉奈実、山本 佑樹、高橋 陵宇、岡田 守人、田原 栄俊
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫を抑制する新規の老化関連microRNA
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 陵宇、郷原 菜乃、山本 祐樹、田原 栄俊
2. 発表標題 新規老化関連分子PRPF19はp53を介した細胞老化を制御する
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 佑樹、山下 翔平、上川 優子、高橋 陵宇、田原 栄俊
2. 発表標題 腹膜播種を抑制する新規老化関連マイクロRNAの機能解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山本 佑樹、高橋 陵宇、田原 栄俊
2. 発表標題 新規老化関連マイクロRNAは両鎖ともに膵臓がんの転移に寄与する
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 佑樹, 高橋 陵宇, 田原 栄俊
2. 発表標題 膵がん細胞における老化制御因子PRPF19の機能解析
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本 佑樹, 高橋 陵宇, 田原 栄俊
2. 発表標題 新規老化関連microRNAによる腹膜播種の抑制
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田ノ岡 宏, 井上 文子, 高橋 陵宇, 巽 紘一, 藤川 和男, 長尾 哲二, 石合 正道, 千脇 史子, 青柳 一彦, 佐々木 博己, 落谷 孝広
2. 発表標題 細菌SOS遺伝子mucAB/umuDCのマウスがん促進作用 miR145阻害経路ががん遺伝子Nedd9/Aurkbの活性化
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 健太郎, 山本 佑樹, 西浦 彩花, 澁谷 一成, 高橋 陵宇, 田原 栄俊
2. 発表標題 舌がんを標的とした新規老化関連microRNAの効果
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 早野元詞, 寺尾知可史	4. 発行年 2023年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 133
3. 書名 実験医学 2023年5月号 Vol.41 No.8	

1. 著者名 田中信治	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨牀	5. 総ページ数 144
3. 書名 最新臨床大腸癌学2023	

1. 著者名 腫瘍内科編集委員会 編	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 144
3. 書名 腫瘍内科	

〔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
---------	---------