

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08883

研究課題名(和文) 肺がんの抗がん剤抵抗性に関与する新規遺伝子の同定を目指したRNA修飾酵素の解析

研究課題名(英文) Analysis of RNA modified enzyme for anticancer drug resistance in lung cancer

研究代表者

原田 栄二郎 (HARADA, Eijiro)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90467803

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)：肺癌細胞株に対してドセタキセルおよびペメトレキセドを添加培養した時のRNA修飾酵素遺伝子の発現解析を行い、発現レベルが大きく変化するRNA修飾酵素遺伝子を同定した。そのRNA修飾酵素4遺伝子を個別にノックダウンした肺癌細胞株を作製し、ドセタキセルおよびペメトレキセドを添加培養した時の細胞増殖を観察したところ、ドセタキセルではノックダウン細胞株は感受性を示したが、ペメトレキセドでは感受性を示さなかった。RNA修飾酵素4遺伝子を同時にノックダウンした細胞株を作製し、ペメトレキセドを添加培養した時の細胞増殖を観察したところ、ノックダウンした細胞株は、ペメトレキセドに対して抵抗性を示す結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物療法において、ドセタキセルおよびペメトレキセドは重要な薬剤であるが、その抗癌剤抵抗性に関する機序は十分に解明されていない。近年、RNA修飾に関する研究で、DNAから転写されたmRNAが修飾を受けることで翻訳されるタンパク質の産生量が変化することが報告されており、癌におけるRNA修飾酵素の役割が注目されていることから、抗癌剤抵抗性とRNA修飾に着目して研究を実施した。RNA修飾酵素をノックダウンした細胞株では、ドセタキセルは感受性を示したが、ペメトレキセドは感受性を示さなかった。この結果は、癌細胞の抗癌剤に対する複数の耐性機構を同時に抑制する必要があることを示唆していると考えている。

研究成果の概要(英文)：RNA modified enzyme genes were upregulated in RERF cells in the presence of docetaxel and pemetrexed. Although individually knocked down cells for four RNA modified enzyme genes indicated susceptibility to docetaxel, individually knocked down cells for four RNA modified enzyme genes did not indicate susceptibility to pemetrexed. Simultaneously knocked down cells for four RNA modified enzyme genes did not indicate susceptibility to pemetrexed.

研究分野：癌研究

キーワード：抗癌剤抵抗性 RNA修飾酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌に対する薬物治療において、第3世代抗癌剤であるドセタキセルやペメトレキセドは白金製剤との併用もしくは単独で用いられる重要な役割を担う薬剤である。しかし、治療経過中に癌細胞が抗癌剤に対する抵抗性を獲得することで治療効果が得られなくなり、癌のコントロールが困難となることは大きな問題である。

微小管阻害剤であるドセタキセルの抵抗性に関しては、*mdr-1* 遺伝子によってコードされるP糖蛋白が薬剤を細胞外へ排出することで得られるとされる多剤耐性能によるものや(*Cellular Pharmacol.* 1995;2:303-309)、ドセタキセルの標的であるチューブリンの変異によるもの等が知られている(*J.Clin.Oncol.* 1999;17:1786-1793)。一方、葉酸代謝拮抗剤であるペメトレキセドに関しては、葉酸代謝酵素の発現が高い細胞では抵抗性があるとする報告が散見される(*Cancer* 2006;107:1589-1601)。しかし、これらの抗癌剤抵抗性に関与するとされる遺伝子の発現レベルが変化する機序は不明である。

近年、DNAからの転写産物であるRNAが修飾されるエピトランスクリプトームという概念が注目を集めており、現在までに100種類以上のRNA修飾が報告されている(*Cell.* 2017;169:1187-1200)。DNAから転写されたmRNAは様々な酵素(RNA修飾酵素)により修飾を受けており、修飾を受けたmRNAは安定性が増加することで多くのタンパク質の産生を促すことや、修飾を受けたmRNAが分解されやすくなりタンパク質の産生が少なくなることが判明しており、RNA修飾を起こすRNA修飾酵素に関する研究が行われている。

RNA修飾酵素の1つであるMETTL3 (methyltransferase-like 3、別名MTA70)はEGFR (epidermal growth factor receptor) とTAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) のmRNAを修飾し、EGFR mRNAとTAZ mRNAの翻訳が促進されることで非小細胞肺癌の悪性度を高めることが報告された(*Mol Cell.* 2016;62:335-45)。また、このMETTL3が、microRNA-33aにより抑制されると、非小細胞肺癌の増殖が抑制されたことが報告されている(*Biochem Biophys Res Commun.* 2017;482:582-589)。また、METTL3が、膀胱癌細胞株において、抗癌剤抵抗性に関与していることが報告されているが(*Int J Oncol.* 2018;52:621-29.)、肺癌ではRNA修飾酵素と抗癌剤抵抗性の報告はない。

2. 研究の目的

ドセタキセルおよびペメトレキセドの存在下における、肺癌細胞株のRNA修飾酵素遺伝子の発現解析、および、肺癌細胞株のRNA修飾酵素遺伝子のノックダウンによる影響を解析する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株

肺癌細胞株は日本人由来のRERF-LC-AIを使用した。

(2) ドセタキセルおよびペメトレキセドの存在下でのRNA修飾酵素遺伝子のqPCR解析

ドセタキセルおよびペメトレキセドをそれぞれ最終濃度が100nMになるように添加した培地で、RERF-LC-AIを48時間培養後、total RNA抽出、cDNA作製を行い、qPCRで、代表的なRNA修飾酵素遺伝子の発現変化をqPCRで解析した。

(3) RNA修飾酵素遺伝子ノックダウン細胞株

RERF-LC-AIに対して、shRNAレンチウイルスベクターを導入することで、RNA修飾酵素遺伝子であるAHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2をノックダウンした細胞株を作製した。

AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDFの4つの遺伝子それぞれに対する特異的な配列を導入したshRNAを2つずつ作製し、ノックダウン効率をqPCRで解析した。

また、AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDFの4つの遺伝子を同時にノックダウンするために、4つのshRNAレンチウイルスベクターを同時に細胞株に導入し、ノックダウン効率をqPCRで解析した。

(4) RNA修飾酵素遺伝子ノックダウン細胞株に対するドセタキセルおよびペメトレキセドの細胞増殖効果

AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2を個別にノックダウンした細胞株に対して、ドセタキセルおよびペメトレキセドを単独で様々な濃度で添加培養することで、ノックダウン細胞株の細胞増殖を顕微鏡で観察した。

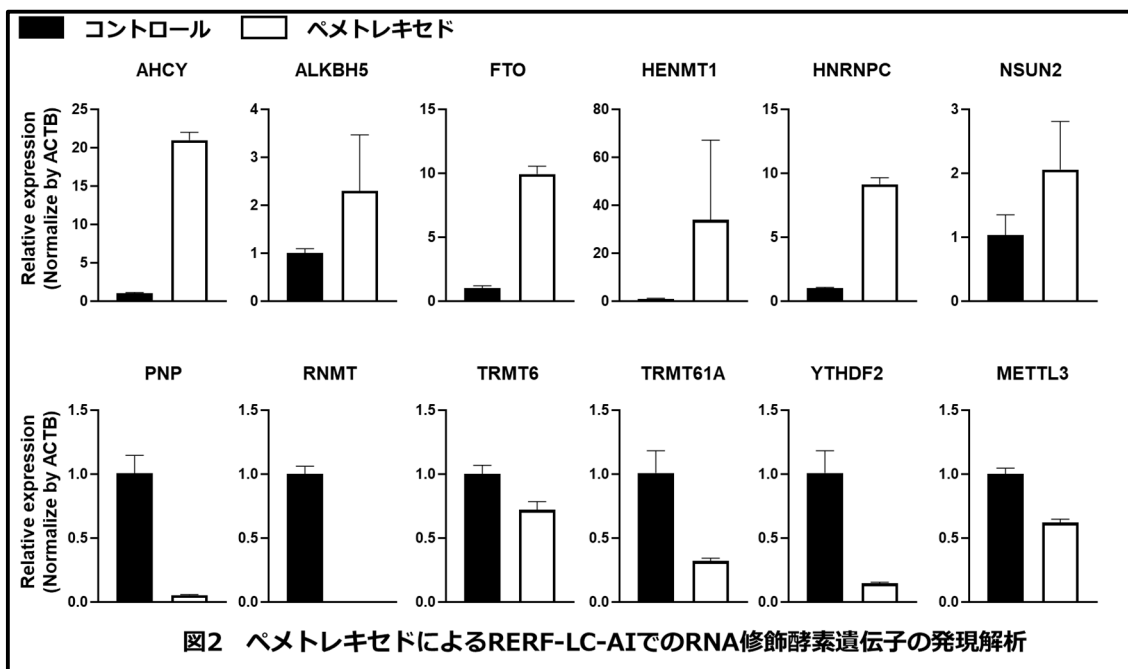
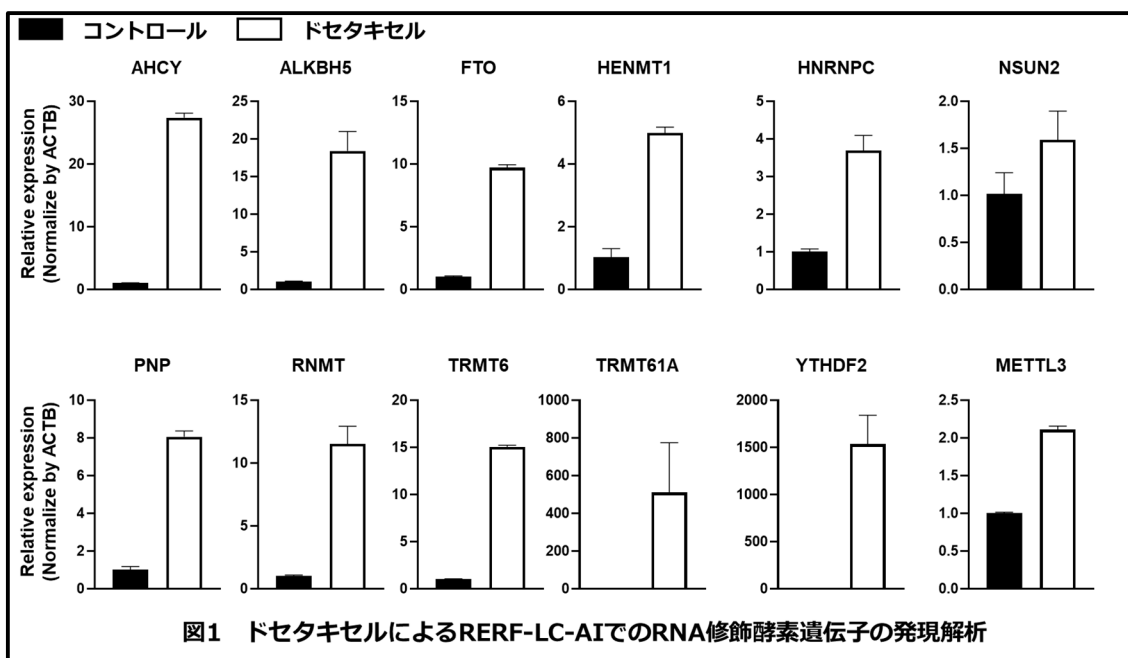
AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2を同時にノックダウンした細胞株に対して、ドセタキセルおよびペメトレキセドを単独で様々な濃度で添加培養することで、ノックダウン細胞株の細胞増殖を顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) ドセタキセルおよびペメトレキセドによる RNA 修飾酵素遺伝子の発現解析

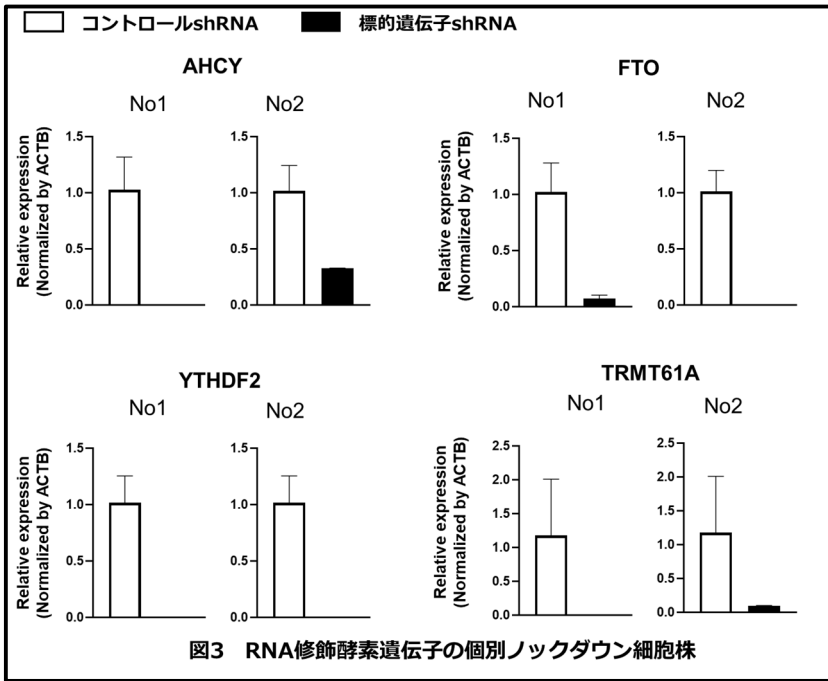
ドセタキセルの添加 (図 1) では、12 種類の遺伝子のうち AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 の 4 種類の遺伝子の発現がコントロールに比べ 10 倍以上上昇した。

ペメトレキセドの添加 (図 2) では 12 種類の遺伝子のうち AHCY、FTO、HENMT1、HNRNPC の 4 種類の遺伝子の発現がコントロールに比べ 10 倍以上上昇した。



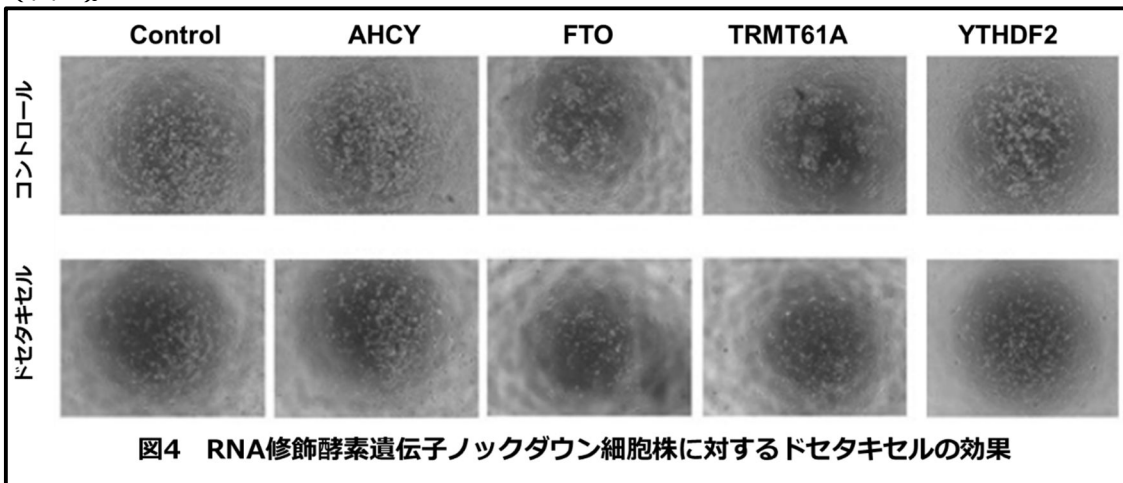
(2) RNA 修飾酵素遺伝子の個別ノックダウン細胞株

AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 の 4 遺伝子それぞれに対して異なる 2 箇所に特異的な配列を発現する shRNA レンチウイルスベクターを導入した RERF-LC-AI に対して、qPCR 解析を行ったところ、AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 の 4 遺伝子が、個別にノックダウンされていることを確認した (図 3)。

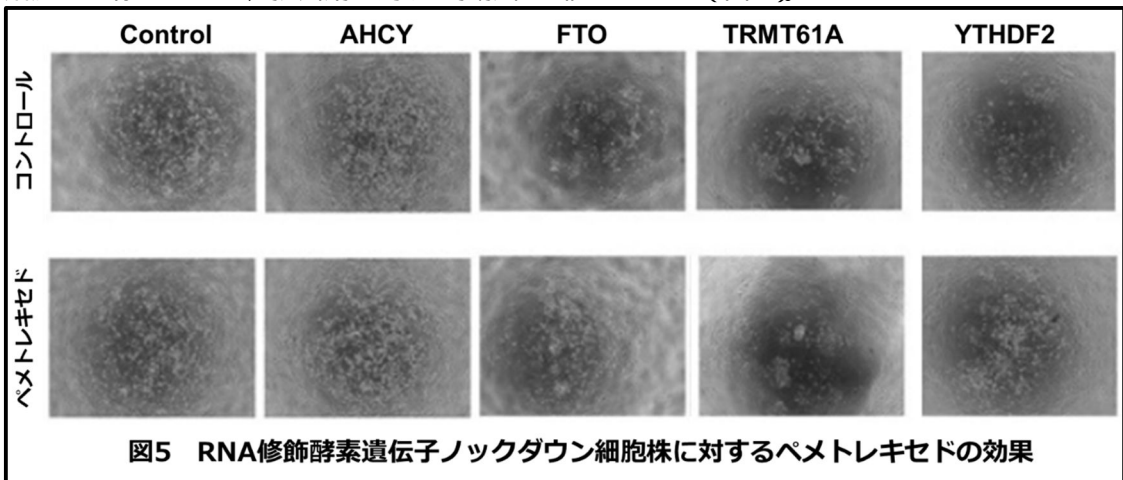


(3) ノックダウン細胞株に対してドセタキセルおよびペメトレキセドを単独添加した時の細胞増殖効果

AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 を個別にノックダウンした細胞株にドセタキセル (50nM) を添加した結果、すべての遺伝子において細胞が死滅し、ドセタキセルに対する感受性が認められた (図4)。



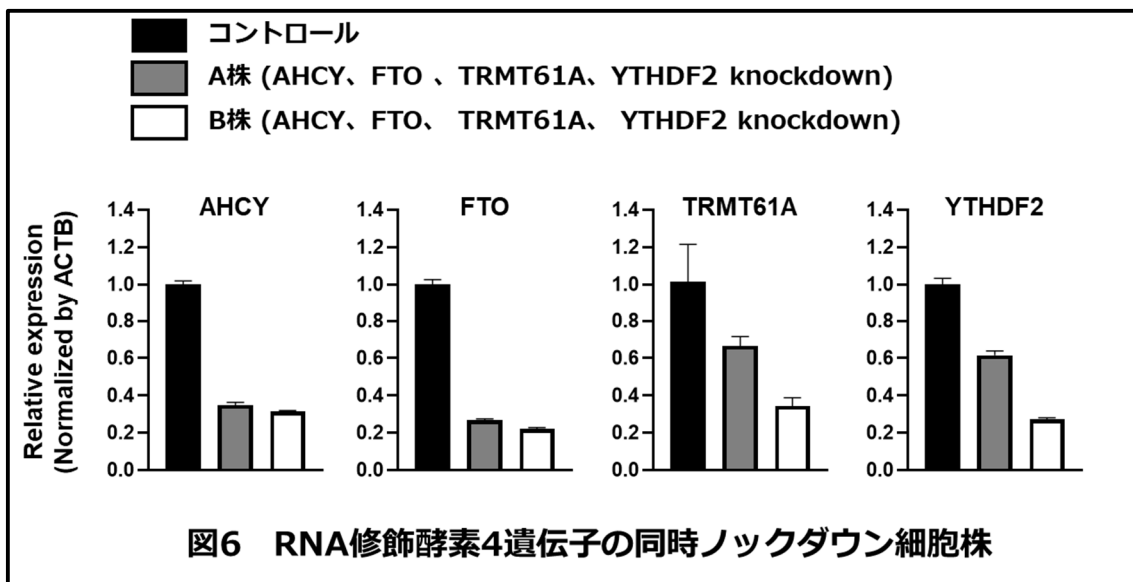
AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 を個別にノックダウンしたペメトレキセド (50 μM) の添加では細胞は生存しており、抗癌剤に対する抵抗性が認められた (図5)。



(4) RNA 修飾酵素 4 遺伝子の同時ノックダウン細胞株

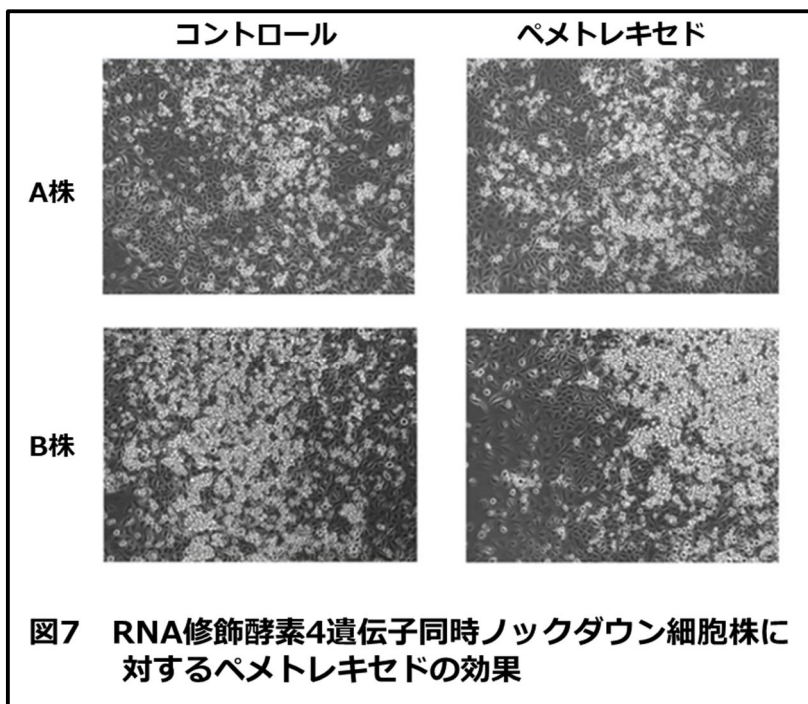
RERF-LC-AI に対して、AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 を個別にノックダウンする shRNA レンチウイルスベクターを同時に導入し qPCR 解析を行ったところ、AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 の 4 遺伝子がノックダウンされていることを確認した (図 6)。

A 株と B 株は、AHCY、FTO、TRMT61A、YTHDF2 それぞれの No1 と No2 の shRNA レンチウイルスベクターをそれぞれ導入して作製した。



(5) RNA 修飾酵素 4 遺伝子の同時ノックダウン細胞株に対するペメトレキシドの細胞増殖効果

RNA 修飾酵素 4 遺伝子の同時ノックダウン細胞株に対して、ペメトレキシド (50nM) の添加では細胞は生存しており、抗癌剤に対する抵抗性が認められた (図 7)。



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 Keisuke Iwamoto, Toshiro Saito, Yoshihiro Takemoto, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Tomoko Furuya-Kondo, Hiroshi Kurazumi, Yuya Tanaka, Yohei Taura, Eijiro Harada, Kimikazu Hamano	4. 巻 13
2. 論文標題 Autologous transplantation of multilayered fibroblast sheets prevents postoperative pancreatic fistula by regulating fibrosis and angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 1257-1268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田栄二郎、岩本圭亮、佐藤陽子、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 E-PASSから見た高齢者上部胃癌に対する腹腔鏡下胃切除術の短期・長期成績
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩本圭亮、上野耕司、田中裕也、竹本圭宏、原田栄二郎、濱野公一
2. 発表標題 自家積層線維芽細胞シート移植による術後食道吻合部の組織修復への影響
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田栄二郎、岩本圭亮、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 高齢者（80歳以上）に対する腹腔鏡下直腸癌手術の治療成績
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田栄二郎、須藤優太郎、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 体内吻合による腹腔鏡下右側結腸切除術の周術期成績と炎症反応推移の特徴
3. 学会等名 第35回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田栄二郎、田浦洋平、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 Satge 大腸癌における術後6ヶ月以内再発症例の臨床病理学的特徴
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田栄二郎、田浦洋平、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 Stage 大腸癌における術前Lymphocyte-monocyte ration測定の意義
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田栄二郎、田中裕也、竹本圭宏、濱野公一
2. 発表標題 高齢者胃癌に対する腹腔鏡下胃全摘術の予後
3. 学会等名 第34回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	村上 順一 (MURAKAMI Junichi) (10725683)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	
研究分担者	田中 俊樹 (TANAKA Toshiki) (50457305)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	竹本 圭宏 (TAKEMOTO Yoshihiro) (50622213)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

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
---------	---------