

令和 2 年 7 月 4 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08950

研究課題名(和文)新規タキサン耐性獲得マーカーの臨床応用に向けて

研究課題名(英文)The clinical application of the new taxane resistance marker

研究代表者

田中 覚 (Tanaka, Satoru)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50595741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株MCF-7を用いてタキサン(パクリタキセル)耐性乳癌細胞株を作成した。プロテオーム解析により2種のタンパク(PPIA, STMN1)が耐性獲得に寄与することが示唆された。このタンパクをノックダウンすると薬剤耐性が一部改善された。また本研究では抗癌剤耐性に関連が示唆されているタンパク(ABCB1)とmicroRNAとの関連性にも着目しており、一部のmicroRNAが耐性に関与していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移・再発乳癌は、ホルモン療法・抗がん剤治療・放射線治療などの集学的治療を用いても依然予後不良な病態である。特に原因として、抗癌剤耐性獲得による奏効率の低下があげられる。本研究では抗癌剤(タキサン系)耐性獲得の機序に関連するタンパクを同定し、耐性獲得マーカーとして臨床応用することを目的とした。本研究期間内で臨床応用の可能性を検討するには至らなかったが、本研究ではタキサン耐性獲得マーカーとして臨床応用が期待されるタンパク質およびmicroRNAの一部同定に成功しており、今後の臨床応用に向けた基礎的な解析を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：Paclitaxel-resistant subclone was made from breast cancer cell line MCF-7. Two proteins (PPIA, STMN1) were found out as candidates of drug resistance marker by proteome assay. The knock-down of these proteins significantly improved the drug resistance of paclitaxel. Furthermore, we focused on ABCB1, known as a protein of the drug resistance, and microRNAs bind to it. Our results suggest that these proteins and microRNAs can be markers of drug resistance.

研究分野：乳癌外科

キーワード：タキサン 耐性 乳癌 PPIA STMN1 ABCB1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌治療においては、手術や放射線照射といった局所治療と全身治療である薬物治療(化学療法、内分泌療法、分子標的治療)の組み合わせが重要であり、化学療法としては、癌の悪性度、進行度から予想される再発リスクに応じ、アンスラサイクリン系薬剤やタキサン系薬剤が用いられる。

一方、進行再発乳癌に対しては、上記薬剤に加え種々の化学療法剤が用いられ、各種臨床試験にてこれらの治療の有効性が報告されているものの、奏効率は30-60%程度であり完全奏効率は数%にすぎない。このように進行再発乳癌は依然として予後不良の疾患であり、その大きな要因として、抗癌剤に対する感受性の低下(耐性獲得)が挙げられる。タキサン系抗癌剤は、乳癌患者に対して用いる代表的な薬剤であるが、長期・反復投与によって耐性を獲得する。

我々は、これまでに耐性獲得機序の解明と耐性マーカーの同定を目的としてプロテオーム解析を行ってきた。耐性獲得のモデルとして用いたヒト乳癌由来の培養細胞 MCF-7 およびパクリタキセルに耐性を獲得した細胞株(以下、MCF-7/PTX)で発現するタンパク質を、改良型等電点電気泳動(IPG)法(従来法の欠点を克服し再現性・試料添加量を増やした方法)で解析し、耐性獲得によって発現量が変化したスポットを確認し、質量分析(MS)でタンパク質を同定した。

その結果、耐性株ではアポトーシスに關与する複数のタンパク質が全体としてアポトーシスが減弱する方向に発現変動していた。従って、耐性株ではパクリタキセルで引き起こされるアポトーシスが起こりにくくなっており、これが耐性獲得の一因であると考えられた。

2. 研究の目的

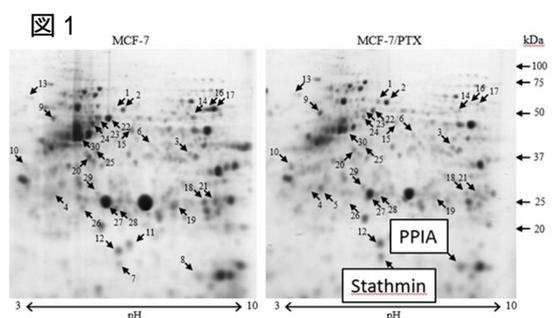
これまでに我々は、乳癌治療で用いる代表的な化学療法剤であるタキサン系薬剤に着目し、抗癌剤耐性獲得のプロテオーム解析をおこない、タキサン系抗癌剤に対する感受性の低下との關連が考えられるタンパク質を見出している。本研究は、その中の2つ(PPIAとSTMN1)に注目し、これらが耐性獲得マーカーとして臨床応用できるか、その有用性について患者血清を用いて検討し、抗癌剤耐性獲得機序の解明を目指すこととした。

3. 研究の方法

本研究では、これまでのMCF-7およびMCF-7/PTXにおいて、PPIAとSTMN1についてWB・ECL法にて蛋白質レベルで確認し、さらにRT-PCR法で遺伝子レベルの発現を確認する。また、siRNAの手法を用いて、耐性獲得株でのPPIAとSTMN1の発現を減弱させ、薬剤耐性の減弱を確認する。また、タキサン系薬剤使用予定の進行再発乳癌患者を対象に、使用前、使用中、使用後の血清を経時的に採取し、ELISA法を用いて量的検討を行い、薬剤の抗腫瘍効果と關連させて、それら蛋白質の薬剤耐性獲得マーカーとしての臨床的有効性を検討するという計画で研究を始めた。

4. 研究成果

(1)パクリタキセル耐性獲得乳癌細胞株を用いてその蛋白質を分離した解析において、親株と耐性株において発現の違いを認めるスポットを見出した(図1)また、PPIAが乳癌細胞におけるパクリタキセル耐性の關連タンパク質の1つであることを証明し(図2)PPIAをノックダウンすることで、パクリタキセルへの耐性が一部解除されることを見出した(図3)。以上



の結果をまとめ論文として成果を発信した
(Oncol Lett. 2017 13: 289-295)、

(2) PPIA と同様に SYMN1 について WB で解析を実施したが、IPG 法の結果と相関性が得られなかった。また IPG 法で MCF-7/PTX で発現変動が見られた他の分子についても一部検証を実施したが PPIA 時に認められた様な結果を得ることはできなかった。

(3) 前記の結果から、バイオマーカーとして探索する標的をタンパク質とは別の分子から探索する方針が望ましいと判断した。近年、20 塩基程度からなる微小機能性核酸である microRNA (miRNA) が、標的遺伝子の非翻訳領域に結合し、標的遺伝子発現を負に制御することで機能を発揮することが知られており、DNA 塩基配列の異常を伴わない遺伝子発現調節の代表的機構の1つであると考えられている。特に癌では、miRNA の発現異常が発癌や癌の進展に寄与することが知られており、新規バイオマーカーとして期待されている。

そこで、パクリタキセルを含めた化学療法耐性機構に、miRNA の発現異常が関与していないかを探索することとした。親株である MCF - 7 と耐性株 MCF - 7 /PTX の RNA を抽出し、次世代シーケンサーで non-coding RNA の網羅的解析を行った。解析結果からは、miRNA の他にも、PIWI-interacting RNA や、small nucleolar RNA などが含まれており、耐性株中における miRNA の割合は 10% 程度であった。一方、親株では、30% 程度の割合を miRNA が占めており (図 4)、パクリタキセル耐性を獲得する間に miRNA の生合成自体が変化している可能性が示唆された。

図 2

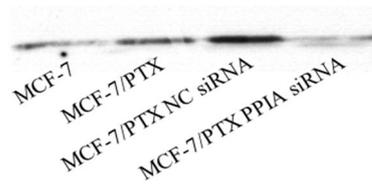


図 3

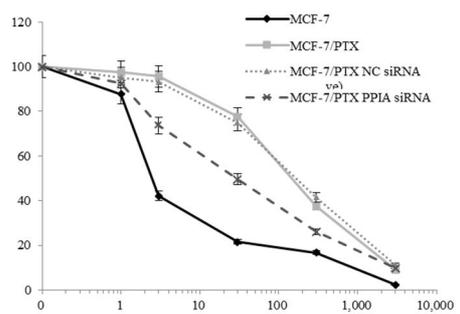
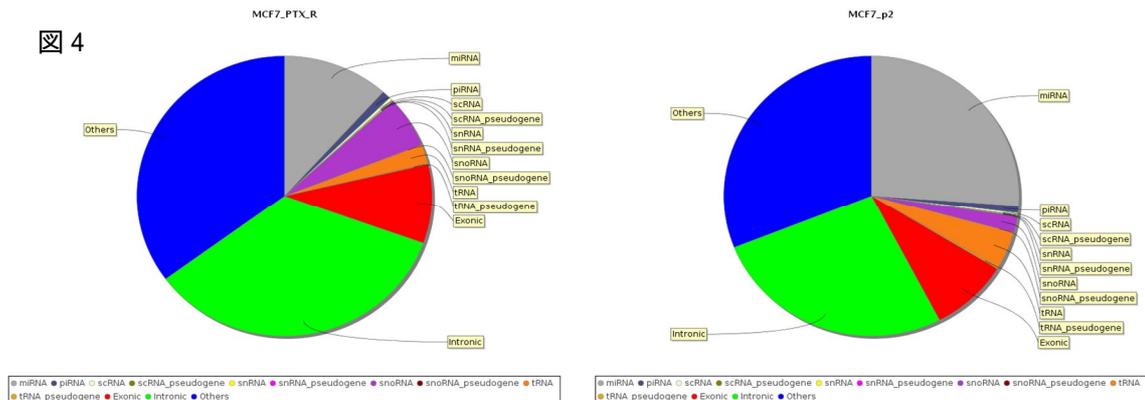


図 4



また、解析結果から、MCF-7/PTX で発現が 10 倍以上に上昇する miRNA を 4 種、および発現が 10 倍以下に低下する miRNA を 29 種同定した。現在、機能を解析する対象とする miRNA の選定を行う為に、miRNA 関連のデータベース (Target Scan、miRDB、miWalk など) を用いて標的遺伝子群のうち化学療法耐性に関わる遺伝子の抽出を行っている。

その過程で、P 糖タンパクで ATP-binding Cassette (ABC) トランスポーターとして多剤耐性に関与する、ABCB1 の発現が MCF-7/PTX で上昇していることが明らかになったため、ABCB 1 を調節する miRNA に照準を絞り、解析を続けている。選定した miRNA がパクリタキセル耐性に関与することを同定した後に、本研究の主題の一つでもあった、耐性獲得マーカーとして臨床応用できるかという有用性について患者血清を用いて検討したいと考えている。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroya Fujioka, Akiko Sakai, Satoru Tanaka, Kosei Kimura, Akiko Miyamoto, Mitsuhiko Iwamoto, Kazuhisa Uchiyama	4. 巻 13
2. 論文標題 Comparative proteomic analysis of paclitaxel resistance-related proteins in human breast cancer cell lines.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ONCOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 289-295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2016.5455	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

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪医科大学 一般・消化器外科学教室 研究室 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/sur/html/laboratory.html

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