

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08784

研究課題名(和文) 抗がん剤抵抗性非小細胞肺癌に対するRNA修飾酵素の役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of RNA-modifying enzymes in anticancer drug-resistant non-small cell lung cancer

研究代表者

田中 俊樹 (Tanaka, Toshiki)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50457305

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)：肺癌治療では、抗癌剤抵抗性を獲得することが問題となる。そこで、抗癌剤抵抗性とRNA修飾に着目して研究を行った。ドセタキセル、ペメトレキセドに対する抗癌剤抵抗性LLC細胞株を樹立した。続いて、LLC細胞株と抗癌剤抵抗性LLC細胞株におけるRNA修飾酵素の発現を解析したところ、抗癌剤抵抗性の有無で複数のRNA修飾酵素の遺伝子発現が変化していた。更に、抗癌剤の投与期間が長くなるにつれて、RNA修飾酵素の発現レベルが上昇したことから、RNA修飾酵素と抗癌剤抵抗性に何らかの関係があることが示唆された。今後、抗癌剤抵抗性の獲得に真に関係するRNA修飾酵素の同定を目指して研究を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、非小細胞肺癌におけるドセタキセルおよびペメトレキセドの耐性メカニズムを、mRNAのRNA修飾の観点から解明することである。本研究によりRNA修飾酵素と抗癌剤抵抗性との関係性が明らかになった。将来的な臨床応用として、RNA修飾酵素の発現が抗癌剤感受性のマーカーとなる可能性があること、また、RNA修飾酵素を標的とした薬剤の開発により抗癌剤抵抗性を喪失させることが可能となるといったことが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Anti-cancer drug-resistant is a major problem in the treatment of lung cancer. Therefore, we focused on anticancer drug resistance and RNA modification. An anti-cancer drug-resistant LLC cell line against docetaxel and pemetrexed was established. Subsequently, when the expression of RNA modifying enzymes in the LLC cell line and the anticancer drug resistant LLC cell line was analyzed, the gene expression of a plurality of RNA modifying enzymes was changed depending on the presence or absence of anticancer drug resistance. Furthermore, the expression level of RNA-modifying enzyme increased as the administration period of the anti-cancer drug increased, suggesting that there is some relationship between RNA-modifying enzyme and anti-cancer drug resistance. We will continue our research with the aim of identifying RNA-modifying enzymes that are truly involved in the acquisition of anti-cancer drug resistance.

研究分野：肺癌

キーワード：抗癌剤抵抗性 RNA修飾 非小細胞肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手術適応とならない非小細胞肺癌の治療において、白金製剤を含む 2 剤併用化学療法は重要な選択肢である。その一方で、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。シスプラチンなどの白金製剤の併用薬として用いられる第 3 世代抗癌剤であるドセタキセルやペメトレキセドに対する抗癌剤抵抗性の獲得に関する分子メカニズムは報告されておらず、非小細胞肺癌に対する薬物治療において重要な役割を担う薬剤に対する耐性メカニズムを解明することは重要な課題である。

我々は、近年注目を集めている RNA 修飾による mRNA の安定性という RNA エピジェネティクスに着目した。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で、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産生を促すことや、修飾を受けることで mRNA は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報告されている。非小細胞肺癌細胞株を用いた実験において、RNA 修飾酵素の 1 つである METTL3 (methyltransferase-like 3、別名 MTA70) は非小細胞肺癌細胞の悪性度を増加させることが報告された (Mol Cell. 2016;62:335-45)。しかし、非小細胞肺癌において RNA 修飾と抗癌剤抵抗性に関する研究は報告されていない。

そこで我々は、癌細胞が抗癌剤に暴露されることで、抗癌剤抵抗性に関わる遺伝子の mRNA が RNA 修飾を受け、タンパク質の発現が変化することが抗癌剤抵抗性の獲得に寄与しているのではないかという仮説を立てて研究することとした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、非小細胞肺癌におけるドセタキセルおよびペメトレキセドの耐性メカニズムを、mRNA の RNA 修飾という RNA エピジェネティクスの観点から抗癌剤抵抗性のメカニズムを解明することである。

本研究により RNA 修飾酵素と抗癌剤抵抗性との関係性が明らかになれば、将来的な臨床応用として、RNA 修飾酵素の発現が抗癌剤感受性のマーカーとなる可能性があること、また、RNA 修飾酵素を標的とした薬剤の開発により抗癌剤抵抗性を喪失させることが可能となるといったことが挙げられる。

3. 研究の方法

(1) ドセタキセル、ペメトレキセド投与による RNA 修復酵素の発現変化の解析

LLC 細胞株にドセタキセル、ペメトレキセドを 3 日間投与し、RNA 修飾酵素 (ALKBH5、HENMT1、NSUN1、RNMT) の発現を qRT-PCR で解析する。

(2) ドセタキセル耐性およびペメトレキセド耐性 LLC 細胞株の樹立

ドセタキセル、ペメトレキセドを含んだ細胞培養液で LLC 細胞株を長期間 (5 ヶ月間) にわたって継代培養することで、抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株を樹立する。

(3) 抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株における RNA 修飾酵素の発現変化の解析

LLC 細胞株と抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株における mRNA に関する RNA 修飾酵素の発現レベルを qPCR で解析して、比較する。

代表的な 11 個の RNA 修飾酵素 (AHCY、ALKBH5、FTO、HENMT1、HNRNPC、NSUN2、PNP、RNMT、TRMT6、TRMT61A、YTHDF2) と、既に非小細胞肺癌細胞株において報告されている RNA 修飾酵素である METTL3 に関して、LLC 細胞株と抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株における RNA 修飾酵素の発現を qRT-PCR で解析する。

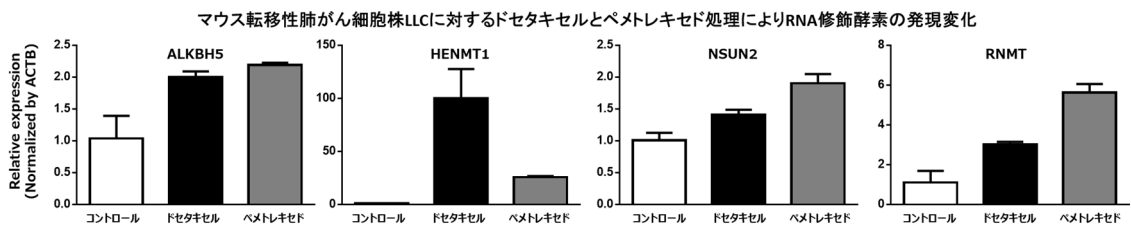
(4) 抗癌剤処理による RNA 修飾を受けた mRNA の網羅的解析

Anti-N6-methyladenosine (m6A) 抗体を用いて、免疫沈降により m6A 修飾を受けた mRNA を単離する。RNA 修飾 (m6A 修飾) を受けた mRNA をマイクロアレイにより網羅的解析をする。

4. 研究成果

(1) ドセタキセル、ペメトレキセド投与による RNA 修復酵素の発現変化の解析

抗癌剤投与により RNA 修飾酵素 (ALKBH5、HENMT1、NSUN1、RNMT) の発現レベルが変化することから、癌遺伝子、癌抑制遺伝子の mRNA の RNA 修飾が起こることが抗癌剤抵抗性の獲得に関与している可能性があることが示唆された。



(2) ドセタキセル耐性およびペメトレキセド耐性 LLC 細胞株の樹立

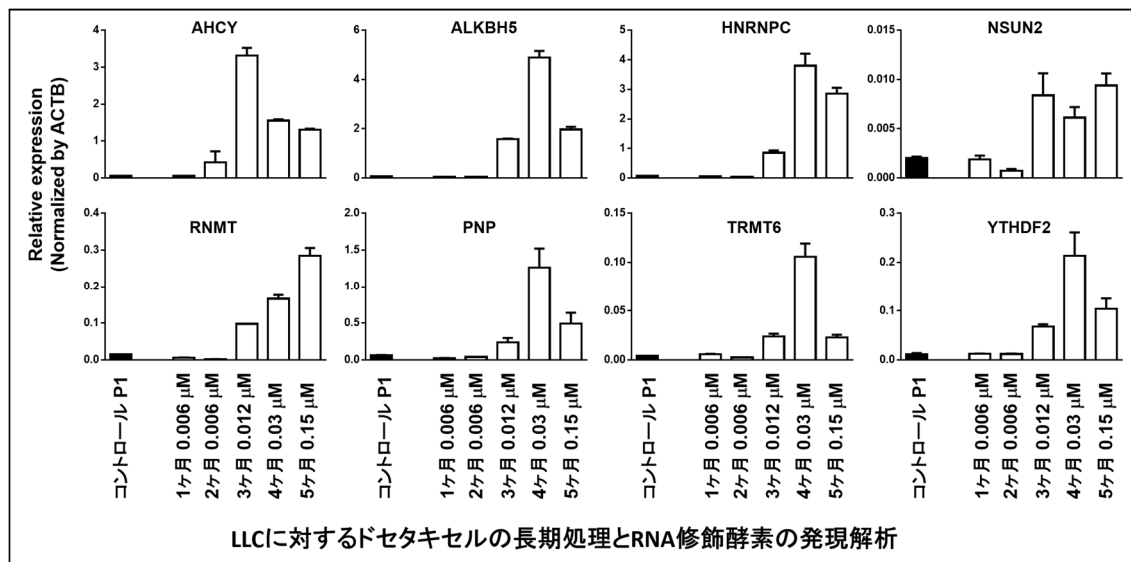
LLC をドセタキセル、ペメトレキセドを以下の濃度で投与し、1~5 か月間にわたって継代培養することで抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株を樹立した。

ドセタキセル 1 か月目：0.006mM、2 か月目：0.006mM、3 か月目：0.012mM
4 か月目：0.03mM、5 か月目：0.12mM

ペメトレキセド 1 か月目：0.075mM、2 か月目：0.075mM、3 か月目：0.075mM
4 か月目：0.15mM、5 か月目：0.12mM

(3) 抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株における RNA 修飾酵素の発現変化の解析

マウス転移性肺癌細胞株 LLC に対してドセタキセルを 5 か月間、低濃度から徐々に濃度を上げていくことで作製した抗癌剤抵抗性細胞株における RNA 修飾酵素の遺伝子発現を解析した。ドセタキセルの濃度が上昇するに比例して、RNA 修飾酵素の発現レベルも上昇する結果となった。AHCY、ALKBH5、HNTNPC、NSUN2、RNMT、PNP、TRMT6、YTHDF2 といった複数の RNA 修飾酵素の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。更に、抗癌剤の投与期間が長くなるにつれて、RNA 修飾酵素の発現レベルが上昇したことから、RNA 修飾酵素と抗癌剤抵抗性に何らかの関係があることが示唆された。



(4) 抗癌剤処理による RNA 修飾を受けた mRNA の網羅的解析

LLC 細胞株、抗癌剤抵抗性 LLC 細胞株からそれぞれ mRNA を抽出し、RNA 修飾を認識する抗体である抗 N6-methyladenosine 抗体を用いて免疫沈降実験を行い、RNA 修飾を受けた mRNA を単離して、RNA チップ解析で網羅的解析を行ったところ、抗癌剤抵抗性の獲得の有無で RNA 修飾を受けている mRNA が変化することが判明した。

今後、抗癌剤抵抗性の獲得に真に関係する RNA 修飾酵素の同定を目指して研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	上田 和弘 (Ueda Kazuhiro) (90420520)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	上野 耕司 (Ueno Koji) (30736070)	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