

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08971

研究課題名(和文) microRNA機能解析によるパクリタキセル耐性機序の解明と不応性の克服

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of paclitaxel resistance by microRNA functional analysis and overcoming refractoriness

研究代表者

木村 光誠 (Kimura, Kosei)

大阪医科薬科大学・医学部・講師

研究者番号：20623846

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)：進行再発乳癌は予後不良であり、薬剤耐性の獲得が主な原因とされる。本研究では、Paclitaxel (PTX) に対する薬剤耐性機序をmicroRNA (miRNA) の発現変化から解明を試みた。MCF-7(親株)とMCF-7/PTXR(耐性株)に対し、miRNAの次世代シーケンス解析を実施し、薬剤耐性に関与するmiRNAと、既知のABCB1を標的とするmiRNAの同定を行った。解析結果から、miRNA-455-3pが薬剤耐性機序に関与することが示唆された。miRNA-455-3pを耐性株に導入すると、ABCB1の発現が低下し、PTX耐性が部分的に解除されることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究からmiRNA-455-3pの発現低下によりABCB1の発現が亢進し、PTX耐性に寄与した可能性が示唆された。miRNAの導入実験から、miRNA-455-3pがABCB1の翻訳抑制を介し、PTX耐性を一部解除していることも示唆された。PTXはABCB1の基質であり、ABCB1タンパクの発現低下によりPTXの排出が抑制される。この研究は、miRNA-455-3pがPTX耐性の調節に重要な役割を果たすことを明らかにし、ABCB1を標的とした新たな治療戦略の可能性や、PTX耐性の機序解明を通じて、耐性克服のための新規治療法やサロゲートマーカーの開発に向けた基盤を提供する点でも重要である。

研究成果の概要(英文)：Progressive recurrent breast cancer has a poor prognosis, primarily due to the acquisition of drug resistance. This study aimed to elucidate the mechanism of drug resistance to Paclitaxel (PTX) through changes in the expression of microRNAs (miRNAs). Next-generation sequencing analysis of miRNAs was performed on MCF-7 (parental) and MCF-7/PTXR (resistant) cell lines to identify miRNAs associated with drug resistance, including those targeting the known drug resistance gene ABCB1. The results suggested that miRNA-455-3p is involved in the mechanism of drug resistance. Introducing miRNA-455-3p into the resistant cell line resulted in decreased expression of ABCB1 and partial reversal of PTX resistance.

研究分野：乳腺外科

キーワード：micro RNA パクリタキセル耐性株 ABCB1 抗癌剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行再発乳癌は、ホルモン療法、化学療法、分子標的治療、放射線治療などの集学的治療を用いても依然として予後不良である。その原因として、化学療法薬耐性獲得による奏功性の低下が挙げられる。この問題を克服するためには、化学療法薬耐性獲得の機序をより詳細に解明する必要がある。

2. 研究の目的

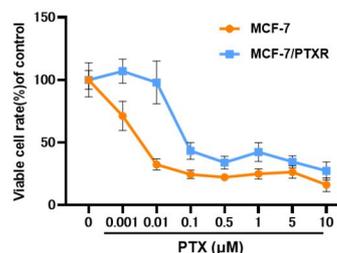
本研究では、乳癌化学療法で頻用する Paclitaxel (以下 PTX) の薬剤耐性機序を microRNA (miRNA) の発現変化から解明することを目的とし、進行再発乳癌の予後改善に向けた検討を実施した。miRNA はわずか 7-8 塩基が標的遺伝子の mRNA に相補的に結合し、標的遺伝子の翻訳を抑制するため、1 種の miRNA が多数の遺伝子発現を調整する。よって、miRNA の変化を解析することで、化学療法薬耐性機構をよりシステムとして捉えることが特徴である。また、先行研究で樹立した PTX 耐性株を用いることも本研究の特徴である。同定した miRNA の標的遺伝子を解析することで、これまで焦点の当たっていなかった新規の PTX 耐性に関わる遺伝子を同定できる可能性がある。化学療法不応症例に対する新規治療法として miRNA 創薬の可能性を検証するとともに、PTX 治療のサロゲートマーカー導出に向けた研究基盤を構築することを目的としている。

3. 研究の方法

本研究で使用する細胞は MCF-7 (親株) および、先行研究で PTX 長期曝露により樹立した MCF-7/PTXR (PTX 耐性株) である。MCF-7 と MCF-7/PTXR に対し、miRNA の次世代シーケンス (NGS) 解析を実施し、miRNA の挙動を網羅的に解析した。MCF-7/PTXR で発現が低下する miRNA の内、発現が 10 分の 1 に低下するものに対し、データベース (Target Scan : https://www.targetscan.org/vert_80/) を用いて標的遺伝子群のうち化学療法薬耐性に関わる遺伝子を抽出した。また、PTX 耐性機序に関わる既知の分子についても RT-PCR やウェスタンブロットティング (WB) で発現解析を行った。これらの結果から選定した miRNA に対し、NGS 結果が妥当であるか RT-PCR 法で再確認した。また、選定 miRNA 導入群と親株を用いて、ABCB1 の発現を WB と RT-PCR 法を用いて比較した。さらに、標的遺伝子の相補塩基配列部位を組み込んだプラスミド (野生型) と相補塩基部位に変異を組み込んだプラスミド (変異型) を作製し、Luciferase Reporter Assay を行った。選定 miRNA を MCF-7/PTXR に導入し、その後 PTX を投与し、MTT アッセイを用いて、コントロール miRNA 群と、選定 miRNA 導入群で PTX に対する IC₅₀ を比較検討した (併用実験)。最後に同定した標的遺伝子である ABCB1 の siRNA を用いて PTX 耐性の解除効果を検討した。

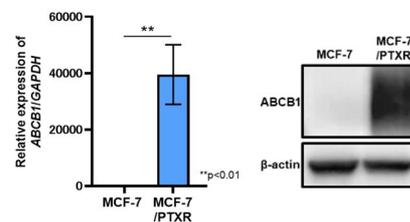
4. 研究成果

まずは耐性株に耐性がついていることを確認するため、親株と耐性株の MTT アッセイを施行し、IC₅₀ を調べると、約 25 倍の耐性がついていることがわかった。既知の PTX 耐性分子の内、PTX の細胞外排出を行う P 糖タンパクである ABCB1 の発現亢進も認めており、ABCB1 を標的とする miRNA 群の探索を進めた。ABCB1 を標的とする遺伝子を 3 つのデータ

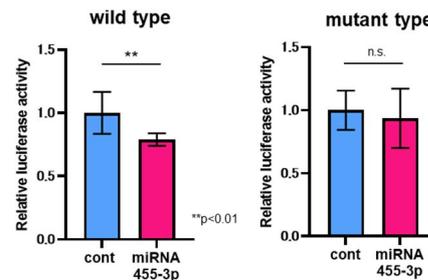


データベース (Target Scan, miRDB: <https://mirdb.org/>, miRWalk: <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) で調べると、唯一共通して検出されたものが miRNA-455-3p であった。これらの結

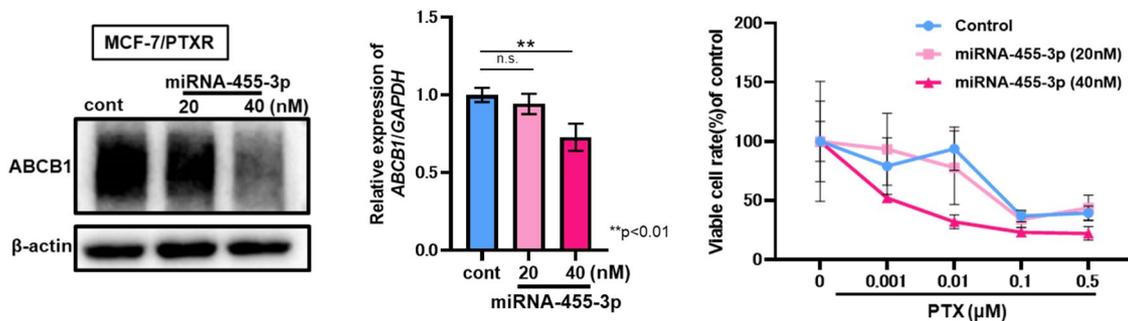
果と、NGS 結果とを照らし合わせて、耐性株で発現が抑制されるものの TOP10 の miRNA 中に miRNA-455-3p が含まれていたため、この miRNA に焦点を絞って解析することにした。



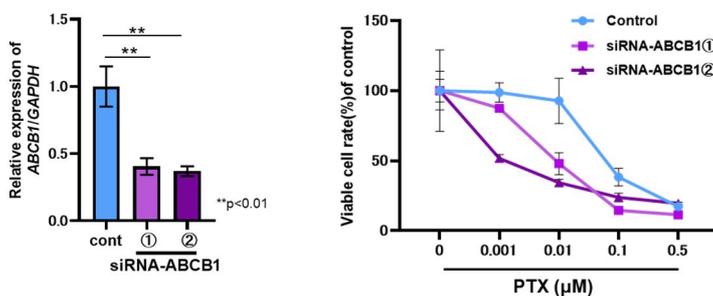
NGS の結果を再確認するため RT-PCR を施行すると、やはり耐性株で miRNA-455-3p の発現が低下していた。次に、miRNA-455-3p と ABCB1 の結合性を検証するために、ABCB1 の相補塩基配列部位を組み込んだプラスミド(野生型)と、相補塩基配列部位に変異を組み込んだプラスミド(変異型)を作製し、Luciferase Reporter Assay を行った。野生型では ABCB1 の発現が抑制され、変異型では発現が抑制されなかった。



次に miRNA-455-3p の細胞導入実験を行なった。miRNA-455-3p を PTX 耐性株に導入すると、ABCB1 のタンパク発現の低下と PTX に対する IC50 の改善を認めた。



さらに、ABCB1 に対する siRNA を複数設計し、PTX 耐性株に導入することとした。作製した siRNA を PTX 耐性株に導入し、RT-PCR を行うといずれも ABCB1 発現が抑制されていた。これらの siRNA を用いて、PTX 耐性株に対して siRNA と PTX の併用実験を行なったところ、PTX の IC50 の改善を認めた。



これ等の結果から、miRNA-455-3p の発現低下により ABCB1 の発現が亢進し、PTX 耐性に関与している可能性がある。また各種の導入実験からは、miRNA-455-3p が ABCB1 の翻訳抑制を介して、PTX に対する耐性を一部解除している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 高井早紀、木村光誠、奥浩世、碓絢菜、富永智、坂根純奈、田中亨明、青木千夏、太田紅仁香、川植永里加、岩本充彦 |
| 2. 発表標題 microRNAの発現変化による乳癌Paclitaxel耐性機構の解明 |
| 3. 学会等名 第30回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高井早紀、谷口高平、猪俣陽介、木村光誠、岩本充彦、李相雄 |
| 2. 発表標題 microRNAの発現変化による乳癌Paclitaxel耐性機構の解明 |
| 3. 学会等名 第55回制癌剤適応研究会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前沢早紀、松谷歩、碓絢菜、富永智、藤岡大也、奥浩世、木村光誠、田中覚、岩本充彦 |
| 2. 発表標題 microRNAの発現変化による乳癌Paclitaxel耐性機構の解明 |
| 3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前沢早紀、谷口高平、猪俣陽介、木村光誠、岩本充彦、内山和久 |
| 2. 発表標題 microRNAの発現変化による乳癌Paclitaxel耐性機構の解明 |
| 3. 学会等名 第54回制癌剤適応研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高井早紀、木村光誠、奥浩世、碓絢菜、富永智、坂根純奈、田中亨明、青木千夏、太田紅仁香、南永里加、葭山亜希、田中覚、岩本充彦、李相雄 |
| 2. 発表標題 microRNAの発現変化による乳癌Paclitaxel耐性機構の解明 |
| 3. 学会等名 第31回日本乳癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 大阪医科薬科大学 一般・消化器外科学教室 研究紹介 https://www.ompu.ac.jp/u-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 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 谷口 高平 (Taniguchi Kohei) (70779686) | 大阪医科薬科大学・医学部・講師 (34401) | |

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 |
|---------|---------|