

論 文 内 容 要 旨

題目 MiR-125b-5p Is Involved in Sorafenib Resistance through Ataxin-1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma

(肝細胞癌において miR125b-5p は Ataxin1 による上皮間葉転換を介してソラフェニブ耐性を示す)

著者 Akihiro Hirao, Yasushi Sato, Hironori Tanaka, Kensei Nishida, Tetsu Tomonari, Misato Hirata, Masahiro Bando, Yoshifumi Kida, Takahiro Tanaka, Tomoyuki Kawaguchi, Hironori Wada, Tatsuya Taniguchi, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma, Toshihito Tanahashi and Tetsuji Takayama

令和3年9月30日発行 Cancers 第13巻第19号4917に発表済

内容要旨

肝細胞癌の悪性腫瘍に占める死亡率は全世界で第3位であり、とくに本邦を初めとするアジアにおいて高く、有効な治療法の確立が急務である。肝細胞癌はほとんどの抗癌剤に自然耐性を示すことから、経動脈的化学塞栓療法やラジオ波焼灼療法などの局所治療を中心に行われてきた。しかし、2007年に肝細胞癌の増殖や血管新生を抑制する分子標的薬であるソラフェニブの有効性が示され、進行肝細胞癌の1次治療として広く用いられるようになった。さらに、最近レンバチニブやアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法といった分子標的薬の有効性が示され、1次治療として保険収載された。しかし、進行肝細胞癌の有効なバイオマーカーは無く、これらの一次治療のうちどれを選択するべきかは判然としていない。そこで本研究では、まず当研究室にて樹立したソラフェニブ耐性肝癌細胞株(PLC/PRF5-R1/R2)を用いてmicroRNA(miRNA)マイクロアレイ解析を行い、ソラフェニブ耐性に関わるmiRNAを明らかにし、その標的遺伝子を検索した。次いで、これらのmiRNAや標的遺伝子の導入実験やノックダウン実験を行い、薬剤耐性、EMT、浸潤・遊走能、癌幹細胞形質などを調べて薬剤耐性の機序を検討した。

まず、耐性細胞株(PLC/PRF5-R1, R2)と親株(PLC/PRF5)のmiRNA発現プロファイルを調べたところ、PLC/PRF5-R1, R2ではmiR-100-5p、125b-5p、193b-3p、210-3pの発現が高く、miR-192-5p、miR-194-5p、miR-215-5pの発現が有意に低

## 様式(8)

下していた。これらの miRNA やその inhibitor の導入実験により miR-125b-5p がもっともソラフェニブ耐性に密接に関わることを見出した。また、親株の miR-125b-5p 導入細胞 (PLC/PRF5-miR-125-5p) の EMT マーカーの発現を Western blot 法により調べたところ、E-cadherin は低下し、Snail, vimentin は亢進して EMT 形質を呈した。同様に、PLC/PRF5-miR-125-5p 細胞は、Wound healing assay や invasion assay により遊走能・浸潤能の亢進を認め、癌幹細胞マーカーである CD44/CD144 陽性細胞の増加を認めた。さらに、親株に miR-125b-5p レンチウイルス発現ベクターを導入した細胞をヌードマウスに移植し、ソラフェニブを投与したところ対照群に比べて有意に高い治療抵抗性を示した。一方、バイオインフォマティクス解析により miR-125-5p の標的遺伝子を抽出し、EMT 関連遺伝子として Ataxin1 を同定した。PLC/PRF5 細胞における Ataxin1 遺伝子を siRNA によりノックダウンしたところ、PLC/PRF5-miR-125-5p 細胞と同様に、EMT 形質や癌幹細胞形質を獲得し、遊走能・浸潤能は亢進した。さらに、公開データベースを用いた解析では、Ataxin1 低発現群の生存期間(18 ヶ月)は高発現群(39 ヶ月)に比べて有意に短かった ( $p < 0.05$ )

以上より、肝癌細胞では miR-125b-5p 発現により標的遺伝子として Ataxin1 の発現が低下し、その低下により EMT 形質や癌幹細胞形質を獲得してソラフェニブ耐性を獲得する機序が示された。miR-125b-5p や Ataxin1 が、切除不能肝癌の治療方選択の有効なバイオマーカーになり得ることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1516</b> 号	氏名	平尾 章博
審査委員	主査 島田 光生 副査 常山 幸一 副査 池田 康将		

題目 MiR-125b-5p Is Involved in Sorafenib Resistance through Ataxin-1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma  
 (肝細胞癌において miR125b-5p は Ataxin 1 による上皮間葉転換を介してソラフェニブ耐性を示す)

著者 Akihiro Hirao, Yasushi Sato, Hironori Tanaka, Kensei Nishida, Tetsu Tomonari, Misato Hirata, Masahiro Bando, Yoshifumi Kida, Takahiro Tanaka, Tomoyuki Kawaguchi, Hironori Wada, Tatsuya Taniguchi, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma, Toshihito Tanahashi and Tetsuji Takayama  
 令和3年9月30日発行 Cancers 第13巻第19号4917に発表済  
 (主任教授 高山 哲治)

要旨 肝細胞癌の悪性腫瘍に占める死亡率は全世界で第3位であり、有効な治療法の確立が急務である。現在、ソラフェニブ、レンバチニブやアテゾリズマブ・ベバシズマブ併用療法といった分子標的薬の有効性が示され切除不能進行肝癌の1次治療として保険収載されたが、有効な薬剤選択のためのバイオマーカーはない。

申請者らは、樹立したソラフェニブ耐性肝癌細胞株(PLC/PRF5-R1/R2)を用いて microRNA (miRNA)マイクロアレイ解析を行い、ソラフェニブ耐性に関わる miRNA を明らかにし、その標的遺伝子を検索した。次いで、これらの miRNA や標的遺伝子の導入実験やノックダウン実験を行い、薬剤耐性、epithelial mesenchymal transition (EMT)、浸潤・遊走能、癌幹細胞形質などを調べて薬剤耐性の機序を検討した。

得られた結果は以下のごとくである。

- (1) 耐性肝癌細胞株では *miR-100-5p*、*125b-5p*、*193b-3p*、*210-3p* の発現が高く、*miR-192-5p*、*miR-194-5p*、*miR-215-5p* の発現が有意に低下していた。これらの miRNA やその inhibitor の導入実験により、*miR-125b-5p* がもっともソラフェニブ耐性に関係していた。
- (2) 親株への *miR-125b-5p* 導入細胞では、E-cadherin は低下し、Snail、vimentin は亢進して EMT 形質を呈し、遊走能・浸潤能の亢進を認め、さらに癌幹細胞マーカーである CD44/CD133 陽性細胞の増加を認めた。
- (3) 親株への *miR-125b-5p* 導入細胞をヌードマウスに移植し、ソラフェニブを投与したところ対照群に比べて有意に高い治療抵抗性を示した。
- (4) バイオインフォーマティクス解析により *miR-125b-5p* の標的遺伝子として *Ataxin-1* を同定した。親株の *Ataxin-1* 遺伝子をノックダウンしたところ、*miR-125b-5p* 導入細胞と同様に、EMT 形質や癌幹細胞形質を獲得し、遊走能・浸潤能は亢進した。さらに、公開データベースを用いた解析では、*Ataxin-1* 低発現群の生存期間(18 ヶ月)は高発現群(39 ヶ月)に比べて有意に短かった。

以上より、肝癌細胞では *miR-125b-5p* 発現により *Ataxin-1* 発現が低下し EMT 形質や癌幹細胞形質を獲得してソラフェニブ耐性となる機序が示された。本研究は、*miR-125b-5p* や *Ataxin-1* が切除不能進行肝癌の治療法選択における新たなバイオマーカーになることを示唆しており、その臨床的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。