

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18942

研究課題名(和文)大腸がん細胞におけるデシタピンに対する獲得耐性と自然耐性の機構の比較

研究課題名(英文) Comparison in acquired and natural resistance mechanisms to decitabine in colorectal cancer cells

研究代表者

細川 美香 (Hosokawa, Mika)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70548271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル基転移酵素阻害薬デシタピン(DAC)の長期処置により、ヒト大腸がん細胞株HCT116及びSW620細胞は耐性を獲得し、耐性獲得には主にDACの活性化酵素deoxycytidine kinase(dCK)の低下が関与することが明らかとなった。一方、ヒト大腸がん細胞株HT29細胞のDACへの自然耐性ではdCK以外の関与が考えられ、マイクロアレイ解析により、HT29細胞ではP450による異物代謝や脂質代謝、WNT signaling経路の亢進が認められた。今後これらの機構を検討し、耐性克服法に繋がる情報を提供できるように研究を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：By long-term exposure of decitabine (DAC), a DNA methyltransferase inhibitor, human colorectal cancer (CRC) cell lines, HCT116 and SW620 cells acquired resistance to DAC. It was clarified that the decrease in deoxycytidine kinase (dCK, activation enzyme of DAC) is mainly involved in acquired resistance to DAC. In contrast, another human CRC cell line, HT29 cells were suggested to show natural resistance to DAC by some factors other than dCK. In microarray analysis, the up-regulation in metabolism of xenobiotics by P450, lipid metabolism and WNT signaling pathway was observed in HT29 cells. Detail examination of these pathways found in this research would be helpful for the overcoming of resistance to DAC.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：デシタピン DNAメチル基転移酵素阻害薬 大腸がん 獲得耐性 自然耐性 deoxycytidine kinase

## 1. 研究開始当初の背景

長期間の抗がん薬治療において、がん細胞が抗がん薬に耐性を示すことが臨床上問題となっている。切除不能の大腸がん治療では多剤併用療法が行われているが、現在使用されている抗がん薬においても耐性化による治療効果の低下が報告されている。さらに、ある薬に対して耐性化した細胞は、同時に他の薬に対しても耐性を示す交差耐性を生じる可能性があり、多剤併用のがん治療の障壁となっている。

がんの原因として、遺伝子の修飾によって遺伝子発現が決定されるエピジェネティックな変化も、遺伝子の変異と同様に重要であることが分かっている。血液系がんでは、エピジェネティック修飾薬として、DNAメチル化を阻害する DNAメチル基転移酵素 (DNMT) 阻害薬が既に承認されている。一方、固形がんでは DNMT 阻害薬単独使用での効果は乏しく、他の抗がん薬との併用による効果の増強が試みられている。承認されてからの臨床使用期間が短い DNMT 阻害薬であるデシタピン (DAC) のようなエピジェネティック治療薬の耐性化について検討した例は、極めて少ない。白血病細胞での耐性化に関する報告は見受けられるが、他の抗がん薬への交差耐性に関する情報や、大腸がん細胞のような固形がんでの報告は見当たらない。

DACの耐性化には、同様の基本骨格をもつゲムシタピンの耐性化に関する情報から、活性化酵素 deoxycytidine kinase (dCK) や不活性化酵素 cytidine deaminase (CDA) の関与が予想される。一般に、薬物代謝酵素の変動は、薬の効果に及ぼす影響が大きいと考えられている。ゲムシタピンの効果において、dCKの寄与の重大性が示されているように、DACの場合においても、今後がん治療で汎用されることを視野に入れると、dCKを中心とした酵素の寄与について明らかにすることは意義があると考えた。

耐性化には、長期間の抗がん薬暴露により獲得する獲得耐性と、抗がん薬の暴露前でも耐性を示す自然耐性がある。獲得耐性と自然耐性では、耐性の機構が異なる可能性もあるため、これらを比較する観点も必要と考えた。獲得耐性及び自然耐性の機構や交差耐性について明らかにすることが出来れば、固形がんでの DAC と他の抗がん薬の有効な併用方法について、さらには DAC の効果の個人差についても情報を提供できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

大腸がん細胞におけるエピジェネティック修飾薬である DAC の耐性化機構について、DAC の代謝酵素に焦点を当て、獲得耐性と自

然耐性の比較により明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 獲得耐性を検討するための DAC 獲得耐性細胞の樹立

ヒト大腸がん細胞株として、HCT116 細胞及び SW620 細胞を用いた。2-4 日処置を中断する期間を設け、段階的に DAC の濃度を上昇させて処置した。HCT116 細胞では約 100 日間、SW620 細胞では約 140 日間処置し、DAC の最終濃度は、HCT116 細胞では 5.4  $\mu\text{M}$ 、SW620 細胞では 1.8  $\mu\text{M}$  であった。WST-8 法により DAC 処置後の細胞の生存率を求め、その曲線より最小二乗法で  $\text{IC}_{50}$  値を算出した。Control 細胞に対する DAC 処置細胞の  $\text{IC}_{50}$  値の比を DAC の耐性度の指標とした。また、DAC の DNA 脱メチル化効果の指標として、DNA メチル化により制御を受ける遺伝子 (*SFRP1*, *HPPI*) の mRNA 発現を解析した。

### (2) DAC 獲得耐性細胞における交差耐性の解析

WST-8 法により薬物処置後の細胞の生存率を求め、その曲線より最小二乗法で  $\text{IC}_{50}$  値を算出し、control 細胞に対する耐性細胞の  $\text{IC}_{50}$  値の比を各薬物の耐性度の指標とした。薬物として、DAC と同様の細胞内動態を示すゲムシタピン、DAC と同様の DNMT 阻害薬であるアザシチジン及びゼブラリン、他のエピジェネティック修飾薬としてヒストン脱アセチル化阻害薬であるポリノスタット、トリコスタチン A 及びバルプロ酸、大腸がん治療に使用されている 5-フルオロウラシル、イリノテカンの活性代謝物 SN-38 及びオキサリプラチンを使用した。

### (3) DAC の代謝酵素に関する解析

DAC の活性化酵素 dCK、DAC の不活性化酵素 CDA の変動について検討した。mRNA 発現、タンパク発現、HPLC による酵素活性、PCR による exon 欠損、シークエンスによる遺伝子変異を解析した。また、dCK 及び CDA の siRNA 処置を行って、これらの寄与を検討した。獲得耐性細胞としては、DAC 耐性 HCT116 細胞 (HCT116/DAC)、DAC 耐性 SW620 細胞 (SW620/DAC) を、自然耐性細胞として HCT116 及び SW620 細胞よりも約 50 倍以上 DAC に対して耐性を示すヒト大腸がん細胞株 HT29 細胞を用いた。

### (4) マイクロアレイ解析

HCT116 control 細胞 (HCT116/C)、HCT116/DAC 及び HT29 細胞から抽出した RNA を用いて、Agilent Expression Array, SurePrint G3 Human GE 8x60K v3 (Agilent Technologies 社) によりマイクロアレイ解析

を行った。mRNA 発現 signal 値について、HCT116/C、HCT116/DAC、HT29 細胞のいずれか 2 群において、相対的尺度(Ratio 2)、絶対的尺度(Max-Min) 1000 を満たし、Gene Symbol、Entrez Gene ID、Genebank Accession#、Gene Ontology (GO) が存在する遺伝子を抽出し、クラスタリング解析を行った。さらに抽出遺伝子を、HCT116/C に対する HCT116/DAC や HT29 の signal 値の変動パターンにより分類すると共に相対的尺度(Ratio 2)、絶対的尺度(Max-Min) 1000 により抽出した。この遺伝子を differentially expressed genes (DEGs) としてベン図を作成し、以下の検討に用いた。Network 解析は、Cytoscape 3.3.0 plug-in Reactome Functional Interaction (FI) Network (2015 version) を用いた (FDR<0.01)。GO 及び Pathway 解析は、DAVID 6.8 を用いた (p<0.05)。

#### 4. 研究成果

##### (1) 獲得耐性を検討するための DAC 獲得耐性細胞の樹立

HCT116 細胞に 2-4 日処置を中断する期間を設け、DAC を段階的に上昇させ処置すると、DAC 濃度 0.24  $\mu\text{M}$  (day81) で DAC の  $\text{IC}_{50}$  値は 101 倍に増大した。さらに処置を行っても DAC 濃度 0.54  $\mu\text{M}$  (day104) での DAC の  $\text{IC}_{50}$  値は 103 倍に留まり、day81 と比べて顕著な増大は見られなかった(表 1)。

表 1. HCT116 細胞での DAC 長期処置による DAC の  $\text{IC}_{50}$  値の変化

DAC treatment	DAC concentration ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ value ( $\mu\text{M}$ )	Relative resistance
Control	-	8.6 $\pm$ 2.7	-
day 28	0.03	4.3 $\pm$ 1.7	0.50
day 52	0.06	12.2 $\pm$ 3.8	1.4
day 81	0.24	872 $\pm$ 152	101
day 104	0.54	884 $\pm$ 86	103

次に DNA メチル化により制御を受ける *SFRP1* の mRNA 発現を検討した (図 1)。一般に大腸がんでの *SFRP1* の mRNA 発現は、プロモータ領域の DNA メチル化により抑制されている。DAC 未処置の control 細胞では、*SFRP1* の mRNA 発現は検出限界以下であった。DAC 濃度 0.06  $\mu\text{M}$  (day52) では検出されたが、その発現は day81 で低下し、day104 では検出限界以下まで低下した。

これらの結果から、DAC を day104 まで処置した細胞を DAC 耐性 HCT116 細胞 (HCT116/DAC) とした。

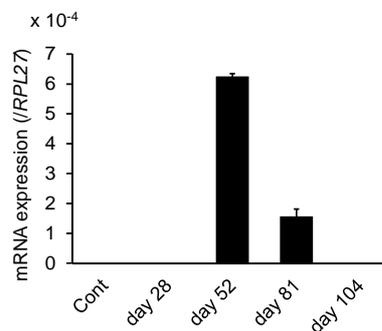


図 1. HCT116 細胞での DAC 長期処置による *SFRP1* mRNA 発現の変化

同様に SW620 細胞に 2-4 日処置を中断する期間を設け、DAC を 0.03 から 1.8  $\mu\text{M}$  まで段階的に上昇させ day142 まで処置すると、DAC の  $\text{IC}_{50}$  値は 55 倍増大した(表 2)。この細胞を DAC 耐性 SW620 細胞 (SW620/DAC) とした。SW620 の control 細胞 (SW620/C) に DAC を処置 (2 $\mu\text{M}$ , 72h) すると *SFRP1*, *HPPI* の mRNA 発現は検出されたが、SW620/DAC 細胞では、同様に DAC を処置しても *SFRP1*, *HPPI* の mRNA 発現は検出されなかった。(図 2)

表 2. SW620 細胞での DAC 長期処置による DAC の  $\text{IC}_{50}$  値の変化

DAC treatment	DAC concentration ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ value ( $\mu\text{M}$ )	Relative resistance
Control	-	8.6 $\pm$ 2.3	-
day 28	0.03	17 $\pm$ 6.6	2.0
day 49	0.06	1.9 $\pm$ 0.72	0.22
day 70	0.24	67 $\pm$ 3.4	7.8
day 105	0.81	42 $\pm$ 10	4.9
day 142	1.8	475 $\pm$ 58	55

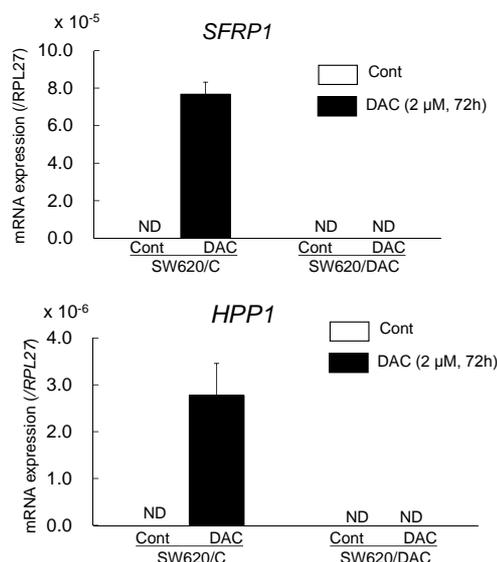


図 2. SW620/C 及び SW620/DAC 細胞における DAC 処置による *SFRP1* 及び *HPPI* mRNA 発現の変化

## (2) DAC 獲得耐性細胞における交差耐性の解析

DAC と同様の DNMT 阻害薬であるアザシチジン及びゼブラリン、他のエピジェネティック修飾機構であるヒストン脱アセチル化を阻害するポリノスタット、トリコスタチン A 及びバルプロ酸、大腸がん治療に使用されている 5-フルオロウラシル、イリノテカンの活性代謝物 SN-38 及びオキサリプラチンへの耐性度は、HCT116/DAC 及び SW620/DAC 細胞共に 2 倍以下となり交差耐性を示さなかった。一方、DAC と同様の酵素で代謝されるゲムシタピンの耐性度は、HCT116/DAC では約 30 倍、SW620/DAC では約 65 倍と交差耐性を示した。これらの結果から、DAC の獲得耐性には、ゲムシタピンと共通の代謝酵素である CDA や dCK が関与する可能性が考えられた。また、今回検討したゲムシタピン以外の抗がん薬の作用に関わる経路は、耐性化によって変化していない可能性が考えられた。

## (3) DAC の代謝酵素に関する解析

HCT116/DAC 及び SW620/DAC 細胞共に、DAC の不活性化酵素 CDA、DAC の活性化酵素 dCK の mRNA 発現は有意に変化しなかった (図 3A)。これらのタンパク発現では、HCT116/DAC 及び SW620/DAC 細胞に共通して、CDA 発現の増大、dCK 発現の低下が認められた (図 3B)。

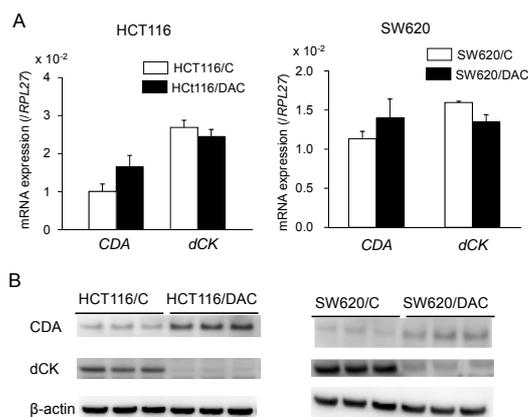


図 3. HCT116/DAC 及び SW620/DAC 細胞における CDA 及び dCK の mRNA 発現 (A) 及びタンパク発現 (B)

HCT116/DAC 細胞について詳細に検討したところ、CDA や dCK の exon 欠損は、HCT116/C 及び HCT116/DAC 細胞共に認められなかった (図 4A)。しかし、HCT116/DAC 細胞でのみ 472 番目の塩基の変異 (T → C) により 158 位のアミノ酸の置換 (Trp → Arg) が認められた (図 4B)。従って dCK 発現の低下は翻訳過程で生じていることが考えられた。また酵素活性を確認したところ、タンパク発現の変動と一致して、CDA 活性の増大、dCK 活性の低下が見られた (図 5)。

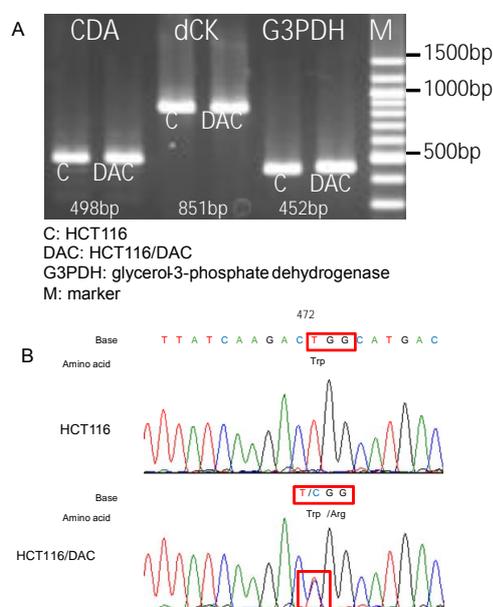


図 4. HCT116/DAC 細胞における CDA 及び dCK 遺伝子のコーディング領域の mRNA サイズ (A) 及びシーケンス解析のクロマトグラム (B)

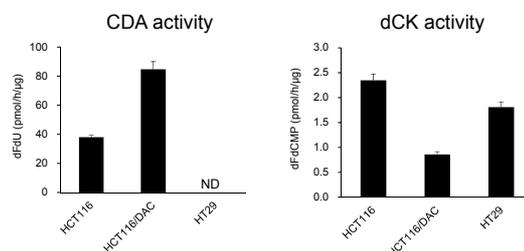


図 5. HCT116/DAC 及び HT29 細胞における CDA 及び dCK 酵素活性

HCT116/C 細胞に対して dCK siRNA 処置を行ったところ、HCT116/DAC 細胞と同程度まで DAC の IC<sub>50</sub> 値が増大し (表 3)、DAC 処置により増大した SFRP1 及び HPP1 mRNA の発現も顕著に低下した (図 6)。HCT116/C 細胞に対して CDA siRNA 処置を行った場合、dCK siRNA 処置のような顕著な変化は認められなかった (図 6)。また、HCT116/DAC 細胞に対して CDA の siRNA 処置を行ったところ、DAC の IC<sub>50</sub> 値は約 40% 低下したが HCT116/C と比べて約 50 倍大きく (表 3)、SFRP1 及び HPP1 の mRNA 発現の回復には至らなかった (図 6)。従って、DAC 耐性化の獲得には、CDA よりも dCK の寄与が大きい可能性が考えられた。

一方、自然耐性細胞である HT29 細胞では、HCT116 細胞と同等の dCK タンパクの発現が認められ (図 7)、dCK 遺伝子に変異は認められなかった。CDA タンパク発現は HCT116 細胞では認められたが、HT29 細胞では認められなかった (図 7)。dCK 活性は HT29 細胞では HCT116/C 細胞と比べて低い値を示したが、その程度は約 20% であった (図 4)。CDA 活性は HT29 細胞で認められなかった (図 4)。HT29 に対して dCK siRNA 処置を行ったとこ

る、DAC の IC<sub>50</sub> 値の顕著な低下は認められなかったが (表 3)、DAC 処置により増大した *SFRP1* 及び *HPP1* の mRNA 発現は低下した (図 6)。従って、DAC への自然耐性には dCK や CDA 以外の因子が存在することが考えられた。

表 3. HCT116/DAC 及び HT29 細胞における DAC の細胞毒性に及ぼす dCK, CDA siRNA の影響

	IC <sub>50</sub> (μM)		
	HCT116	HCT116/DAC	HT29
NC	11.0 ± 2.8	866.2 ± 64.8	1767.3 ± 298.3
dCK siRNA	816.0 ± 103.1**	NA	1831.0 ± 102.5
CDA siRNA	5.6 ± 2.3	530.0 ± 31.7**	NA

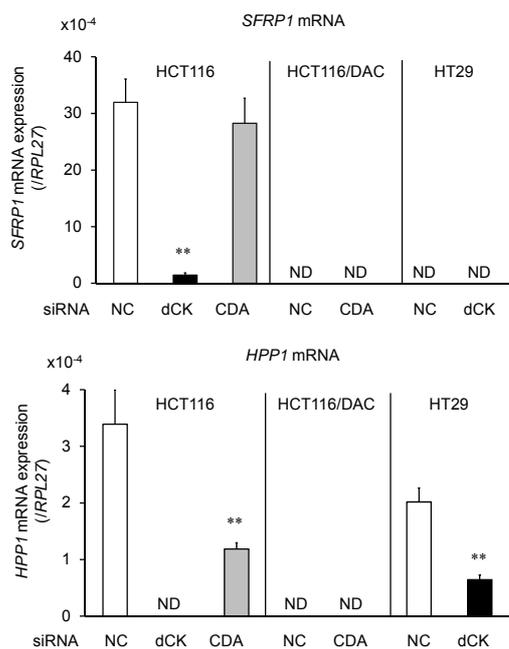


図 6. HCT116/DAC 及び HT29 細胞における *SFRP1* 及び *HPP1* mRNA 発現に及ぼす dCK, CDA siRNA の影響

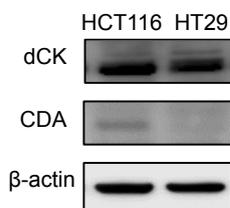


図 7. HCT116 及び HT29 細胞における dCK 及び CDA タンパク発現

#### (4) マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析において、DAC 耐性 HCT116 細胞と HT29 細胞では遺伝子発現プロファイルが異なっていた (図 8)。ベン図より、HCT116/C 細胞と比較して変動している遺伝子数は、HCT116/DAC 細胞よりも HT29 細胞で顕著に多かった (図 9)。HT29 細胞の DEGs を network 解析したところ、発現上昇

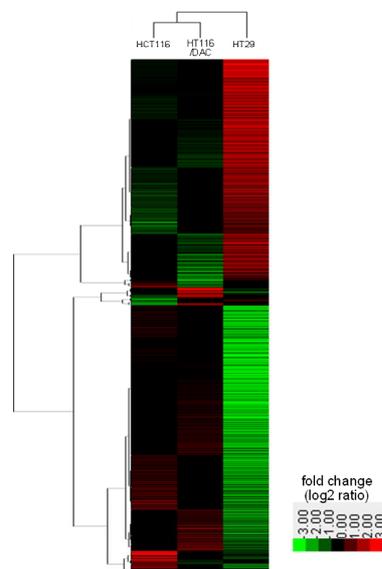


図 8. HCT116/DAC 及び HT29 細胞におけるクラスタリング解析のヒートマップ

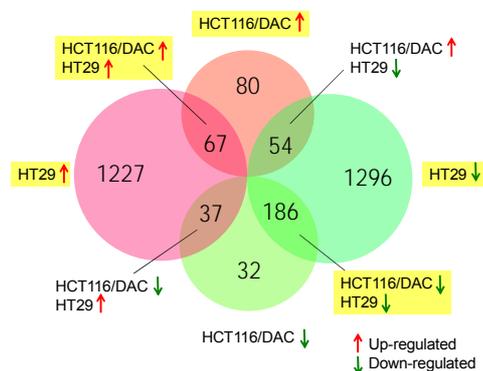


図 9. HCT116/C に対する HCT116/DAC 及び HT29 細胞の DEGs のベン図

黄色マーカー: network 解析により network が存在していたグループ

遺伝子の network のみに含まれていた network は、脂質代謝や P450 による異物代謝、ヌクレオチド除去修復、グリコシル化であった (図 10)。また WNT signaling 経路に関しては、positive に制御する遺伝子が上昇、negative に制御する遺伝子が低下しており、WNT 経路は亢進している可能性が考えられた (図 10)。HT29 細胞のように SMAD4 遺伝子の欠損、p53 及び APC 遺伝子の変異がある細胞は、BMP signaling 経路の亢進を介し WNT signaling 経路の亢進が起きることが報告されている。HT29 及び HCT116/DAC 細胞で共通して発現が上昇している遺伝子の内、BMP4, SMAD6/7 は BMP signaling 経路の network を形成していた (図 10)。Real-time PCR 解析により HT29 細胞は *BMP4* mRNA 発現が HCT116/C と比べて約 4 倍増大していた。遺伝子発現と予後の関係性を解析できる PrognoScan 解析において、BMP4 は大腸がん

患者の予後不良因子となる可能性が見出された。

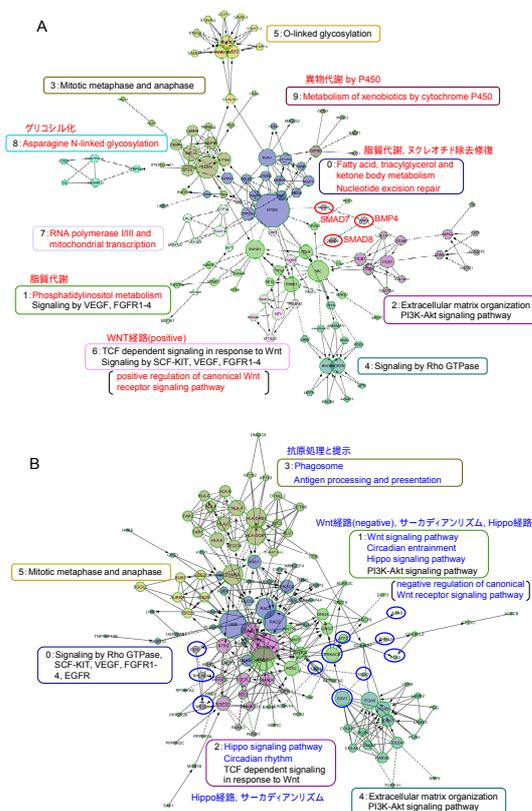


図 10. HT29 細胞での発現上昇 (A) 及び発現低下(B) 遺伝子の network 解析  
赤丸：HT29 及び HCT116/DAC 細胞共通の発現上昇遺伝子で形成された network

以上の結果より、HCT116 及び SW620 細胞での検討において、DAC への獲得耐性では DAC の活性化酵素である dCK の低下、DAC の不活性化酵素である CDA の増大が認められたが、CDA よりも dCK の寄与が大きい可能性が明らかとなった。HT29 細胞での検討において、DAC への自然耐性では DAC の遺伝子発現への影響は一部 dCK の関与が考えられたが、獲得耐性と異なり dCK や CDA 以外の要因による耐性機構の存在が示唆された。その一部として、マイクロアレイ解析により BMP signaling 経路の亢進を介した WNT signaling 経路の亢進が見出されたが、直接的な関与を明らかにするには更なる検討が必要である。本研究により、DAC の耐性機構は獲得耐性と自然耐性で異なることが明らかとなり、DAC 使用開始時で耐性を示す場合と、DAC 使用開始後に耐性化する場合によって対策法が異なることが考えられた。

今後は、マイクロアレイ解析で見出された機構を詳細に検討し、耐性克服のための有効な併用療法、耐性化の防止方法や効果の個体差について明らかにできるように研究を進めたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 1 件)

1. Hosokawa M, Saito M, Nakano A, Iwashita S, Ishizaka A, Ueda K, Iwakawa S. Acquired resistance to decitabine and cross-resistance to gemcitabine to gemcitabine during the long-term treatment of human HCT116 colorectal cancer cells with decitabine. *Oncol. Lett.* 査読有, 10, 761-767, 2015. DOI: 10.3892/ol.2015.3253

(学会発表)(計 5 件)

1. 徳野 翔太, ヒト大腸がん細胞株 SW620 細胞におけるデシタピン長期処置による耐性の獲得, 日本薬学会 第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日 (宮城県・仙台市)
2. 高津 汐季, 大腸がん細胞におけるデシタピンに対する獲得耐性と自然耐性の機構の比較, 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2016 年 10 月 15 日 (大阪府・高槻市)
3. 高田 容希, ヒト大腸がん細胞の細胞内活性酸素レベルに及ぼすデシタピンと抗がん薬併用の影響, 日本薬学会 第 31 年会, 2016 年 5 月 21 日 (岐阜県・岐阜市)
4. 中村 浩紀, HPLC-UV 法による deoxycytidine kinase (dCK) 活性及び cytidine deaminase (CDA) 活性の同時定量法の検討, 日本薬学会 第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日 (神奈川県・横浜市)
5. 池田 奈津希, ヒト大腸がん細胞におけるデシタピンの効果への deoxycytidine kinase の関与, 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 22 日 (神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

細川 美香 (HOSOKAWA, Mika)  
神戸薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：70548271