

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20125

研究課題名(和文)c-Jun発現に着目した卵巣がん化学療法耐性克服への取り組み

研究課題名(英文)The study for chemoresistance of ovarian cancer to notice c-Jun signaling pathway

研究代表者

清野 学 (SEINO, Manabu)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：40594320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんは抗がん剤に対して抵抗を持つものがあり、治療に難渋することが多い。我々は分子標的薬であるJNK阻害薬が卵巣がんの抗がん剤に対する抵抗性を弱める可能性を見出した。特に卵巣がん細胞を用いた実験では、JNK阻害薬を抗がん剤使用前に投与することで、より抗がん剤の効果を増強させることが明らかになった。また子宮内膜症治療薬として臨床試験が行われているJNK阻害薬AS602801は、卵巣がんの再発などの原因となる卵巣がん幹細胞に対しても効果を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Chemoresistance of ovarian cancer poses a major obstacle to the successful management of this devastating disease. We found that specific JNK inhibitor, SP600125, treatment sensitizes cytotoxic drugs such as paclitaxel and cisplatin. This result suggests that JNK and its signal transduction might have a key role in the resistance of ovarian cancer cells to chemotherapy.

Additionally, we examined whether AS602801, a newly developed JNK inhibitor as the therapeutic agent for inflammatory endometriosis and which is revealed the safety in the Phase 2 clinical study, has the anti-cancer effects and inhibiting cancer stem cells in vitro and in vivo. AS602801 has modest cytotoxic activity on cancer stem cells in vitro and clearly inhibits tumor-initiating capacity in vivo. These findings suggest that AS602801 is a promising anti-cancer stem cell agent.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣がん 化学療法抵抗性 がん幹細胞 JNK阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは女性のがん死亡原因の第5位という婦人科がんのなかでも予後の悪い疾患である (CA Cancer J Clin., 2011; 61: 69)。

現在、卵巣がんに対する世界的にエビデンスのある治療法は、可及的に最大限の腫瘍減量を行う手術 (debulking surgery) およびそれに続くプラチナ系およびタキサン系抗悪性腫瘍剤を用いた化学療法である (Lancet., 2009; 374: 1371)。しかしながら、治療後半年以内に再発し化学療法に抵抗性と考えられる症例も1割程度存在し (Oncologist., 2002; 7: 20-28)、また、初期治療が奏功した症例でも約8割が5年以内に再発を来し (Int J Gynaecol Obstet., 2006; 95: S161)、かつ再発時には大部分の症例が薬剤耐性を示す (J Clin Oncol., 2009; 13: 1068) など、卵巣がん治療において薬剤耐性は大きな問題となっている。しかしながらこれまでのところ決定的な対策は未だ見出されていない。

これまで我々の研究室では c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) シグナルとがんに関する基礎研究を行ってきた。その中で JNK の基質である c-Jun のリン酸化に着目し、卵巣がん細胞株におけるリン酸化 c-Jun 発現量を調べてシスプラチンおよびパクリタキセルに対する抵抗性との関係を検討したところ、c-Jun 発現と薬剤耐性の間に相関関係があることがわかった。さらに化学療法抵抗性に関する臨床情報をもとに抵抗性症例、感受性症例のそれぞれから手術検体の c-Jun の発現量を検討したところ、やはり臨床的薬理抵抗性と c-Jun 発現の間に相関傾向が見られることがわかった。これらの知見は総じて c-Jun 発現と卵巣がんの薬剤耐性、化学療法抵抗性の間に一定の関係が存在することを示唆するものであった。

このような知見から我々は「c-Jun の発現亢進は卵巣がん細胞に多剤耐性能を賦与しており、c-Jun 発現は卵巣がん症例における化学療法抵抗性予測に有用である一方、c-Jun 発現抑制は卵巣がんの多剤耐性克服に有用である」との仮説を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

卵巣がんの化学療法抵抗性についてこれまで多くの研究がなされてきたが、この治療抵抗性を克服し予後改善に寄与するとされる決定的な治療標的分子は未だに見つかっていない。これまでに JNK の基質の一つであり転写因子である c-Jun がシスプラチン処理後の卵巣がん細胞の DNA 修復を促すこと、JNK によってリン酸化されないドミナントネガティブ c-Jun を大量発現させることで卵巣がん細胞のシスプラチン感受性が高まることが報告されている (J Biol Chem 1999; 274(44): 31648-31654)。しかし JNK 阻害薬を用いてシスプラチン感受性を高めることやパクリタキセル感受性についての報告は

なく未だに不明瞭な部分が残されている。

本研究によって卵巣がん細胞の薬剤耐性における c-Jun の役割について検討を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト卵巣がん細胞株 A2780CP、SKOV-3、RMG-1 を用いて検討を行った。

- (1) 卵巣癌細胞株において c-Jun 抑制状態での薬剤耐性の変化を、c-Jun に対する siRNA を用いて検討した。
- (2) 卵巣癌細胞株において JNK 活性抑制状態での薬剤耐性の変化を JNK の特異的阻害薬である SP600125 を用いて検討した。
- (3) ヒト正常繊維芽細胞 (IMR90)、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3)、ラット繊維芽細胞 (Rat1) において JNK 活性抑制状態での薬剤に対する細胞毒性を検討した。

## 4. 研究成果

比較的シスプラチンおよびパクリタキセルに対して耐性を持つヒト卵巣がん細胞株 A2780CP、SKOV-3、RMG-1 を用いて検討を行った。これらの細胞において c-Jun が薬剤耐性に関与するか検討を行った。はじめに c-Jun の機能を抑制した際に化学療法耐性を減弱させるか検討を行った。c-Jun の機能を抑制する方法として c-Jun に対する siRNA を細胞に導入し c-Jun の発現を抑制することにした。我々の仮説では「c-Jun の発現を抑制すれば薬剤耐性が減弱する」はずなので、それぞれの細胞で c-Jun の発現を部分的に抑制した状態でシスプラチンを処理したところ、予想に反して c-Jun の発現を抑制した細胞でアポトーシスマーカーの一つである poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) の切断量が減少した。つまり卵巣がん細胞において c-Jun の発現を抑制した状態ではシスプラチンによる細胞死を抑制される可能性を示唆するものであった。この結果は我々の仮説を支持しない結果であり、今回の c-Jun 抑制ではシスプラチンに対する耐性を減弱しなかった。

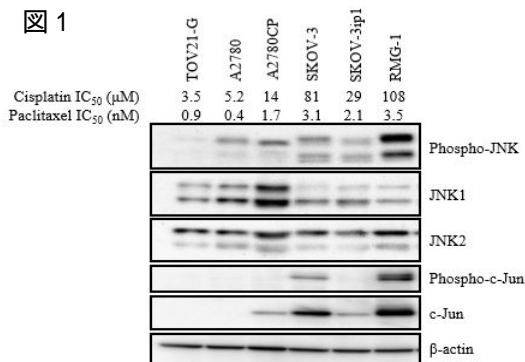
そこで我々は c-Jun をリン酸化する JNK に着目した。予備実験では JNK 阻害薬である SP600125 を用いて JNK 活性を抑制すると c-Jun の発現量が低下することが分かっていた。そこで SP600125 を用いて卵巣がん細胞の c-Jun 発現を抑制することにした。

- (1) 定常状態の JNK 活性のヒト卵巣がん細胞のシスプラチンおよびパクリタキセル耐性への関与

これまで、卵巣がん細胞に JNK によってリン酸化が引き起こされないドミナントネガティブ c-Jun を大量発現させることでシスプラチン感受性を増強させることが報告されている (J Biol Chem 1999; 274(44): 31648-31654)。このことから卵巣がん細胞の化学療法抵抗性に JNK 経路の活性が関わるのではないかと考えた。そこで、卵巣がん細胞

胞株に対して卵巣がん治療で頻用されるプラチナ系薬剤およびタキサン系薬剤の耐性と JNK 活性が相関するか検討を行った。プラチナ系薬剤はシスプラチンを、タキサン系薬剤はパクリタキセルを用いた。シスプラチンおよびパクリタキセルの各々の細胞に対する IC50 値は、非刺激状態での JNK 活性 (定常状態の JNK 活性) と相関する傾向がみられた (図 1)。さらに興味深いことに A2780CP は A2780 と比べるとシスプラチンのみならずパクリタキセル耐性を有することが示された (図 1)。このことから定常状態の JNK 活性が卵巣がんのシスプラチン耐性およびパクリタキセル耐性に関与していることが示唆された。

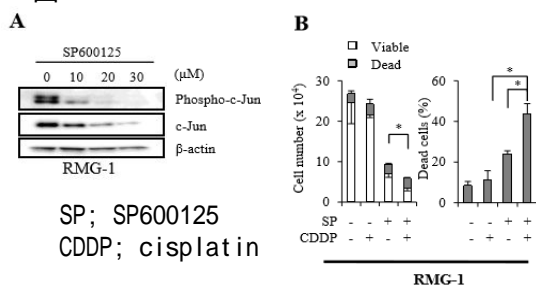
図 1



## (2) JNK 阻害薬による卵巣がん細胞のシスプラチン感受性の亢進

前述のとおりドミナントネガティブ c-Jun を導入することで JNK 活性を抑制するとシスプラチン感受性が増強されたという報告から (J Biol Chem 1999; 274(44): 31648-31654)、JNK 活性が確かにシスプラチン耐性に関わるかどうかを JNK 特異的阻害薬である SP600125 を用いた検討を行った。比較的高いシスプラチン耐性を持つ RMG-1 を SP600125 処理により JNK 活性が抑制されるかどうかを確認した。すると濃度依存的に JNK の基質である c-Jun のリン酸化が減少した。 (図 2A)。20 μM 以上の濃度で大部分の JNK 活性が抑制できていたことから、以下からは 20 μM の SP600125 濃度にて細胞を処理した。次に、各種卵巣がん細胞を SP600125 とシスプラチン存在下で培養したところ、SP600125 とシスプラチンを組み合わせることでより強く細胞増殖抑制および細胞死を誘導した (図 2B)。同様の現象を SKOV-3、A2780CP でも確認した。

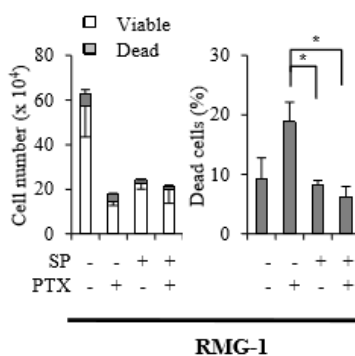
図 2



(3) SP600125 存在下および SP600125 前処理によるパクリタキセルの卵巣がん細胞に対する殺細胞効果

図 1 において、定常 JNK 活性の高さがシスプラチン感受性のみならずパクリタキセル感受性も減弱させる可能性があることから、シスプラチンと同様に SP600125 処理がパクリタキセルの抗腫瘍効果にどのような影響を与えるか検討を行った。実際、パクリタキセル感受性の低い細胞株に 5 nM のパクリタキセルにて処理した場合、SP600125 存在下および非存在下と比較すると SP600125 存在下の方が非存在下に比べてパクリタキセルの細胞死誘導能が減少した (図 3)。この結果は図 2 と異なり、SP600125 処理はパクリタキセルとシスプラチンに対して逆の影響を与えることを示唆している。

図 3

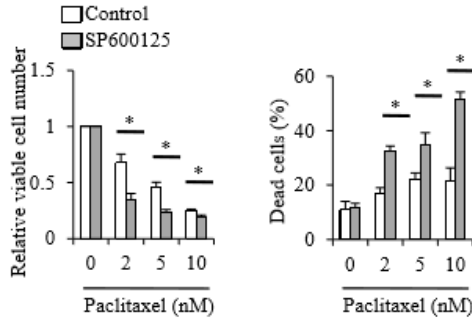


SP; SP600125, PTX; paclitaxel

卵巣がんに限らず、パクリタキセルによる細胞死に JNK の活性化が関与するという報告が多くみられる (FEBS J 2008; 275: 1889-1899, J Biol Chem 1998; 273: 28253-28260)。これらは薬剤処理によって誘導された JNK 活性化がパクリタキセルによる細胞死誘導に重要な役割を担っていることを示唆している。しかしながら、定常状態の JNK がパクリタキセル感受性にどのような役割を担っているのか未だに不明である。この定常状態の JNK 活性が卵巣がんのパクリタキセル感受性にどのように関与するか検討するために、SP600125 とパクリタキセルを逐次的に処理し検討を行った。パクリタキセルによって誘導される JNK 活性の影響を妨げないために、卵巣がん細胞を SP600125 存在下で 3 日間培養した後、SP600125 を完全に除去した後にパクリタキセルで処理した。興味深いことに、卵巣がん細胞において SP600125 とパクリタキセル同時存在下 (co-treatment: 図 3) の時とは明らかに異なり、SP600125 前処理後にパクリタキセル処理 (SP600125 pre-treatment) を行うと有意に細胞増殖が抑制され、かつパクリタキセルの細胞死誘導を増強させた (図 4)。これらの事象は種々の卵巣がん細胞の定常状態の JNK 活性を特異的に阻害することで卵巣がんの

パクリタキセル感受性を増幅させる可能性が示唆された。

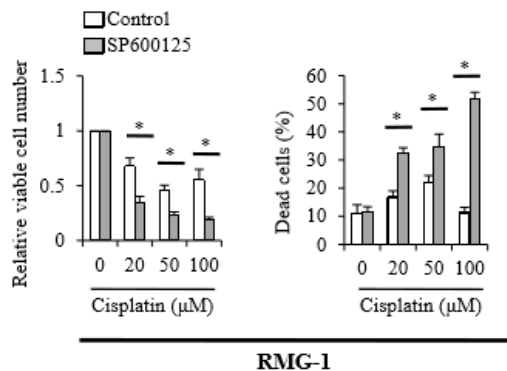
図 4



(4)SP600125 前処理による卵巣がん細胞のシスプラチン感受性の亢進

前述のように SP600125 とシスプラチンの co-treatment ではシスプラチンの効果を増強させた (図 2) が、パクリタキセルの場合は逆にその効果を減弱させた (図 3)。その一方、SP600125 の pre-treatment ではパクリタキセルの効果を増強させた (図 4)。通常卵巣がんの治療においてはタキサン製剤のみではなくプラチナ製剤を共に使用するレジメンが一般的であり、図 4 で見られたような薬剤感受性亢進作用がプラチナ製剤に対しても拡大することができれば、その寄与は甚だ大きいと考えられる。そこで、シスプラチンの場合もパクリタキセルと同様に SP600125 の pre-treatment で効果を増強させるか検討を行った。パクリタキセルの時と同様に、卵巣がん細胞を SP600125 存在下で 3 日間培養し、SP600125 を除去した後にシスプラチン存在下で 3 日間培養したところ、卵巣がん細胞の増殖抑制および細胞死誘導を亢進させることが分かった (図 5)。これらの結果はパクリタキセルで得られた結果と同様であり、細胞が定常状態でもつ定常状態の JNK 活性はシスプラチン耐性およびパクリタキセル耐性に共通して寄与している可能性が示唆された。

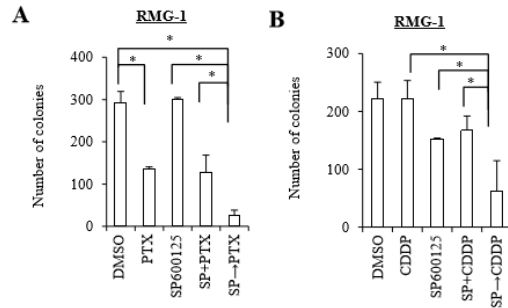
図 5



(5)SP600125 前処理による卵巣がん細胞のシスプラチンおよびパクリタキセルのコロニー形成抑制効果の亢進

卵巣がん細胞において SP600125 を前処理することでシスプラチンおよびパクリタキセルの増殖抑制および殺細胞効果を増強させることが分かった。さらに薬剤の長期効果であるコロニー形成能をコロニー形成アッセイで検討した。SP600125 とパクリタキセルの co-treatment (SP+PTX) と pre-treatment (SP PTX) のコロニー形成に与える影響を検討した。Co-treatment では SP600125 とパクリタキセル存在下で 3 日間培養し、薬剤を完全に除去した状態でさらに培養した。Pre-treatment では SP600125 存在下で 3 日間培養した後、薬剤を完全に除去してからパクリタキセル存在下で 3 日間培養し、その後薬剤を完全に除去した状態で培養を続けた。その結果、いずれの細胞においても co-treatment に比して pre-treatment の方が有意にコロニー形成を抑制した (図 6A)。同様の実験をシスプラチンでも行ったところ、パクリタキセル同様に pre-treatment でよりコロニー形成が抑制された (図 6B)。これらのことから SP600125 の前処理は卵巣がんに対するパクリタキセルおよびシスプラチンの抗腫瘍効果を増強させる可能性が示唆された。

図 6



SP; SP600125

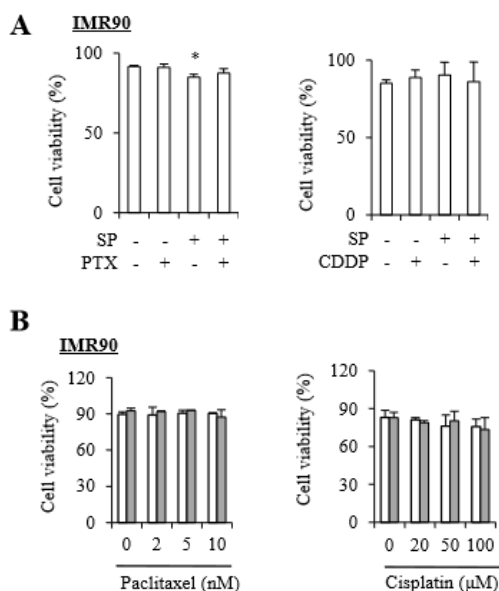
PTX; paclitaxel, CDDP; cisplatin

(6)SP600125 とシスプラチン/パクリタキセルの併用による正常繊維芽細胞の細胞生存率に与える影響

上記の JNK 阻害薬と抗癌剤の組合せ効果ががん細胞に特異的かを調べるために SP600125 とパクリタキセルないしシスプラチンの組み合わせが正常細胞の生存率に与える影響を調べるため、ヒト正常繊維芽細胞 (IMR90) に SP600125 とパクリタキセルないしシスプラチンを処理し各細胞の生存率を検討した。パクリタキセル単独では 10 nM、シスプラチン単独では 100 μM まで各細胞の生存率は低下しなかった (図 7B, 白)。SP600125 20 μM とパクリタキセル 5 nM ないしシスプラチン 50 μM の同時投与で各細胞の細胞生存率は低下しなかった (図 7A)。また SP600125 20 μM を前処理した後にパクリタキセルないしシスプラチンを図の濃度で処理した際の各細胞の細胞生存率は低下

しなかった(図 7B, 灰色)。同様の現象は、マウス繊維芽細胞 (NIH3T3)、ラット繊維芽細胞 (Rat1) を用いても示された。これらのことから SP600125 とパクリタキセルないしシスプラチンの組み合わせは正常組織に与える毒性が少ない範囲で抗腫瘍効果を発揮できる可能性が示唆された。

図 7



SP; SP600125  
PTX; paclitaxel, CDDP; cisplatin

最後に、本研究で用いた JNK 阻害薬である SP600125 はヒトへの安全性が確認されておらず、直ちに臨床応用に用いることは困難である。そこで私たちの研究室では可及的速やかな臨床応用を念頭にヒトに対する安全性情報の存在する JNK 阻害薬でがん幹細胞標的治療効果を有するものの探索を進め、子宮内膜症の治療薬で第 2 相試験を完遂した JNK 阻害薬である AS602801 が in vitro のみならず in vivo においてがん幹細胞の幹細胞性を喪失させることを明らかにした。今後 AS602801 が卵巣がんの新規治療の重要な役割を担ってくることを期待し、今後の研究を進めていく予定である。

## 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 2 件)

Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Suzuki S, Kitanaka C. The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016; 7(19): 27021-27032(査読あり)

Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Kurachi H, Nagase S, Kitanaka C. Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel, *Oncol Rep*, 2015; 35(1): 593-601 (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamagata-obgy.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清野 学 (SEINO, Manabu)

山形大学医学部 助教

研究者番号: 4 0 5 9 4 3 2 0