

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07200

研究課題名(和文)大腸癌のBH3プロファイリングによる抗がん剤耐性機序の解明及び新規治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of 5-FU resistance in colon cancer using BH3 profiling

研究代表者

河野 豊 (KAWANO, Yutaka)

北海道医療大学・予防医療科学センター・准教授

研究者番号：80398320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：BH3プロファイリングにより大腸癌細胞株における5-FU耐性獲得にはBCLXL蛋白の機能的な役割が関与していることが明らかにされ、BCLXL蛋白の抑制により5-FU耐性大腸癌細胞株の増殖抑制が確認された。さらに動物モデルにおいても、BCLXL阻害薬を投与されたマウスの腫瘍の増大が抑制され、アポトーシスの増加を認めた。以上の結果よりBCLXL阻害薬は5-FU抗がん剤耐性大腸癌に対する新規治療法の1つとして基礎研究レベルで有望であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BH3プロファイリングという新しい解析手法により、今までの方法では分からなかった抗がん剤の耐性メカニズムを明らかにした。このメカニズムを標的とした薬剤を使えば、大腸がんを効果的に殺すことが可能となり、さらに以前から使っていた抗がん剤も再び効くようになることが分かった。

研究成果の概要(英文)：BH3 profiling identified BCLXL protein as a functional role for 5-FU resistance in colon cancer cell lines. Knockdown of BCLXL protein recovered the sensitivity to 5-FU in 5-FU resistant colon cancer cells. Furthermore, mice study showed that BCLXL inhibitor could both control tumor growth and cause apoptosis in 5-FU resistant colon cancer cells. In summary, BCLXL inhibitor is thought to be one of the promising drug for 5-FU resistant colon cancer.

研究分野：腫瘍

キーワード：抗癌剤感受性 大腸癌 BH3プロファイリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における大腸癌 (=結腸直腸癌) の罹患者数は高齢者人口の増加に伴い増加の一途を辿っており、年間約 14 万人が罹患し(2012 年で第 1 位)、約 5 万人の患者が亡くなる(2014 年で第 2 位)ことが報告されている。本邦では切除不能大腸癌の標準的な化学療法として 6 種類のレジメンがあるが、各々の抗癌剤の効果を治療前に予測することは困難であり、さらに抗癌剤の長期使用に伴い耐性を獲得した癌細胞が出現してくることが知られている。このため実地臨床においては、抗癌剤の抗腫瘍効果と有害事象の程度を観察しながら別のレジメンに変更して化学療法を継続しているのが現状である。そこでもし化学療法開始前に各々の抗癌剤の抗腫瘍効果が予測できれば、感受性を有する薬剤の適切な選択によって治療効果を上げるだけでなく、治療効果の低いと予測された抗癌剤の使用を回避することによって不要な副作用も防ぐことができるため、その結果化学療法による生存率の延長が十分に期待できる。さらに抗癌剤耐性を獲得した癌細胞の耐性機序も解明できれば、耐性に関わる分子に対する新たな標的治療が展開できる可能性がある。

申請者らは機能的なアポトーシスを解析可能とした新しいプロファイリングアッセイである BH3 (BCL-2 homology domain 3)プロファイリング(PNAS 2010, Cell 2012)を用いて、胃癌における Docetaxel の治療感受性を予測可能であったことを報告した。(Gastric Cancer 2015)。この結果から化学療法施行前の内視鏡検査で採取した胃癌細胞におけるアポトーシス関連蛋白である BAK 蛋白発現多寡が、Docetaxel による抗腫瘍効果と関連しており、さらに Docetaxel を含む化学療法での生命予後とも関連していることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、5-FU や Irinotecan、Oxaliplatin などの大腸癌に対して使用される抗癌剤の耐性を獲得した大腸癌細胞株の樹立を試みる。次に耐性株及び野生株用いて BH3 プロファイリングを行い、薬剤耐性に関与する抗アポトーシス関連蛋白の探索と検証実験を行う。これらの *in vitro* での結果を元に、抗アポトーシス蛋白に対する抑制剤を用いて動物モデルでの治療効果を検証する。

3. 研究の方法

(1)大腸癌細胞株の抗がん剤耐性株の樹立

7 種類の大腸癌細胞株 (DLD-1、HT-29、HCT-15、SW480、SW620、LoVo、COLO205) を 5-FU、Irinotecan (=SN38)及び Oxaliplatin 存在下で段階的に濃度をあげながら培養することによって各抗がん剤の耐性株の樹立した。樹立に成功した耐性株は各抗がん剤に対する 50%阻害濃度 (Half maximal inhibitory concentration, IC50) を算出し、各抗がん剤で処理した後のアポトーシス陽性細胞をフローサイトメトリー法で解析した。

(2) 大腸癌細胞株のアポトーシス関連蛋白発現の検討

各大腸癌細胞株から蛋白を抽出し、ウエスタンブロッティング法にて各アポトーシス関連蛋白発現を測定した。

(3)大腸癌細胞株の Plate based BH3 プロファイリング

BH3 プロファイリングに用いる 9 個の BH3 ペプチド (Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, Hrk, MS1, XXA1) は、既報のアミノ酸配列に従って作成した (PNAS 2010、Science 2011、JMB 2014、ACS2014)。各 BH3 ペプチド、JC-1、Digitonin と Oligomycin を予め入れた 384 well black plate に大腸癌培養細胞株 1.0×10^4 個を添加し、545nm の波長で励起した際の 590nm の蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。ペプチドの溶媒である DMSO 添加時の蛍光強度 (陰性コント

ロール、0%)とミトコンドリアの脱共液剤である FCCP を添加時の蛍光強度(陽性コントロール、100%)をそれぞれ設定して、各 BH3 ペプチド添加時のミトコンドリア膜の脱分極(%depolarized)、つまりアポトーシスの程度を測定した(図1)。

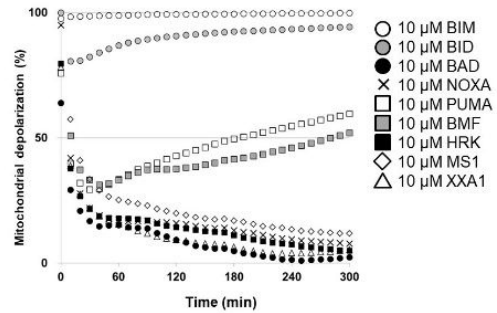


図1 plated based BH3 profilingの1例

(4)抗アポトーシス蛋白阻害薬による抗腫瘍効果の検討

BCLXL 蛋白阻害薬(WEHI-539)及び BCL2 阻害薬(ABT199)を用いて抗癌剤耐性株及び野生株大腸癌細胞の薬剤感受性を検討した。次に BCLXL に対する siRNA を遺伝子導入した抗癌剤耐性大腸癌細胞の 5-FU に対する感受性を検討した。さらに抗癌剤耐性株及び野生株大腸癌細胞の BCLXL 蛋白を抽出し、免疫沈降法にて BCLXL 結合蛋白を検討した。

(5) 動物モデルでの抗アポトーシス蛋白阻害薬による抗腫瘍効果

6 週齢雌の BALB/c ノードマウスの左背部皮下に抗癌剤耐性大腸癌細胞株を移植した。大腸癌細胞の生着を確認した後に、5-FU、BCLXL 蛋白阻害薬(A-1155463)及び PBS を 28 日間投与した。治療後に屠殺し、腫瘍量及び腫瘍内部のアポトーシス陽性細胞数を測定した。

4 . 研究成果

(1) 5-FU 耐性大腸癌細胞株の樹立とアポトーシス関連蛋白発現の検討

7 種類の大腸癌細胞株(DLD-1、HT-29、HCT-15、SW480、SW620、LoVo、COL0205)に対して 5-FU、SN38 及び Oxaliplatin に対する耐性株の作成を試みた。その結果、5-FU に耐性のある 3 種類の細胞株(DLD-1、HT-29、HCT-15)の安定的な継代培養に成功した(図2)。これら 3 種類の 5-FU 耐性大腸癌細胞株の IC50 は野生株と比して 10 倍以上の 5-FU 濃度であり、5-FU 曝露下において野生株と比してアポトーシス細胞の減少を認めた(図3)。次にこれら 3 種類の野生株及び耐性株のアポトーシス関連蛋白発現を検討したところ、抗アポトーシス蛋白の BCL2 は DLD-1 の耐性株で発現が下がっており、BCLW は DLD-1 耐性株で、BCL2 は HT-29 の耐性株でそれぞれ発現が増加していた。BCLXL と MCL1 は野生株と耐性株で発現に差はなかった。これらの結果から、3 種類の耐性株においてアポトーシス関連蛋白の発現に関して共通した傾向は認めなかった。

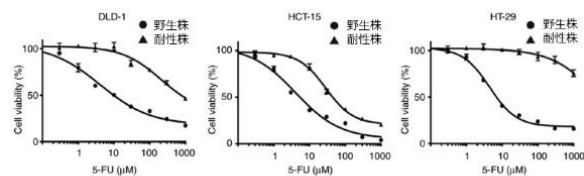


図2 5-FU耐性大腸癌細胞株の樹立

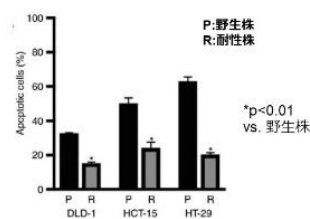


図3 5-FU耐性大腸癌細胞株のアポトーシスへの影響

(2) 5-FU 耐性大腸癌細胞株と BH3 プロファイリングとの関連

機能的なアポトーシスのプロファイリングとして 3 種類の大腸培養細胞株 (野生株、耐性株) の BH3 プロファイリングを行った (図 4)。その結果、BAD、PUMA、BMF、HRK 及び XXA1 ペプチドを暴露した際に、HT-29 の野生株と耐性株との間でミトコンドリアの脱分極の程度に差を認めた。このことは、HT-29 の 5-FU 耐性株が野生株と比して BCLXL 蛋白に依存していることを示唆する所見であった。



図4 大腸癌細胞株のBH3プロファイリング

(3) BCLXL 蛋白発現抑制による、5-FU 耐性大腸癌細胞の 5-FU 感受性への影響

5-FU 耐性株の BCLXL 蛋白が与える影響をさらに詳細に検討するため、3 種類の細胞株 (野生株、耐性株) に BCLXL 蛋白阻害薬 (WEHI-539) および BCL2 阻害薬 (ABT199) を曝露した。BCL2 阻害薬では 3 種類の細胞株の野生株と耐性株との間に感受性の差を認めなかった。一方 BCLXL 蛋白阻害薬では、DLD-1 と HCT-15 は野生株と耐性株との間に差を認めなかったが、HT-29 の耐性株では野生株と比して感受性が亢進していた (図 5)。この感受性亢進は、BCLXL 蛋白阻害により HT-29 の耐性株でのアポトーシスが増加していることが確認された。さらに siRNA により BCLXL 蛋白発現を低下させた HT-29 の耐性株では 5-FU の感受性が戻っており (図 6)、5-FU 曝露によるアポトーシスの増加も確認された。

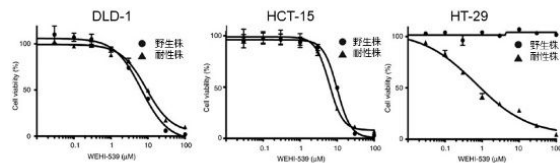


図5 大腸癌細胞株のBCLXL阻害薬に対する感受性

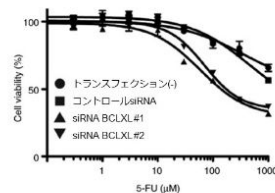


図6 BCLXLノックダウン大腸癌耐性細胞株の5-FUに対する感受性

一方 HT-29 の BCLXL 蛋白発現量は野生株と耐性株において差を認めなかった。そこで BCLXL 蛋白の機能的な解析をするため、BCLXL に結合するアポトーシス関連蛋白を免疫沈降法により検討した。その結果、耐性株の BCLXL 蛋白は野生株と比してアポトーシス蛋白 BIM が多く結合していることが分かった (図 7)。すなわち HT-29 の耐性株の BCLXL 蛋白を阻害することにより、隔離されていた BIM が遊離してアポトーシス経路を正に調節していることが明らかになった。

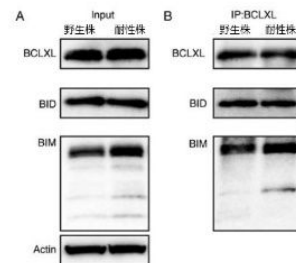


図7 BCLXLに結合するアポトーシス関連蛋白

(4) 動物モデルでの抗アポトーシス蛋白阻害薬による抗腫瘍効果

研究計画当初の目的は臨床検体を BH3 プロファイリングすることによって各々の感受性の傾向を検討することであった。しかし研究の進捗過程において、大腸癌細胞の BCLXL 蛋白の阻害により 5-FU 耐性を解除出来得る結果が出たため、BCLXL 阻害薬による大腸癌治療の応用を動物モデルを用いて検証することとした。

その結果、BCLXL 阻害薬(A-1155463)を 28 日間投与したマウスの 5-FU 耐

性大腸癌の腫瘍体積は、無治療群と比べて有意に縮小した(図 8)。さらに 5-FU 耐性大腸癌の腫瘍内部のアポトーシス細胞数も、無治療群と比べて有意に増加しており、BCLXL 蛋白阻害薬が 5-FU 耐性の大腸癌に対する治療法の 1 つの選択肢としてなりうることを示された。

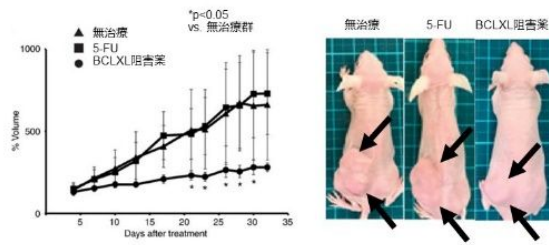


図8 BCLXL阻害薬の5-FU耐性大腸癌に対する治療効果
(動物モデル)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kazuma Ishikawa, Yutaka Kawano, Yohei Arihara, Tomohiro Kubo, Kohichi Takada, Kazuyuki Murase, Koji Miyanishi, Masayoshi Kobune, and Junji Kato | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 BH3 profiling discriminates the anti-apoptotic status of 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Report | 6. 最初と最後の頁 2416-2425 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2019.7373 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔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 | 加藤 淳二 (KATO Junji) (20244345) | 札幌医科大学・医学部・教授 (20101) | |
| 研究分担者 | 平川 昌宏 (HIRAKAWA Masahiro) (50561023) | 札幌医科大学・医学部・助教 (20101) | |
| 研究分担者 | 石川 和真 (ISHIKAWA Kazuma) (30722417) | 札幌医科大学・医学部・研究員 (20101) | |