

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11881

研究課題名(和文) 抗癌剤曝露依存的に活性化されるEphA4 を標的とした新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of new therapy method that targets EphA4 which is activated by chemotherapeutic reagents

研究代表者

喜名 振一郎 (Kina, Shinichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40422422

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)：高分化型腫瘍は、抗癌剤耐性であることが知られている。受容体型チロシンキナーゼ EphA4 は高分化型細胞株において発現が観察されたものの、低分化型細胞株では発現していなかった。高分化型細胞において、シスプラチンによる細胞死は、EphA4 の阻害剤を加えると増大していた。メカニズムとしては、シスプラチンに対する抗癌剤耐性は、活性酸素を介した、SrcファミリーであるLyn の活性化、さらにその後の EphA4 との複合体形成が関与していることが明らかになった。したがって、活性酸素-SFK-EphA4 というシグナル伝達の流れは、抗癌剤耐性を打破する新たなターゲットとなりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤治療においては、腫瘍のうち抗癌剤感受性が低い部分が、抗癌剤治療後も残存し、その後の再発の原因となっている。そのため、そのような腫瘍の残存を極力排除することが抗癌剤治療の成果をより高めることになる。高分化型領域は、抗癌剤耐性であることが知られている。我々は、高分化型腫瘍細胞株を用いて、高分化型腫瘍の抗癌剤耐性機構を解明し、その過程には、受容体型チロシンキナーゼEphA4 が関与していることを明らかにした。この結果は、EphA4 が抗癌剤治療の効果を高める新たなターゲットとなることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Well-differentiated regions of the tumor are intrinsically resistant to chemotherapy. Receptor tyrosine kinase erythropoietin-producing human hepatocellular receptor A4 (EphA4) protein is highly expressed in the well-differentiated tumor-derived cervical cancer cell line, but not in poorly differentiated tumor-derived cervical cancer cell lines. Pharmacological inhibition of EphA4 increased cisplatin-induced cell death in Caski cells. Mechanistically, cisplatin induces chemotherapy resistance of Caski cells by upregulating Lyn, a Src family kinase (SFK) that interacts with EphA4, through a pathway involving reactive oxygen species. Thus, the reactive oxygen species-SFK-EphA4 axis presents new potential drug targets for chemotherapy resistance.

研究分野：腫瘍薬理学

キーワード：高分化型腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術前化学療法は、抗癌剤感受性が良好である腫瘍患者において予後が良好である。高分化型腫瘍の方が、腫瘍が組織学的に完全に消失する (pathological Complete Response:pCR) 割合が低くなっていることを確認している。EphA4 は EphA(erythropoietin-producing human hepatocellular receptors) ファミリーに属する RTK であり、高分化型肺腺癌(1)、癌幹細胞 (2)、放射線耐性口腔癌細胞株 (3) において高発現していることが報告されている。癌幹細胞は、抗癌剤耐性との関わりが指摘されているが、EphA4 それ自体の抗癌剤耐性との関わりは全く不明である。

2. 研究の目的

頭頸部領域において、口腔癌は最も抗癌剤が効きにくく、抗癌剤耐性を示す腫瘍である。抗癌剤耐性には、抗癌剤曝露による受容体型チロシンキナーゼの活性化が関わっている。EphA4 は高分化型腫瘍や、癌幹細胞に高発現している受容体型チロシンキナーゼである。申請者は、すでに癌細胞において、抗癌剤 (シスプラチン) 曝露によって、EphA4 が活性化されることを見出している。新たな標的因子としての可能性を探るために、抗癌剤曝露によって活性化される EphA4 の生物学的機能、および活性化機構を解明する。その活性化を阻害する方法論を探索することで、抗癌剤耐性を抑制する新規治療戦略を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

申請者は、すでにシスプラチン曝露による EphA4 の活性化が、癌細胞の生存に関与していることを MTT assay により確認している。その際、癌細胞内では p16 の発現が減少することを見出しており、EphA4 の活性化がどのように p16 の発現減少を惹起するか検討する。その過程で EphA4 の基質を見出す。さらに細胞レベルで観察された結果が、臨床レベルでも生じているかという点に関しても、術前化学療法が施行された口腔癌患者の切除検体を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) 化学療法後、腫瘍が微小に残存する過程には、活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) が関与している。受容体型チロシンキナーゼ EphA4 は、抗癌剤耐性である高分化型子宮頸がん細胞株においては発現しているものの、抗癌剤感受性である低分化型子宮頸がん細胞株では発現していなかった。EphA4 は抗癌剤曝露後、活性酸素を介して、チロシンリン酸化された。そこで EphA4 の阻害剤と抗癌剤を併用したところ、高分化型癌細胞株の細胞死が増大していた。このメカニズムを検討したところ、活性酸素依存的な Lyn - EphA4 複合体の形成が高分化型腫瘍の抗癌剤耐性を誘導していることが明らかになった。以上より、高分化型腫瘍の抗癌剤耐性を打破するターゲットとして、EphA4 が有望な候補となることが判明した。

(2) 高分化型腫瘍は抗癌剤耐性である

術前化学療法後の口腔癌組織における腫瘍の残存の有無を、病理学的に検討し、どのような腫瘍の特徴が抗癌剤感受性に影響を与えているか検討した結果、組織学的分化度がその因子であることが判明した(図1)。さらに、術前化学療法後に再発を生じた場合には、抗癌剤耐性である高分化型腫瘍の方が、低分化型腫瘍と比較して、予後が不良であることも明らかになった。

Variable	Patients with pCR (N = 19)	P Value
Sex - no./total no. (%)		0.57
Male	11/41(27)	
Female	8/23(35)	
Pathological differentiation - no./total no. (%)		0.04
Well	11/49(22)	
Poorly or moderately	8/15(53)	
Clinical-stage - no./total no. (%)		0.17
Stage I	12/31(39)	
Stage II	7/33(21)	

図1. 高分化型腫瘍は抗癌剤耐性である

(3) 抗癌剤曝露依存的な EphA4 のチロシンリン酸化は、高分化型癌細胞株の抗癌剤耐性に関与している

抗癌剤耐性には、受容体型チロシンキナーゼ (Receptor Tyrosine Kinase: RTK) が関与していることをふまえ、TCGA を用いて、高分化型腫瘍において高発現している RTK を調査した。肺腺癌において、高分化型腫瘍で高発現している EphA4 は、頭頸部腫瘍においても、高発現していることがわかった。EphA4 は子宮頸がん細胞株においても、高分化型細胞株である Caski において高発現していたことより、EphA4 は高分化型腫瘍において高発現していることが示唆された。また、EphA4 は、子宮頸がん細胞株において、シスプラチンあるいは、過酸化水素曝露にチロシンリン酸化され、degradation が生じていることが観察された。これらの結果より、EphA4 はシスプラチン曝露後、活性酸素を介して、チロシンリン酸化 (活性化) されることが推察された。

これまでの報告より、EphA4 阻害剤である C1 は EphA4 のチロシンリン酸化を抑制するものの、それ単独では、細胞毒性を有していないことが明らかになっている。EphA4 阻害剤である C1 単独では、Caski 細胞に対して、細胞毒性が観察されなかった。IC50 の値を、シスプラチン単独と、C1 を併用した場合とで算出した。その結果、シスプラチンと EphA4 阻害剤 C1 との間では

薬理的に相互作用が生じていることが判明した。以上の結果より、EphA4 は高分化型細胞株の抗癌剤耐性に関与していることがわかった。

(4)Caski 細胞において、抗癌剤曝露依存的な EphA4 の活性化は、Src 阻害剤で抑制される活性化された EphA4 は Src 型キナーゼである Fyn や Lyn と複合体を形成していることが報告されている。EphA4 と Lyn との複合体は、Src 阻害剤である PP2 を加えるとその形成が抑制された。これらより、シスプラチン曝露依存的な EphA4 の活性化には Src family キナーゼである Lyn が関与していることがわかった。

(5) EphA4 の阻害は、抗癌剤曝露後に生じる活性酸素依存的な Senescence の誘導を増大させる Caski 細胞に過酸化水素を曝露したところ、C1 を添加していた場合には、細胞のサイズが大きくなり、多核化が生じていた。

(6)EphA4 は IL-24 の発現抑制し、TNF- α の発現を増大させる

我々は、EphA4 が有する抗癌剤耐性に関与している遺伝子は、シスプラチン曝露後に EphA4 の阻害剤を加えることで変動を示すであろうと予測した。マイクロアレイを用いた解析より、シスプラチン曝露後に 270 の遺伝子が変動し、EphA4 阻害剤を添加した場合には 40 の遺伝子が変動していた。興味深いことに、シスプラチン曝露依存的に変動しつつ、EphA4 阻害剤を加えた場合でも変動する遺伝子の中には、3 つのサイトカインが含まれており、これらは、腫瘍

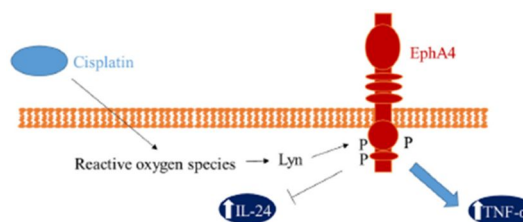


図2. EphA4 依存的な遺伝子発現の変動

微小環境に影響を与えていると考えられた。IL-24 は IL-10 family に属しており、細胞をアポトーシスに誘導することが知られている。シスプラチン依存的な EphA4 の活性化が抗癌剤耐性に関与していることをふまえると、変動のある遺伝子の中には、アポトーシスに関与する遺伝子が含まれているものと考えた。Real Time PCR を用いた実験から、IL-24 はシスプラチン曝露後に発現が上昇しつつ、EphA4 阻害剤 C1 を加えるとさらに発現が増大していることがわかった。さらに、TNF- α は、シスプラチン曝露後、発現が上昇し、EphA4 の阻害剤を加えると発現が抑制された。シスプラチン曝露と活性酸素曝露により生じる反応が類似していることより、シスプラチン曝露による EphA4 の活性化は、活性酸素を介していることが推測された (図 2)。

(7) 我々の実験結果は、受容体型チロシンキナーゼ EphA4 はシスプラチンや活性酸素によりチロシンリン酸化 (活性化) され、その意義は、高分化型腫瘍において抗癌剤曝露後に生じる Senescence の誘導を抑制しているということを示している。抗癌剤治療後に再発が生じた際に、高分化型腫瘍は低中分化型腫瘍と比較して、予後が不良となっていることより、我々は、高分化型腫瘍に生じる抗癌剤耐性のメカニズムは、低中分化型腫瘍と異なるものであろうと推測している。一連の結果より、EphA4 は高分化型腫瘍の抗癌剤耐性を誘導する非常に重要な因子であることを明らかにした。

< 引用文献 >

- 1) P Saintigny et al. Mol Cancer Ther.2012
- 2) H Lu et al. Nature Cell Biology. 2014
- 3) T Ishigami et al. Int J Cancer.2007

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kina Shinichiro, Nakasone Toshiyuki, Kinjo Takao, Nimura Fumikazu, Sunagawa Nao, Arasaki Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Outcomes after up-front surgery and metronomic neoadjuvant chemotherapy with S-1 or UFT for early tongue squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2689-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kina S, Kinjo T, Liang F, Nakasone T, Yamamoto H, Arasaki A.	4. 巻 840
2. 論文標題 Targeting EphA4 abrogates intrinsic resistance to chemotherapy in well-differentiated cervical cancer cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 70-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.09.031.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamanaha-Nakasone Ayumi, Uehara Karina, Tanabe Yasuka, Ishikawa Haruna, Yamakawa Natsuko, Toyoda Zensei, Kurima Kiyoto, Kina Shinichiro, Tsuneki Masayuki, Okubo Yuko, Yamaguchi Sayaka, Utsumi Daisuke, Takahashi Kenzo, Arakawa Hirofumi, Arasaki Akira, Kinjo Takao	4. 巻 9
2. 論文標題 K1 gene transformation activities in AIDS-related and classic type Kaposi 's sarcoma: Correlation with clinical presentation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42763-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higa Nakamine Sayomi, Okitsu Sakurayama Shiho, Kina Shinichiro, Yamamoto Hideyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Fyn mediated phosphorylation of Pyk2 promotes its activation and dissociation downstream of gonadotropin releasing hormone receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 喜名 振一郎、山本 秀幸、仲嶺 三代美、鳥原 英嗣、金城 貴夫、新崎 章
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼEphA4 の高分化型腫瘍における抗癌剤耐性能について
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔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	金城 貴夫 (Kinjo Takao) (30284962)	琉球大学・医学部・教授 (18001)	
研究分担者	仲宗根 敏幸 (Nakasone Toshiyuki) (40381214)	琉球大学・医学部附属病院・講師 (18001)	
研究分担者	喜名 美香 (Kina Mika) (80578914)	群馬大学・医学部附属病院・医員 (12301)	