

令和元年5月21日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15531

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耐性獲得防止法と自然耐性克服法の開発

研究課題名(英文) Strategy for prevention of acquired resistance and overcoming of natural resistance to decitabine in colorectal cancer cells

研究代表者

細川 美香 (Mika, Hosokawa)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAメチル基転移酵素(DNMT)阻害薬デシタピン(DAC)の長期暴露により耐性を獲得した大腸がん細胞は、DAC活性化酵素dCKの発現が低下していた。獲得耐性は、DACとは活性化酵素が異なるDNMT阻害剤アザシチジンの使用により一部改善できる可能性が示された。一方、DACに元々耐性を示す大腸がん細胞における自然耐性の機構は、獲得耐性とは異なる機構であることが分かった。DACに自然耐性を示す細胞においても、WNTシグナル経路の阻害剤や抗がん剤オキサリプラチンと併用することで相乗的な効果をもたらすことが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAメチル基転移酵素(DNMT)阻害薬デシタピン(DAC)を用いてがん治療を行っている際に、DACの長期投与により効果が低下する耐性が認められた場合の対策法に関する知見が得られた。治療前からDACに対して耐性を示す場合においても、DACと併用することで効果を高める可能性のある物質が見出された。

本研究で得られた成果は、エピジェネティック機構を標的とする新規抗がん剤であるデシタピンを有効活用するための有益な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer cells acquired resistance by the long-term exposure with a DNA methyltransferase (DNMT) inhibitor, decitabine (DAC). In acquired resistant cells to DAC, the expression of dCK (active enzyme of DAC) decreased. Acquired resistance to DAC was partly improved by another DNMT inhibitor, azacytidine, which is metabolized into active form by different enzyme from dCK. On the other hand, the mechanism of natural resistance to DAC in colorectal cancer cells, which originally showed resistance to DAC, was different from that of acquired resistance to DAC. In natural resistant cells to DAC, synergistic cytotoxic effects were observed when DAC was treated with WNT signal pathway inhibitor or anti-cancer drug, oxaliplatin.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：デシタピン 獲得耐性 自然耐性 エピジェネティック 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの原因として、遺伝子変異に加えてエピジェネティック（遺伝子の修飾により遺伝子発現が決定される現象）な変化が注目されており、この機構を標的としたエピジェネティック修飾薬は新たな抗がん剤として期待されている。その中で、DNAメチル基転移酵素（DNMT）阻害剤は、血液系がんで承認されている。一方、固形がんではDNMT阻害剤単独での効果は乏しく、他の抗がん剤との併用による効果の増強が試みられている。抗がん剤を用いたがん化学療法では、元々抗がん剤が効かない症例（自然耐性）や、治療継続中に効果が低下する症例（獲得耐性）が治療の障壁となっている。従来の抗がん剤に関しては、耐性に関する情報が集積されつつあるが、DNMT阻害剤をはじめとしたエピジェネティック修飾薬に関しては情報が少ないのが現状である。DNMT阻害剤の中でもデシタピン（DAC）は、直接的な関連性のある類似物質は存在しないとされており、主作用であるDNMT阻害作用以外にも、従来の薬からは予測不可能な未知の作用が多く存在すると考えられている。これまでに、エピジェネティックな遺伝子修飾情報が蓄積されている固形がんの一つである大腸がんの細胞を用い、DACの長期暴露によりDACに対する獲得耐性細胞を樹立している。

2. 研究の目的

ジェネティック及びエピジェネティック特性の異なる大腸がん細胞を用い、エピジェネティック修飾薬であるDNMT阻害薬DACの耐性獲得防止と自然耐性を克服するための新たな具体的対策法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) DAC獲得耐性化細胞の樹立

DACに対する感受性の高いヒト大腸がん細胞株 HCT116 細胞及び SW620 細胞を用い、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日間処置の処置により親細胞と比較して約50倍以上の耐性を獲得し、これらの細胞をDACに対する獲得耐性化細胞とした。耐性化の程度は、WST-8法によるDAC処置後の細胞生存率及び、DNAメチル化により制御を受ける遺伝子（*SFRP1*、*HPPI*）のmRNA発現による評価した。なお、DACに対する自然耐性化細胞としては、DAC感受性細胞のHCT116及びSW620細胞よりもDACに対して約50倍以上耐性を示すHT29及びSW480細胞を用いた。

(2) 細胞生存率

Cell Counting-8 kit を用い、吸光度測定（450nm/650nm）により行った（WST-8 アッセイ）。

(3) 遺伝子発現解析

mRNA 発現は real-time PCR 法、タンパク発現は Western blot 法により評価した。

(4) siRNA transfection

Lipofectamine RNAiMax を用いて各遺伝子に対する siRNA を transfection した。

(5) マイクロアレイ解析

HCT116 control 細胞(HCT116/C) vs DAC 耐性 HCT116 細胞(HCT116/DAC) vs HT29 細胞(3群)、HCT116 未処置 vs HCT116 DAC 処置(2群)、HT29 未処置 vs HT29 DAC 処置(2群) で比較を行い、各細胞から抽出した RNA を用いた。マイクロアレイ解析は Agilent Expression Array, SurePrint G3 Human GE 8x60K v3 (Agilent Technologies 社) により実施した。mRNA 発現 signal 値について、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 を満たす遺伝子を変動遺伝子として検討に用いた。GO 及び Pathway 解析は、DAVID 6.8 を用いた ($p < 0.05$)。Network 解析は、Cytoscape 3.3.0 plug-in Reactome Functional Interaction (FI) Network (2015 version) を用いた (FDR < 0.01)。

(6) 併用効果の評価

Combination index (CI) 値は、薬物の単独及び併用処置の細胞毒性データを用いて、CalcuSyn software により算出した。Steel と Peckham による isobologram は、薬物単独処置時の dose-response curve に基づいて isoeffect curve を描いて作成した。Isobologram 内に CI 値をプロットし、additivity (相加性) の envelope より下に CI 値がプロットされた場合は相乗効果、envelope 内にプロットされた場合は相加効果、envelope より上にプロットされた場合は拮抗効果とした。

(7) 細胞内活性酸素 (ROS) レベル

細胞透過性蛍光 probe DCFH-DA を添加し、1時間後に吸引した。その後、薬物を処置し3日間曝露した。細胞内 ROS レベルは、細胞内に取り込まれた DCFH-DA の代謝物 DCF の蛍光強度(波長: Ex 485nm/ Em 535nm) により測定した。

4. 研究成果

(1) DAC 耐性化機構の検討：DAC の効果に関わる既知因子の検討

長期暴露による獲得耐性化の機構

HCT116 及び SW620 細胞の DAC 獲得耐性細胞では、DAC の活性化酵素 dCK のタンパク発現低下及び DAC の不活化酵素 CDA のタンパク発現上昇が認められた。各々の酵素の寄与を検討するために siRNA を行った。HCT116 細胞の control 細胞に対して dCK siRNA 処置を行ったところ、耐性細胞と同程度まで DAC の細胞生存率が増大し、DAC 処置により増大した SFRP1 mRNA の発現も顕著に低下した (図 1)。一方、control 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。また、耐性細胞(HCT116/DAC)に対して CDA siRNA 処置を行ったところ、細胞生存率は低下したが親細胞と比べて高く、SFRP1 の mRNA 発現の回復には至らなかった。DAC 耐性の獲得には、CDA よりも dCK の寄与が大きい可能性が考えられた。そこで dCK 発現低下の機構として、dCK 安定化に関わる HuR のタンパク発現を検討したところ、発現変動は認められず dCK 発現の低下機構の同定には至らなかった。今後、耐性の防止法を見出すためには、dCK 発現の低下機構を精査する必要がある。

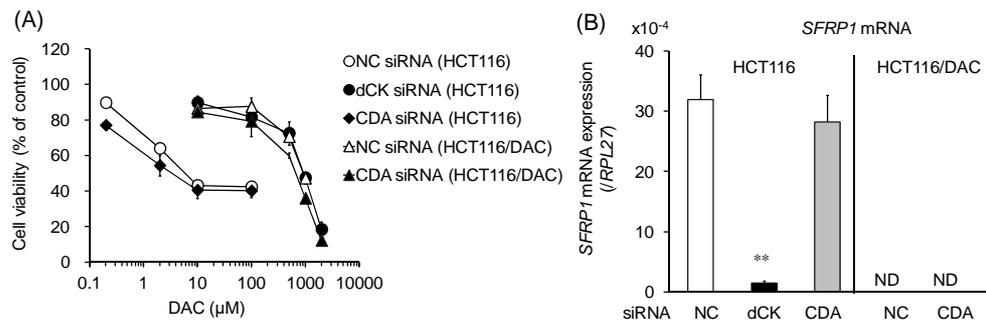


図 1. DAC 獲得耐性細胞(HCT116/DAC)における DAC 処置後の細胞生存率(A)及び DNA メチル化制御遺伝子 mRNA 発現(B)に及ぼす dCK/CDA siRNA の影響

**p<0.01(vs NC); ND, Not detected.

低感受性を示す自然耐性の機構

自然耐性への DAC の活性化酵素 dCK 及び不活化酵素 CDA の関与を検討したところ、自然耐性細胞は、感受性細胞 (HCT116 及び SW620) と同等の dCK タンパク発現が認められ、dCK 遺伝子に変異も認められなかった。一方、CDA タンパク発現は検出されなかった。従って、獲得耐性化機構とは異なり、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。

(2) DAC 耐性化機構の検討：既知因子以外の関与因子の探索

長期暴露による獲得耐性化の機構

DAC に対する耐性において、代謝酵素のような既知因子以外の関与について調べるため、マイクロアレイ解析を行った。獲得耐性化細胞においてインターフェロン経路の遺伝子群に発現上昇が認められた。

低感受性を示す自然耐性の機構

獲得耐性化細胞と比較して自然耐性細胞では、BMP シグナル経路の亢進を介した WNT シグナル経路の遺伝子群の発現が上昇していた。

(3) DAC 耐性の改善方法に関する検討

DNMT 阻害物質を用いた検討

DAC 耐性獲得機構として dCK 発現低下が明らかになったため、効果発現に dCK が関与しない他の DNMT 阻害剤を用いて、DAC 獲得耐性細胞の DAC 耐性を改善し得るか否か検討した。DAC と同様に DNA に組み込まれた後に DNMT と結合するシチジン系 DNMT 阻害剤 (アザシチジン, AC; ゼブラリン, Zeb) に加え、直接 DNMT を阻害する物質として RG108、プロカインアミド (Pro)、ヒドララジン (Hyd)、ポリフェノール類 (クルクミン, Cur; ケルセチン, Quer; エピガロカテキンガレート, EGCG) を用いて行った。まず、検討した DNMT 阻害物質は DAC 耐性細胞において交差耐性を示さなかった。DNA メチル化阻害により発現が増大する DNA メチル化制御遺伝子 (SFRP1, HPPI) の mRNA 発現を検討したところ、AC のみで mRNA 発現が増大し、DNA メチル化阻害作用が認められた (図 2)。その作用は DAC より弱かったものの、DAC 耐性を改善する可能性が示された。

さらに、DNMT 阻害効果があると報告されている、DNMT をクライアントタンパクとする HSP90 の阻害剤(17-AAG、17-DMAG)を用いて DAC 耐性改善効果を検討したが、獲得耐性及び自然耐性の改善には至らなかった。

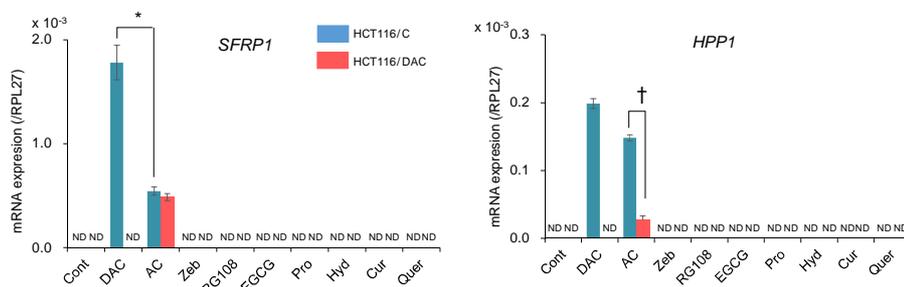


図 2. 各種 DNMT 阻害物質単独処置後における DNA メチル化制御遺伝子(SFRP1、HPP1)の mRNA 発現量比較

* $p < 0.05$, † $p < 0.05$; ND, Not detected.

siRNA を用いた検討

獲得耐性化細胞において発現上昇が認められたインターフェロン経路に関連した遺伝子 (STAT1、PPAR12) の siRNA を行ったが、DAC の感受性は改善しなかった。

自然耐性細胞において発現上昇が認められた BMP シグナル経路のネットワークを形成していた遺伝子の内 BMP4 に着目し siRNA を行ったが、DAC の感受性改善には至らなかった。

阻害剤を用いた検討

上記(2)の結果より、自然耐性細胞において WNT シグナル経路の遺伝子群の発現上昇が認められたため、各種 WNT 経路阻害剤を DAC と併用し殺細胞効果を評価し、相乗効果の指標である CI 値を算出した。検討した WNT 経路阻害剤の内、CP21R7 で相乗的な殺細胞効果が認められた(図3)。

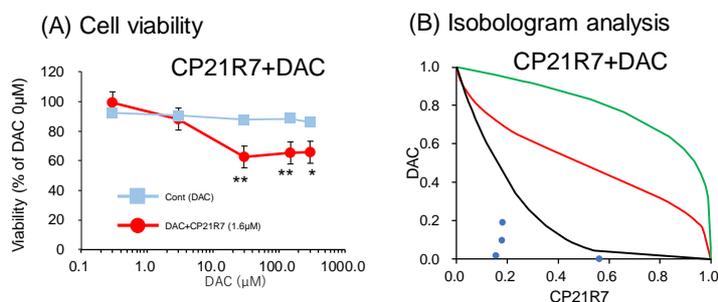


図 3. WNT 経路阻害剤 CP21R7 と DAC の併用による殺細胞効果

(A) * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ (vs Cont), (B) CP21R7(1.6 μ M)+DAC(3, 30, 150, 300 μ M)

DAC と類似構造体の DNMT 阻害剤アザシチジンの獲得耐性化機構として、DNA 損傷応答経路の活性化が報告されている。そこで、各種 DNA 損傷応答経路の阻害剤 (KU55933, caffeine, ATM 阻害剤; VE-821, ATR 阻害剤; AZD2461, PARP 阻害剤) によって耐性が改善されるか否か検討した。その結果、獲得耐性細胞では、各種 DNA 損傷応答経路の阻害剤の処置によって DAC の殺細胞効果の増強は認められなかった。さらに、自然耐性細胞でも同様に各種 DNA 損傷応答経路の阻害剤の影響を検討したところ、自然耐性細胞の AZD2461 併用時のみで、DAC 単独と比べて殺細胞効果は増強した。従って、自然耐性細胞では DNA 損傷応答経路の PARP 阻害により DAC 耐性改善効果が一部認められた。

他の抗がん剤との併用効果

DAC は、併用する抗がん剤の効果を高めることが報告されている。DAC に自然耐性を示す低感受性の HT29 細胞においても、DAC 処置によりマイクロアレイ解析において多くの遺伝子の発現変動が認められたため、併用薬の効果に影響を及ぼす可能性も考えられる。

HT29 細胞において、大腸がん用いられる抗がん剤として 5-フルオロウラシル (5-FU)、イリノテカン (CPT-11) またはオキサリプラチン (L-OHP) と、DAC との併用による殺細胞効果を検討したところ、L-OHP と併用した場合のみで殺細胞効果が増強した。CI 値 (CI<1) かつ isobologram 解析における CI 値のプロット位置(曲線の下)から、相乗効果があることが分かった(図4)。

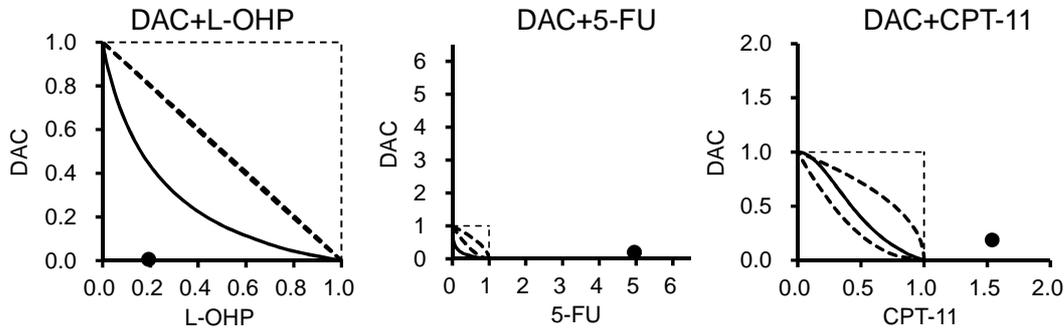


図 4. HT29 細胞における DAC と抗がん剤の併用による殺細胞効果 (アイソボログラム解析) DAC(20 μ M), L-OHP(0.5 μ M), 5-FU(1.5 μ M), CPT-11(3.0 μ M)

相乗効果の機構を検討するために、まず DAC が DNA に取り込まれているかを DNA 損傷マーカーのタンパク発現により評価したところ、DNA 単独処置で DNA 損傷マーカーのタンパク発現が増大し、DAC はリン酸化体に代謝され DNA に取り込まれていると考えられた。そこで DNA 取り込み後の作用として、DNA 損傷マーカーの発現及び DNA 脱メチル化作用による遺伝子の mRNA 発現を検討したところ、併用によって増強されなかった。次に ROS 産生に着目すると、L-OHP 単独では増加したものの、DAC 単独では変化しなかった。一方、これら両者を併用した場合には相乗的に増大することが示された (図 5A)、更に併用により増強した細胞毒性が抗酸化剤 (NAC) の添加により相殺された (図 5B)。以上の結果より、DAC 自体は ROS 産生作用を有しないが、ROS 産生を間接的に増大させることにより L-OHP の効果を相乗的に高めることが示された。

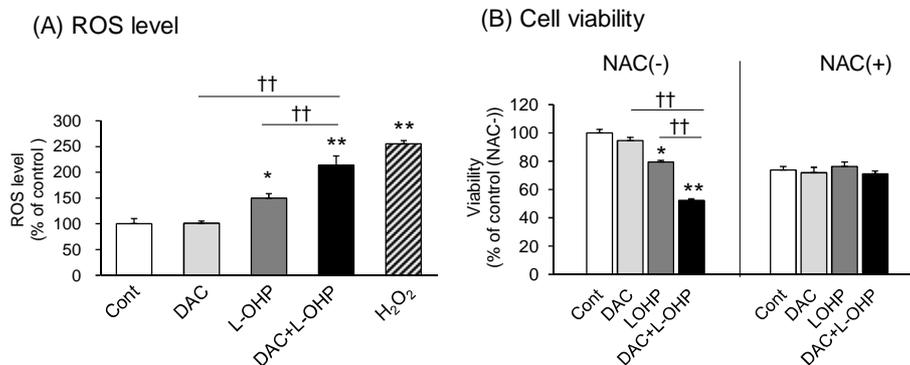


図 5. ROS 産生に及ぼす DAC と L-OHP 併用の影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs Cont), †† $p < 0.01$ (vs DAC or L-OHP).

以上より、DAC の長期暴露により耐性を獲得した細胞は、DAC 活性化酵素 dCK の発現が低下しており、活性化酵素の異なるアザシチジンの使用により耐性を一部改善できる可能性が示された。DAC に元々耐性を示す自然耐性の機構は、獲得耐性とは異なる機構であることが分かった。DAC に対して自然耐性を示す機構の根本的な解明には至らなかったが、DAC に自然耐性を示す細胞においても、他の物質と併用することで相乗的な効果をもたらすことが見出された。

今後は、DAC の作用には依然として未解明の作用も多く存在すると考えられるため、DAC と併用することで相乗効果をもたらす物質の選別や相乗効果の詳細な機構について検討する等、有効活用するための情報を集積する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hosokawa M, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S, Ogawara KI. Decitabine exerted synergistic effects with oxaliplatin in colorectal cancer cells with intrinsic resistance to decitabine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 509, 249-254, 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.115

2. Hosokawa M, Tanaka S, Ueda K, Iwakawa S. Different schedule-dependent effects of epigenetic modifiers on cytotoxicity by anticancer drugs in colorectal cancer cells. *Biol. Pharm. Bull.* 査読有, 40, 2199-2204, 2017.
DOI: 10.1248/bpb.b17-00439

[学会発表](計7件)

1. 生木梨紗子、細川美香、田中章太、上田久美子、岩川精吾、大河原賢一、DNA メチル基転移酵素阻害剤デシタピンに対する耐性を改善する物質の探索、日本薬学会 第 139 年会、2018 年
2. 細川美香、田中章太、上田久美子、岩川精吾、大河原賢一、エピジェネティック修飾薬デシタピンはオキサリプラチン併用により相乗効果を示す—デシタピンに自然耐性を示す大腸がん細胞での相乗効果の機構解明—、第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2018年
3. 細川美香、城古剛宏、田中章太、上田久美子、岩川精吾、大河原賢一、デシタピン耐性がん細胞でのデシタピンとオキサリプラチン併用による相乗効果の機構、第 24 回創剤フォーラム若手研究会、2018 年
4. Mika Hosokawa, Shota Tanaka, Kumiko Ueda, Ken-ichi Ogawara, Seigo Iwakawa, Decitabine Provided Synergistic Effects with Oxaliplatin in Colon Cancer Cells with Intrinsic Resistance to Decitabine, The 2nd Workshop for Korea-Japan Young Scientists on Pharmaceuticals, 2018
5. 樋口翔太、細川美香、河野祥吾、田中章太、上田久美子、大河原賢一、岩川精吾、逆相 HPLC-UV 法を用いた deoxycytidine kinase 及び cytidine deaminase により生成するゲムシタピン代謝物の同時定量法の検討(2)、日本薬剤学会第 33 回年会、2018 年
6. 河内いずみ、細川美香、田中章太、上田久美子、大河原賢一、岩川精吾、デシタピンと Wnt 経路阻害薬の大腸がん細胞の殺細胞作用における併用効果、日本薬剤学会第 33 回年会、2018 年
7. 河野祥吾、細川美香、樋口翔太、田中章太、上田久美子、岩川精吾、逆相 HPLC-UV 法を用いた deoxycytidine kinase 及び cytidine deaminase により生成するゲムシタピン代謝物の同時定量法の検討、日本薬物動態学会 第 32 回年会、2017 年