

令和元年6月8日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16568

研究課題名(和文) ファルネシル転換酵素阻害薬を用いた胃癌腹膜播種に対する新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for scirrhous gastric cancer using farnesyltransferase inhibitor

研究代表者

田中 智和 (Tanaka, Tomokazu)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60781903

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)：腹膜播種を高度に引き起こすスキルス胃癌は、極めて悪性が高く、治療抵抗性であり、依然として新たな治療法の開発が望まれる。本研究では、スキルス胃癌に対する新規治療戦略として、ファルネシル転換酵素阻害薬(FTI)による抗腫瘍効果およびそのメカニズムを検証した。FTIは胃癌細胞の増殖能や転移能を抑制したが、特質すべきはHIF1- 高発現胃癌細胞(HIF1- 高発現=高悪性度)においてより強い抗腫瘍効果を示した点であった。動物実験でも同様の効果を検証した。そのメカニズムとして、FTIがHIF1- 発現を阻害する他、mTOR経路(癌増殖に関わるシグナル伝達経路の一種)の抑制や活性酸素の抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果(FTIのHIF1- 高発現胃癌細胞に対する抗腫瘍効果)によって、難治性転移様式である胃癌腹膜播種を発症した患者に対する新たな治療方法の選択肢となり得る可能性がある。また、腹膜播種を高率に発症するような高悪性度のHIF1- 高発現胃癌細胞にこそ治療効果が期待でき、腹膜播種再発の予防としての効果も期待できる。さらには、HIF1- 高発現は、ほとんどの固形癌に共通する高悪性度の指標であることから、FTIの治療効果は胃癌細胞のみならず、HIF1- 高発現であれば他の固形癌においても治療効果が期待できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Scirrhous gastric cancer causing peritoneal dissemination frequently has extremely high malignant potential and resistance to treatment, therefore the development of new treatment for scirrhous gastric cancer is still desirable. In this study, we examined the anti-tumor effect of farnesyltransferase inhibitor (FTI) and its mechanism of action as a novel therapeutic strategy for scirrhous gastric cancer. FTI suppressed proliferation and migration of gastric cancer cells. Of note, FTI showed stronger anti-tumor effect on gastric cancer cells with HIF1- high expression (HIF1- high expression = high malignant potential). The same results were verified in animal experiments. As the mechanism of anti-tumor effect, FTI inhibited HIF1- expression, and also suppressed mTOR pathway (a kind of signal transduction pathway involved in cancer growth) and the production of reactive oxygen species.

研究分野：消化器癌

キーワード：ファルネシル転換酵素阻害薬 HIF-1 腹膜播種 胃癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種を高度に引き起こすスキルス胃癌などは、極めて生物学的悪性度が高い上、治療抵抗性であり、依然として新たな治療戦略の開発が望まれる癌腫の一つである。

転写因子である HIF-1 α は、癌の低酸素応答の中心的な役割を果たし、血管新生や浸潤能、転移能、Warburg 効果と呼ばれる癌に特徴的なエネルギー代謝変容、さらには抗癌剤耐性など、癌の悪性形質獲得およびその増強に大きく寄与している。申請者をはじめ、当科研究室では、これまでに HIF-1 α およびその下流遺伝子の発現が胃癌の 5-FU の耐性に寄与し、5-FU 系術後補助化学療法後の再発予測因子であること (Nakamura et al. Int J Cancer 2010)、胃癌において HIF-1 α は Warburg 効果およびミトコンドリア活性酸素を制御するマスター因子であること、さらに HIF-1 α のノックダウンにより Warburg 効果の破綻と活性酸素の過剰蓄積を誘発することで、エネルギー代謝変容を利用してアポトーシスを誘導すること (Tanaka et al. Int J Oncol 2013)、さらに HIF-1 α がスキルス胃癌の腹膜播種を増強すること (Miyake, …Tanaka et al. Int J Oncol 2013) を報告してきた。

他方、我々は、タンパクのファルネシル化に着目した研究において、ファルネシル転換酵素阻害薬 (FTI) である Tipifarnib が、HIF-1 α 高発現、高転移能を示すトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) に対して、特異的に転移抑制効果を示すことを明らかにした (Tanaka et al. J Cell Physiol 2016)。

したがって、Tipifarnib が、HIF-1 α 高発現を示す高悪性度癌に効果を発揮する (転移能を抑制する) 可能性があり、HIF-1 α や Snail の発現抑制、エネルギー代謝変容を中心とした転移抑制メカニズムが推定される。一方、腹膜播種を高度に形成する胃癌は、HIF-1 α が高発現、強誘導であり、かつミトコンドリア活性酸素が高いという性質を有しており、低用量の Tipifarnib が、TNBC 同様に、腹膜播種高度形成胃癌に対しても転移能および悪性形質に対して抑制効果を示す可能性がある。即ち、腹膜播種に対する有効な治療法となり得る可能性があり、その作用メカニズムの解明、マウスモデルの確立およびマウスモデルによる治療効果の検証は極めて興味深いものである。それらが明らかになれば、これまでにないアプローチの治療戦略として、腹膜播種治療法、あるいは予防法の新たな選択しとなり得る可能性がある。

2. 研究の目的

FTI である Tipifarnib が、腹膜播種を引き起こすスキルス胃癌に対して、有効な播種抑制効果を発揮する可能性に期待し、本研究では、Tipifarnib の腹膜播種能に対する抑制効果およびその抑制メカニズムを検証し、胃癌腹膜播種に対する新たな治療戦略の確立に向けた基礎的研究を目的とする。

3. 研究の方法

- ① 種々の胃癌細胞株 (MKN45、KATOIII、MKN74) を用いて、HIF-1 α の発現程度およびファルネシル転換酵素阻害剤 (Tipifarnib) による HIF-1 α 抑制効果を Western blot で評価する。
- ② HIF-1 α 高発現胃癌細胞株 (腹膜播種高度形成胃癌)、低発現細胞株、安定ノックダウン細胞株を用いて、FTI の転移能抑制効果の違いについて増殖能 (Trypan blue 法や MTS 法) および遊走能 (Wound healing assay) で検証を行う。同時に、Snail や E-cadherin など、転移能に関わる因子の発現変化について Western blot で評価を行う。
- ③ Tipifarnib のターゲットとなるファルネシル化蛋白 (遺伝子) をピックアップし、癌の悪性化に関連するシグナル伝達経路に位置する遺伝子について、そのファルネシル化および Tipifarnib によるファルネシル化の変化を評価する (Western blot)。さらに同遺伝子に関連するシグナル伝達経路の下流に位置する遺伝子群についても、その活性化を評価する (Western blot)。
- ④ HIF-1 α 高発現胃癌細胞株 (腹膜播種高度形成胃癌)、低発現細胞株、安定ノックダウン細胞株を用いて、Tipifarnib による活性酸素産生量の変化を FACS あるいは Confocal microscopy で評価し、さらに活性酸素スカベンジャー酵素群の発現についても RT-qPCR で評価する。
- ⑤ HIF-1 α の高発現細胞株、低発現細胞株を用いて、ヌードマウスを用いて皮下腫瘍モデル (マウスモデルの作成手順は確立済み: Miyake, …Tanaka et al. Int J Oncol 2013) を作成し、FTI の抗腫瘍増殖効果、抗腹膜播種効果を検証する。

4. 研究成果

※上記、3. 研究の方法の番号 (①~⑤) と以下の番号は対応しない。

① 複数の胃癌細胞株を用いて、HIF-1 α の発現を Western blot で評価した。低分化型由来である MKN45 および印環細胞由来である KATOIII を腹膜播種を引き起こす高悪性度胃癌細胞と想定。MKN45 および KATOIII において HIF-1 α の高発現を認め、一方、中分化型由来である MKN74 においては、その発現はほとんど認められなかった (Fig. 1)。

② FTI である Tipifarnib を胃癌細胞株に投与したところ、MKN45 および KATOIII において濃度依存性に HIF-1 α の発現が抑制された (Fig. 2)。

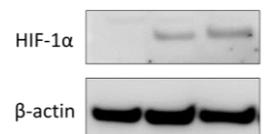
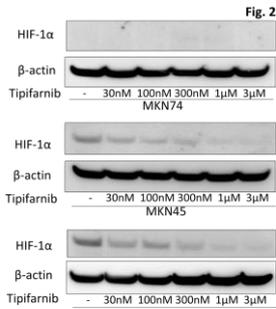


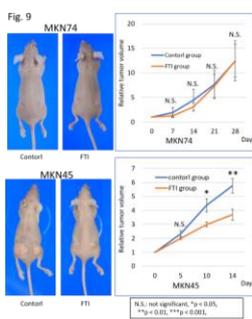
Fig. 1 MKN47 MKN45 KATOIII



④ Tipifarnib の抗腫瘍効果の作用機序として、HIF-1 α 発現の阻害作用に加え、何らかの腫瘍関連遺伝子のファルネシル化阻害が関連していると推測した。まず、Tipifarnib によってファルネシル化阻害が確実に起きていることの確認のため、代表的なファルネシル化遺伝子である HDJ-2¹⁾ の発現について評価を行った。Tipifarnib によって、MKN45、KATOIII、MKN74 のいずれの細胞においても、HDJ-2 のファルネシル化が阻害されていることが確認された (Fig. 5)。我々は、mTOR pathway の活性化に関連し、これまでにファルネシル化のターゲット遺伝子と報告されている Rheb²⁾ に着目した。Rheb のファルネシル化を評価したところ、Tipifarnib によってそのファルネシル化が阻害されており (Fig. 5)、さらに mTOR のリン酸化が抑制、またその下流遺伝子群の活性化も抑制されていることが明らかとなった (Fig. 6)。

⑤ これまでに我々は、HIF1- α と活性酸素産生の関連性について報告してきた^{3), 4)}。本研究においても、活性酸素の HIF1- α 発現および抗腫瘍効果への影響を評価するため、Tipifarnib 投与に伴う胃癌細胞内活性酸素の変化について評価を行った。その結果、MKN45 および KATOIII において、Tipifarnib によって活性酸素が減少しており (Fig. 7)、また、活性酸素のスカベンジャー酵素である SOD (superoxide dismutase) 2、CAT (catalase)、GPX (glutathione peroxidase) 2 の発現が上昇していることが明らかとなった (Fig. 8)。

⑥ ノードマウスを用いて、MKN45 および MKN74 による皮下腫瘍モデルを作成し、Tipifarnib の抗腫瘍効果を評価した。腫瘍形成後に Tipifarnib (3mg/kg/day) を腹腔内に連日投与としたところ、MKN74 形成腫瘍に対しては、ほとんど腫瘍抑制効果を認めなかったものの、MKN45 においては、明らかな抗腫瘍効果を認めた (Fig. 9)。

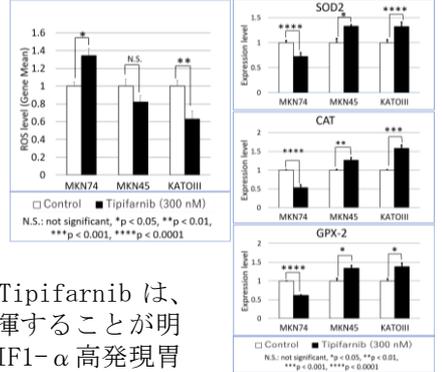
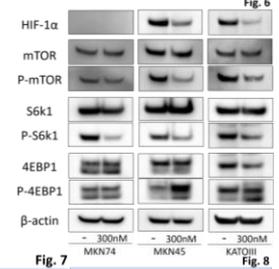
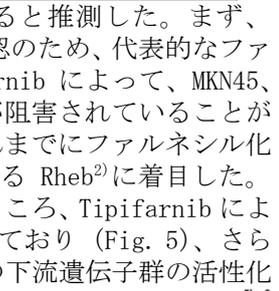
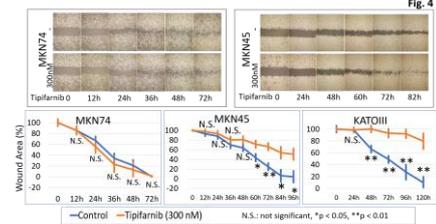
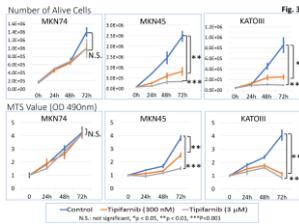


以上の実験結果より、FTI である Tipifarnib は、胃癌細胞に対して抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなったが、特質すべきは、HIF1- α 高発現胃癌細胞にこそ、その効果を認めた点である。HIF1- α の高発現は、致命的転移様式である腹膜播種に大きく関与する⁵⁾だけでなく、浸潤能や抗癌剤耐性⁶⁾など、高悪性度胃癌の代表的な分子生物学的特性である。Tipifarnib は、HIF1- α の発現によってその抗腫瘍効果が変化している可能性が高く、腹膜播種に対する新規治療法となるだけでなく、HIF1- α が高発現を示す高悪性度固形癌への治療にも応用出来る可能性がある。一方、その作用機序に関しては、HIF1- α の発現抑制が大きな要因と考えられるが、Rheb のファルネシル化阻害による mTOR pathway の活性化阻害 (mTOR/HIF-1 α pathway) および細胞内活性酸素抑制が HIF1- α の発現抑制を引き起こす (腫瘍内活性酸素が HIF1- α を安定化⁷⁾、あるいは癌関連繊維芽細胞の HIF1- α を活性化する⁸⁾との報告あり) と考えられた。

<参考文献>

- 1) Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. Lobell RB, et al., Cancer Res. 2001 61(24):8758-68.
- 2) Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. Castro AF, et al., J Biol Chem. 2003 278(35):32493-6.
- 3) The Apoptotic Effect of HIF1 α Inhibition Combined with Glucose plus Insulin

③ Tipifarnib 投与による細胞増殖能 (Trypan blue 法、MTS 法) に対する影響を評価したところ、MKN74 では細胞増殖能の抑制を認めなかったが、MKN45 および KATOIII においては有意な細胞増殖能の抑制を認めた (Fig. 3)。また、遊走能 (Wound healing assay) に対する影響も評価したが、細胞増殖能と同様に、MKN45 および KATOIII においては有意な細胞遊走能の抑制を認めた (Fig. 4)。



<参考文献>

- 1) Evaluation of farnesyl:protein transferase and geranylgeranyl:protein transferase inhibitor combinations in preclinical models. Lobell RB, et al., Cancer Res. 2001 61(24):8758-68.
- 2) Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. Castro AF, et al., J Biol Chem. 2003 278(35):32493-6.
- 3) The Apoptotic Effect of HIF1 α Inhibition Combined with Glucose plus Insulin

- Treatment on Gastric Cancer under Hypoxic Conditions. Tanaka T, et al., PLoS One. 2015 10(9):e0137257.
- 4) Low-dose YC-1 combined with glucose and insulin selectively induces apoptosis in hypoxic gastric carcinoma cells by inhibiting anaerobic glycolysis. Wakiyama K, …Tanaka T, et al., Sci Rep. 2017 7(1):12653.
 - 5) HIF-1 α is a crucial factor in the development of peritoneal dissemination via natural metastatic routes in scirrhous gastric cancer. Miyake S, …Tanaka T, et al., Int J Oncol. 2013 43(5):1431-40.
 - 6) HIF-1 α is an unfavorable determinant of relapse in gastric cancer patients who underwent curative surgery followed by adjuvant 5-FU chemotherapy. Nakamura J, et al., Int J Cancer. 2010 127(5):1158-71.
 - 7) Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. Klimova T, et al., Cell Death Differ. 2008 15(4):660-6.
 - 8) Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. Fiaschi T, et al., Cancer Res. 2012 72(19):5130-40.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計3件)

1. 第76回日本癌学会学術総会 (2017年9月28日~30日)
演題名: 胃癌治療におけるファルネシル転移酵素阻害薬の可能性
発表者: 江川紀幸、田中智和、奥山佳一郎、能城浩和
2. 第77回日本癌学会学術総会 (2018年9月27日~29日)
演題名: Anti-tumor effects of farnesyltransferase inhibitors on gastric cancer
発表者: Noriyuki Egawa, Tomokazu Tanaka, Hirokazu Noshiro
3. 第119回日本外科学会定期学術集会 (2019年4月18日~20日)
演題名: Farnesyltransferase inhibitors は HIF-1 α 発現胃癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示す
発表者: 江川紀幸、田中智和、能城浩和

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。