

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08393

研究課題名(和文) 大腸癌の抗癌剤耐性機序に関わるCDKN3を標的とした新規薬剤及び治療法開発

研究課題名(英文) CDKN3 as a new target of anti-cancer treatment overcoming the resistance to cytotoxic chemotherapy

研究代表者

松原 淳一 (MATSUBARA, JUNICHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40782371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、殺細胞性抗癌剤治療の耐性メカニズムの一つとしてCDKN3に着目し、新規抗癌剤としてのCDKN3阻害剤を開発することである。大腸癌と同様に食道癌でもCDKN3の遺伝子増幅が見られるため、食道癌で実験を行った。その結果、CDKN3をノックダウンするとパクリタキセルによる抗腫瘍効果が有意に増強することが明らかになった(未発表データ)。CDKN3は細胞周期において重要な役割を果たす。CDKN3ノックダウン食道癌細胞株を抗癌剤パクリタキセルに暴露しその細胞分裂を観察したところ、分裂期における中心体に異常が生じ異常な細胞分裂が誘導され細胞死に至っていることを解明した(未発表データ)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CDKN3の生物学的意義については、大腸癌や食道癌に限らず多くの固形癌において共有されている可能性があり、CDKN3阻害により殺細胞性抗癌剤に対する治療抵抗性の克服が実現されれば、多くの癌患者の治療成績向上が達成される。

研究成果の概要(英文)：We have focused on the CDKN3 function in terms of chemo-sensitivity of cancer cells. Since the CDKN3 amplification is detected not only in colorectal cancer but esophageal squamous cell cancers (ESCC), we performed the in vitro chemotherapy experiments in ESCC cells. CDKN3 is known to play an important role in cell cycle, and paclitaxel works in mitotic phase of cell cycle as well. We have found that CDKN3 knock-down in ESCC cells significantly enhanced the chemo-sensitivity to paclitaxel (unpublished data). We also found that CDKN3 knocked-down cancer cells exposed to paclitaxel had more than three centrosomes, and consequently head into apoptosis because of the abnormal cell division.

研究分野：抗がん薬

キーワード：食道癌 大腸癌 CDKN3 抗がん薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究責任者はこれまでに、大腸癌の Cancer Stem Cell の抗癌剤治療抵抗性メカニズムについて研究を行い、E2F4 という転写因子が Cancer Stem Cell における抗癌剤治療抵抗性メカニズムにおいて中心的役割を果たしていることを解明した。E2F4 が細胞周期を制御する転写因子であることから、抗癌剤治療抵抗性には細胞周期停止応答 (cell cycle arrest) が一つの重要な因子ではないかと考察した。そして、E2F4 による実際の制御標的として検出された細胞周期抑制遺伝子の中から、CDKN3 が遺伝子データベースおよび臨床データベースでの検討において有力な新規治療標的である可能性が高いことが判明した。さらに、本研究責任者による in vitro 実験では既に、CDKN3 発現をノックダウンすると癌細胞の抗癌剤に対する感受性が上昇することが確認された。CDKN3 を阻害する薬剤開発の報告はこれまでにないが、CDKN3 阻害剤を in silico 解析で新規に同定することができれば、大腸癌の抗癌剤治療抵抗性の克服に直結すると着想した。

本研究は細胞周期制御に着目しているが、CDKN3 を標的とした薬剤開発も治療法開発もこれまでに報告がなく、非常に新規性が高い

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者の最近の研究で明らかとなった E2F4 による殺細胞性抗癌剤治療の耐性メカニズムの一つとして CDKN3 に着目し、癌細胞で CDKN3 を阻害することの生物学的意義を検証し、新規抗癌剤としての CDKN3 阻害剤を開発することである。

3. 研究の方法

・ヒト大腸癌手術検体から直接作成した異種移植腫瘍片 (Patient-derived Xenograft (PDX) Tumor) の細胞に CDKN3-shRNA を導入して CDKN3 ノックダウン PDX 腫瘍を作成する。その腫瘍を免疫不全マウス (NRG: NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ) の皮下に移植した大腸癌前臨床 PDX マウスモデルを確立し、そのモデルを利用した in vivo 抗癌剤実験において CDKN3 ノックダウンの抗癌剤感受性へ与える影響を確認する。

・CDKN3 阻害剤候補の化合物を同定し、それが殺細胞性抗癌剤の治療効果増強に実際に寄与するかどうかを、本研究で確立する前臨床 PDX マウスモデルで検証する。また、CDKN3 ノックダウン癌細胞と野生型癌細胞との比較解析で、CDKN3 の下流遺伝子を同定する。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 というゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術を用いて、CDKN3 を完全ノックアウトした癌細胞株の作成を試みた。しかし予定通りに進まず、代替方法として small hairpin RNA (shRNA) を用いた CDKN3 ノックダウン癌細胞株を作成し、実験に使用した。

また、大腸癌と同じように食道癌でも一定の頻度で CDKN3 の遺伝子増幅が見られることが公共データベースの検索で判明しており、同様の実験を食道癌でも行った。複数の食道癌細胞株を用いて CDKN3 阻害剤による抗癌剤治療効果の増強の有無を確認した。その結果、CDKN3 をノックダウンするとパクリタキセルによる抗腫瘍効果が有意に増強することが明らかになった(未発表データ：図 1, 2)。

CDKN3 は細胞周期 (特に分裂期) において重要な役割を果たすとされている。また、食道癌で標準治療として用いられるパクリタキセルも分裂期に作用することが知られている。そこで、CDKN3 ノックダウン食道癌細胞株を抗癌剤パクリタキセルに暴露し、その細胞分裂を観察したところ、分裂期における中心体の数と局在に異常が生じ、異常な細胞分裂が誘導され細胞死に至っていることを解明した (未発表データ：図 3, 4)。このことは、CDKN3 ノックダウンが癌細胞のパクリタキセル感受性を増強する分子生物学的メカニズムの解明につながる知見である。

CDKN3 の生物学的意義については、大腸癌や食道癌に限らず多くの固形癌において共有されている可能性があり、CDKN3 阻害により殺細胞性抗癌剤に対する治療抵抗性の克服が実現されれば、多くの癌患者の治療成績向上が達成される。

図 1 : CDKN3 ノックダウンで癌細胞株のパクリタキセル感受性が上昇する (WST-1 アッセイ)

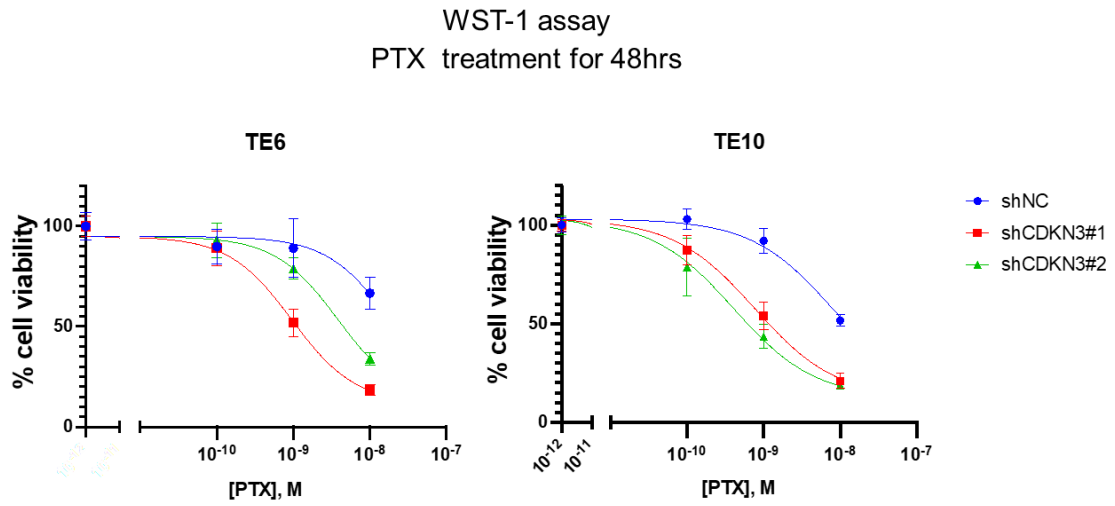


図 2 : CDKN3 ノックダウンで癌細胞株のパクリタキセル感受性が上昇する (コロニー形成アッセイ)

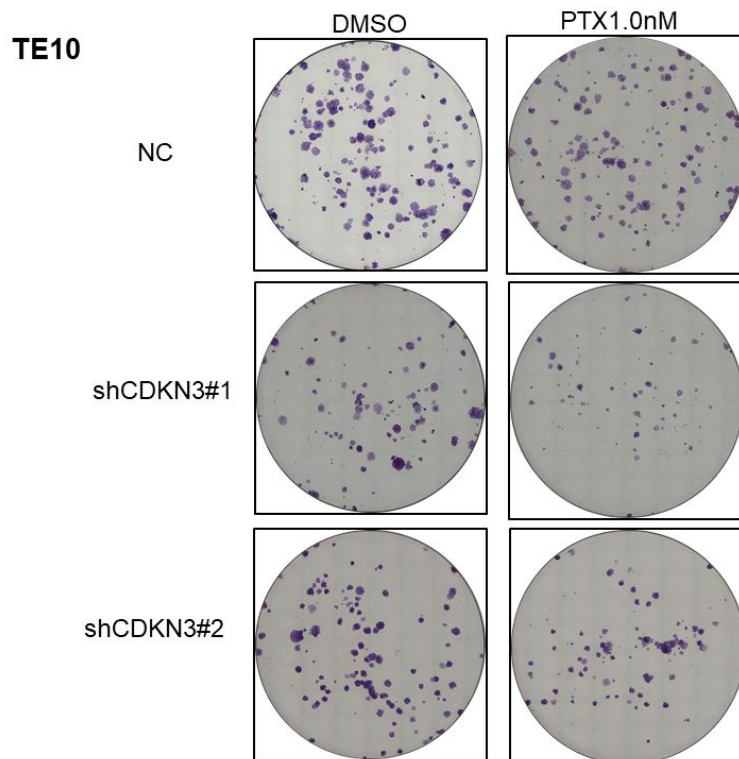


図 3 : CDKN3 ノックダウンとパクリタキセル治療併用で中心体過剰複製の頻度が上昇する

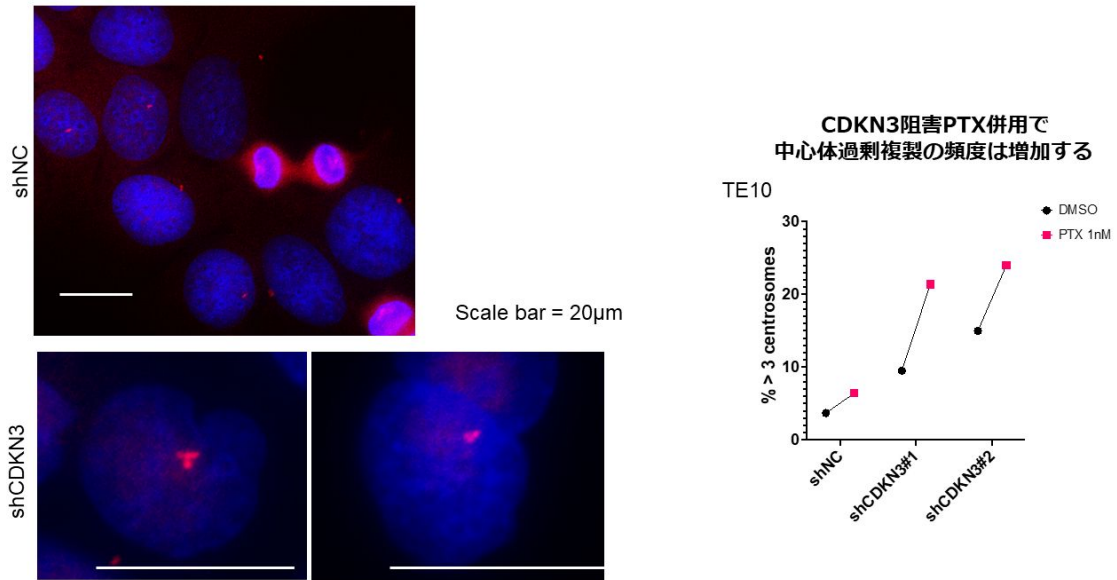
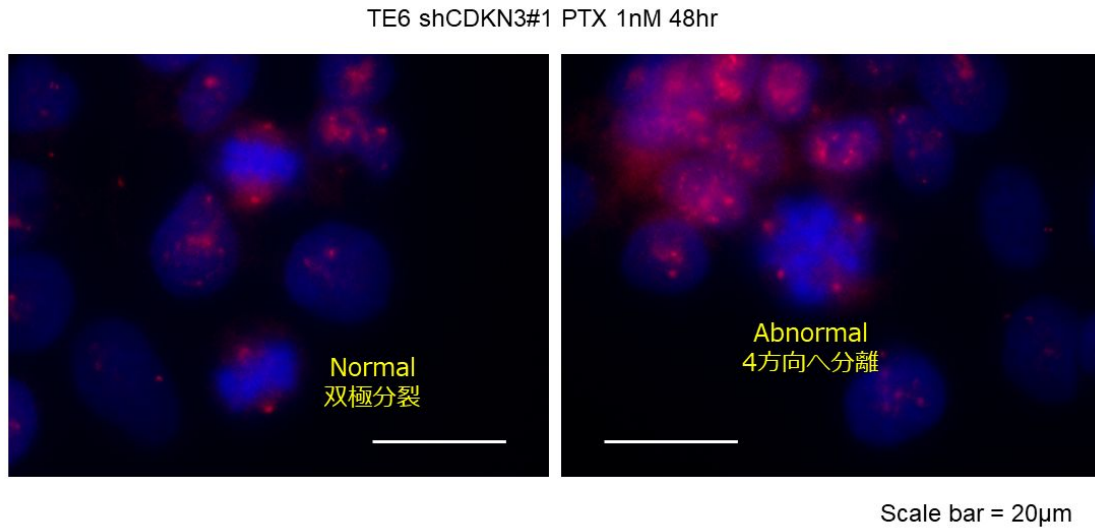


図 4 : CDKN3 ノックダウンとパクリタキセル治療併用で異常な細胞分裂の頻度が上昇する



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	岩田 浩明 (IWATA HIROAKI) (40613328)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関