

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06699

研究課題名（和文）固形がんの効果的治療を目指したエピジェネティック修飾薬を用いた新規併用療法の探索

研究課題名（英文）Novel effective combination chemotherapy using epigenetic modifiers for targeting solid tumors

研究代表者

細川 美香（Hosokawa, Mika）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70548271

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）：低酸素下で培養したがん細胞において低下した抗がん剤の効果は、一部のエピジェネティック修飾薬によって改善可能であった。その機構として、低酸素下で増大したヒストンメチル化の抑制が、抗がん剤によるがん細胞死を増強させていることが明らかになった。がん細胞を酸性環境で培養した場合においても、効果が低下する抗がん剤があるものの、その程度は低酸素に比べると軽微であった。さらに、酸性下での抗がん剤効果の低下もエピジェネティック修飾薬により改善可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形がん特有の微小環境を模倣して培養したがん細胞を用いて得られた成果は、抗がん剤治療に耐性を示し有効な治療法のないがんに対する治療法開発に繋がることが期待され、固形がんに対するエピジェネティック修飾薬の臨床応用を進めるための有益な基礎的知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Some of epigenetic modifiers was able to improve the effects of anti-cancer drugs attenuated in cancer cells under hypoxia. The suppression of histone methylation induced under hypoxia augmented cancer cell death by anti-cancer drugs. Same as hypoxic conditions, acidic conditions also decreased the effects of anti-cancer drugs in cancer cells although the extent of decrease was smaller in acidic conditions than hypoxic conditions. In addition, some of epigenetic modifiers improved the effects of anti-cancer drugs attenuated in cancer cells under acidic environment.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：低酸素 エピジェネティック修飾薬 固形がん 併用療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティック機構とは、DNA やヒストンへのメチル化やアセチル化の修飾状態を制御する機構である。この機構の異常は遺伝子発現変化をもたらし、がんの発生のみならず悪性化に寄与している。そのため遺伝子修飾を制御するエピジェネティック修飾薬は、がんの悪性化をも改善可能な薬として期待されている。血液系がんでは既に臨床応用されており、単独の使用でも治療効果が認められている。固形がんでも承認を目指し、抗がん剤の効果向上を狙ったエピジェネティック修飾薬の併用方法について、基礎研究が数多く行われている。しかし、固形がんに対するエピジェネティック修飾薬の臨床試験は、従来の抗がん剤では有効性の低い進行がんで行われることが多く未だ承認には至っていない。

申請者は複数のがん細胞を用い、エピジェネティック修飾薬と抗がん剤の組み合わせや処置順序が異なれば併用効果が大きく異なり、治療スケジュール最適化の重要性を示した。また、エピジェネティック修飾薬は細胞を殺傷しない低濃度でも、低濃度の抗がん剤の効果を上向きに可能であり、有効で安全ながん治療に繋がる可能性を示した。さらに、抗がん剤長期処置による耐性化がん細胞においても、エピジェネティック修飾薬は抗がん剤効果を改善可能であった。申請者も含めた先行研究の成果にもかかわらず、臨床試験はここ数年進展していないことから、進行がんにも真に有効なエピジェネティック修飾薬が見極められていないと考えられる。

これを解決する鍵となるのが「がん微小環境」である。進行した固形がんは周囲に特有の環境「がん微小環境」を形成し、血液系がんと大きく異なる特徴をもつ。固形がんは自身が生存しやすい微小環境を作る結果、抗がん剤への耐性を獲得するため、使用できる抗がん剤の選択肢が限られ治療が困難となる。微小環境の一つである低酸素に対する応答反応は通常、生体の恒常性維持に必須の機構であるが、がんでは自身の生存、すなわち耐性化に働く。また従来の抗がん剤や放射線治療において発生する「活性酸素」は、がんを攻撃する治療の武器となる。一方、がんにおける「低酸素」は、活性酸素の生成量を減らして治療の障壁、すなわち耐性化の原因となる。従って、活性酸素に依存した治療法だけではなく、がん耐性化に繋がる低酸素を制御する戦略も効果的ながん治療を達成するために不可欠である。エピジェネティック機構の制御により、低酸素による耐性化を改善できる可能性があるものの情報は少なく、低酸素を標的とした他の治療法の試みも芳しい成績は得られていない。そこで、エピジェネティック修飾薬の効果を低酸素下のがんに対して評価することは、耐性を示し有効な治療法のないがんに対する治療法開発に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

固形がんの微小環境の中でも治療耐性との関連性が強く示されている低酸素環境に注目し、低酸素下のがん細胞で減弱した既存の抗がん剤の効果を改善可能なエピジェネティック修飾薬の種類及び、効果が改善される作用機序を明らかにする。さらに、低酸素に付随して発生する酸性環境が既存の抗がん剤や新規エピジェネティック修飾薬の治療効果に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

マウスメラノーマ細胞 (B16) 及びマウス結腸がん細胞 (C26) を、10%ウシ胎児血清と1%ペニシリンストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地を用いて、37℃、100%湿度、5%CO₂にて培養した(Normoxia, Nor)。低酸素条件は、BIONIX社の低酸素培養キットを用いて1%O₂(hypoxia, Hyp1%)あるいは5%O₂(hypoxia, Hyp5%)とした。なお、低酸素条件下の実験では、播種後から実験終了時まで低酸素状態に維持した。酸性条件下の実験では、PIPES緩衝液を用いHCl又は乳酸によりpH6.7~6.8に維持し、対照として中性条件下ではHEPES緩衝液によりpH7.4に維持し、播種後1日目からこれらの培地に交換した。

(2) 処置

細胞を播種1日後にエピジェネティック修飾薬(IC₂₀値付近の濃度)、さらに1日後にエピジェネティック修飾薬を除いた後、抗がん剤を2日間処置した。siRNA実験は、細胞播種1日後に20 nMで処置し、1日後にタンパク抽出(Western blot)あるいはSN-38の48時間処置(WST assay)を行った。

(3) mRNA発現 (real-time RT-PCR)

スピンカラム法によりRNeasy Mini kits (QIAGEN社)を用いてRNAを抽出し、SYBR Greenを用いたreal-time RT-PCR法によりmRNAを定量した。

(4) タンパク質発現 (Western blot)

RIPA Buffer (ナカライテスク株式会社)を用いてタンパク質を抽出した。タンパク質発現はwestern blot法により測定した。タンパク質をMOPS bufferとポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離後、iBlot (Thermo Fisher Scientific)によりポリビニリデン・ジフルオライド (PVDF) 膜に転写した。PVDF膜を室温で30分間Blocking One (ナカライテスク株式会社)によりブロッキングし、洗浄後、室温で1時間、一次抗体と反応させた。さらに、PVDF膜を洗浄し、室温で1時間、二次抗体と反応させ、Chemi-Lumi One (ナカライテスク株式会社)に

よりタンパク質を可視化した。

(5) 殺細胞効果

細胞播種4日目にWST-8 assayにより細胞生存率を測定した。

(6) ミトコンドリア膜電位

薬物処置後の細胞(8 well chamber)にRPMI1640 (Phenol Red Free) 培地で希釈したJC-1 染色液を添加し、CO₂ インキュベーター内で30分間インキュベート後 wash し、imaging buffer を添加して蛍光顕微鏡で観察した (緑, 励起波長 470 nm, 蛍光波長 525 nm; 赤, 励起波長 545 nm, 蛍光波長 605 nm)。

(7) 活性酸素(ROS)

薬物処置後の細胞(8 well chamber)をRPMI1640 (Phenol Red Free) 培地で Wash し、DCFH-DA Working solution を添加した。その後、CO₂ インキュベーター内で30分間インキュベートし、RPMI1640 (Phenol Red Free) 培地で Wash 後、PBS(Ca, Mg, グルコース含有)を加えて蛍光顕微鏡で観察した(緑, 励起波長 470 nm, 蛍光波長 525 nm)。

(8) アポトーシス

薬物処置後の細胞(8 well chamber)に Annexin-V-FLUOS+propidium iodide を添加後、10~15分室温静置し、蛍光顕微鏡で観察した(緑, 励起波長 470 nm, 蛍光波長 525 nm; 赤, 励起波長 545 nm, 蛍光波長 605 nm)。

4. 研究成果

(1) 低酸素条件の検討

低酸素条件として1%または5%酸素の1日間または1週間の前処置を検討した。その結果、低酸素誘導因子 (HIF-1) のタンパク及び HIF-1 標的遺伝子の mRNA 発現は、正常酸素下と比べて1%酸素下の B16 での増大が顕著であった(図1)。

抗がん剤として 5-fluorouracil(5-FU)、irinotecan の活性代謝物 (SN-38)、oxaliplatin(L-OHP)、paclitaxel(PTX)を用い殺細胞効果を検討したところ、低酸素下の抗がん剤の殺細胞効果はC26よりもB16で低下し、特に1%酸素下の5-FU及びSN-38で顕著であった(表1)。これらの結果は低酸素前処置期間による影響を受けなかったため、1%酸素下で1日間前処置した B16 においてエピジェネティック修飾薬と5-FU又はSN-38の併用効果を検討した。

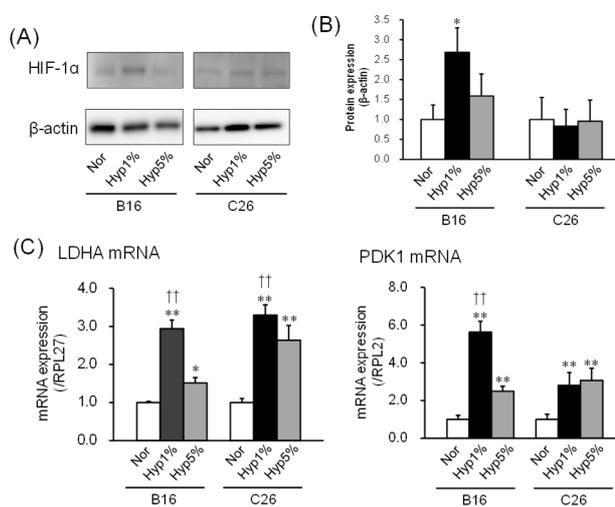


図1. HIF-1 タンパク発現とその標的遺伝子の mRNA 発現

表1. 正常酸素(Nor)と低酸素下(Hyp)で培養したがん細胞における抗がん剤の IC₅₀ 値

	B16			C26		
	Nor	Hyp1%	Ratio	Nor	Hyp1%	Ratio
5-FU (μM)	1.30 ± 0.17	6.63 ± 0.27	5.0	0.96 ± 0.13	2.20 ± 0.01	2.3
L-OHP (μM)	0.70 ± 0.07	3.09 ± 0.27	4.4	1.56 ± 0.15	5.49 ± 1.21	3.5
SN-38 (μM)	0.08 ± 0.008	1.20 ± 0.44	15	0.04 ± 0.004	0.11 ± 0.01	2.8
PTX (μM)	0.06 ± 0.01	0.11 ± 0.02	1.8	0.02 ± 0.003	0.03 ± 0.003	1.5

(2) 抗がん剤の殺細胞効果

低酸素下で減弱した抗がん剤の効果を最も改善するエピジェネティック修飾薬を特定するために、作用機序の異なるエピジェネティック修飾薬を用いて検討した。低酸素下で減弱した5-FU又はSN-38の殺細胞効果は、DNAメチル化阻害薬、ヒストンメチル化阻害薬、ヒストン脱メチル化阻害薬の前処置により増強し、抗がん剤の感受性が改善した(表2)。一方、正常酸素下では抗がん剤の効果を増強する作用は認められなかった。

表 2. 抗がん剤効果に及ぼすエピジェネティック修飾薬前処置の影響

	Nor		Hyp1%	
	SN-38	5-FU	SN-38	5-FU
DAC(DNAメチル化阻害)	×	×	×	×
AC(DNAメチル化阻害/RNA合成阻害)	×	×	○	
SAHA(ヒストン脱アセチル化阻害)	×	×	×	×
DZNep(ヒストンメチル化阻害)	×	×	○	○
UNC1999(ヒストンメチル化阻害)	×	×	×	×
JIB-04(ヒストン脱メチル化阻害)	×	×		
ORY-1001(ヒストン脱メチル化阻害)	×	×	×	×
OTX015(BET阻害)	×	×	×	×

Nor: 通常酸素, Hyp: 低酸素 ;抗がん剤の効果を改善(有意差あり)
 ×: 抗がん剤の効果を改善しない

(3) 低酸素下におけるエピジェネティック機構の変化

ヒストンメチル化阻害薬及びヒストン脱メチル化阻害薬により抗がん剤の効果改善が認められたため、低酸素下においてヒストンメチルレベルの変動が、抗がん剤の効果低下に関与している可能性が考えられた。そこで、主要なメチル化部位としてヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化 (H3K27Me3)、他のリジン残基のヒストンのメチル化 (H3K4Me3、H3K9Me3) のレベルを検討した。H3K27Me3 レベルは低酸素下で増大した一方で、他の H3K4Me3、H3K9Me3 は変化していなかった。さらに、H3K27 をメチル化するヒストンメチル化酵素 EZH2 のタンパク発現は低酸素培養により増大していた(図 2A,B)。

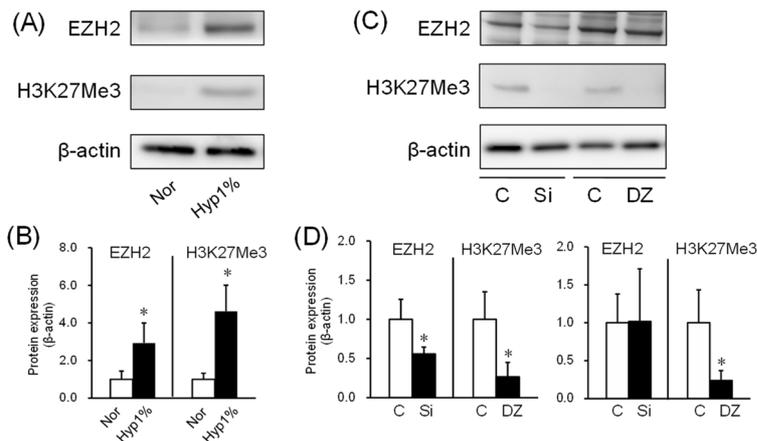


図 2. EZH2 及び H3K27Me3 発現レベル

Nor: 正常酸素, Hyp: 低酸素, si: siRNA DZ: DZNep

(4) 低酸素下における抗がん剤効果低下におけるヒストンメチル化の関与

がん細胞を低酸素培養した時の効果の低下が顕著であった抗がん剤 SN-38 に着目し、低酸素で増大していた EZH2 を阻害する EZH2 阻害薬 DZNep に加え、EZH2 siRNA 前処置の影響について検討した。EZH2 siRNA 前処置により、EZH2 および H3K27Me3 の発現レベルは低下した(図 2C,D)。なお、EZH2 阻害薬 DZNep 前処置では、H3K27Me3 レベルの低下は観察されたが、EZH2 レベルは変動しなかった。この理由として、DZNep は EZH2 を間接的に阻害することから、EZH2 を機能的には阻害しているが発現は低下しなかったと考えられる。さらに、EZH2 阻害薬 DZNep 及び EZH2 siRNA 前処置いずれの場合においても、低酸素下での SN-38 の効果は増大した(図 3)。従って、低酸素により減弱した SN-38 の効果は、ヒストンメチル化の阻害によって改善したことが示された。

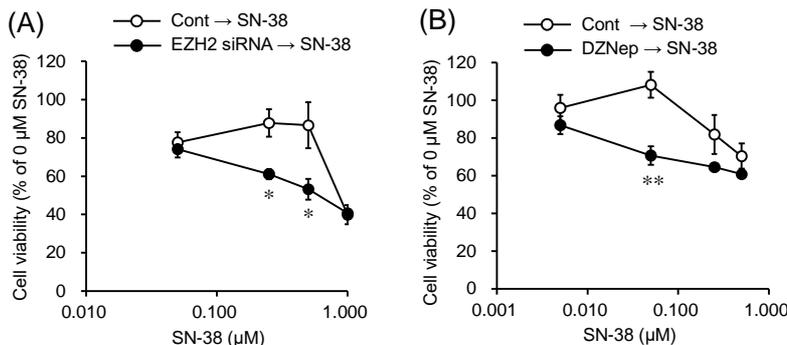


図 3. 低酸素下における DZNep または EZH2 siRNA 処置後の SN-38 の殺細胞効果

(5) 低酸素下培養がん細胞におけるヒストンメチル化阻害による細胞内メカニズムの変化

DZNep によりヒストンメチル化阻害した際、SN-38 の殺細胞効果に関わるどのような機構が変化しているのか検討した。SN-38 単独処置(0.25 μM, Nor では殺細胞効果を示すが Hyp では示さない濃度)により、通常酸素下ではミトコンドリア膜電位は低下したが、低酸素下では正常酸素下ほど膜電位は低下しなかった。しかし、DZNep 前処置により、低酸素でもミトコンドリア膜電位が低下した(図 4)。次に活性酸素 (ROS) について検討したところ、低酸素下では通常酸素下と比べて未処置における ROS 産生は顕著に低かったものの、SN-38 単独処置によって ROS 産生はわずかに増加し、さらに DZNep を前処置することで顕著に ROS 産生が増加した(図 5)。さらに

アポトーシスについて検討したところ、SN-38 単独処置により、低酸素下では通常酸素下ほどアポトーシスは誘導されなかった。しかし、DZNep を前処置することにより低酸素下でも SN-38 処置後の初期アポトーシス・後期アポトーシスが増加した（図 6）。以上より、ミトコンドリア膜電位の低下は細胞死の比較的初期段階に起こることから、その後 ROS が産生し、最終的にアポトーシスが誘導されたと考えられる。

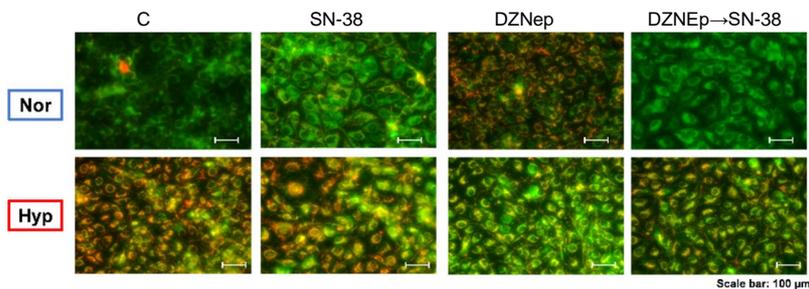


図 4. ミトコンドリア膜電位の変化
 緑色：膜電位が低い
 赤色：膜電位が高い

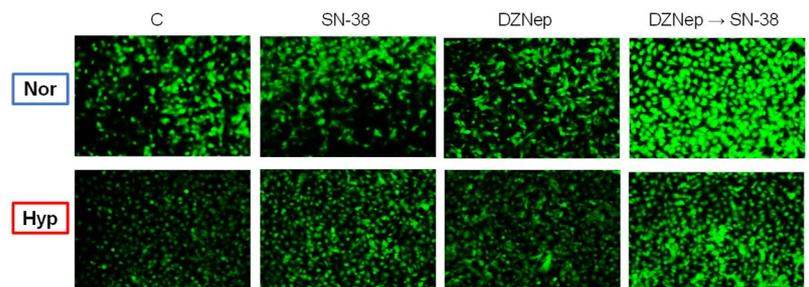


図 5. 活性酸素の変化

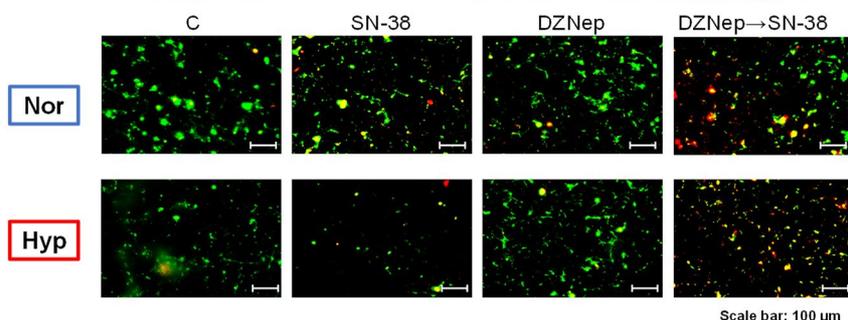


図 6. アポトーシスの変化
 緑色：初期アポトーシス
 赤色：後期アポトーシス

(6) 酸性環境下における抗がん剤効果とエピジェネティック機構の変化

がん細胞は、低酸素になると同時に細胞外が酸性になることが多い。そこで、がん細胞を酸性環境で培養した際に抗がん剤の効果が変化するか検討した。低酸素実験で検討した抗がん剤のうち、B16 細胞では L-0HP の殺細胞効果が約 2 倍減弱したが、低酸素に比べると軽微であった。さらに、エピジェネティック機構に作用するヒストン脱アセチル化阻害薬、ヒストンメチル化阻害薬、ヒストン脱メチル化阻害薬の前処置により、L-0HP の殺細胞効果が増強した。また、エピジェネティック修飾薬による L-0HP の効果の増強作用は、中性条件下でも認められた。さらに、エピジェネティック機構であるヒストンの脱アセチル化・メチル化・脱メチル化を行う酵素の遺伝子発現は、酸性条件下において顕著な変動は認められなかった。従って、低酸素と異なり、酸性環境がヒストン修飾酵素に及ぼす影響は小さく、抗がん剤効果の変動においてエピジェネティック機構の直接的な関与は小さいものと考えられた。

以上より、酸性よりも低酸素の方が抗がん剤の効果が低下しやすく、低下した効果はエピジェネティック修飾の制御によって改善可能であった。低酸素や酸性といった微小環境を標的とした治療法の開発も進められてはいるが、本研究成果は、これまであまり検討されていないエピジェネティック機構の観点からの治療法について新たな情報を提供することができた。得られた知見は、進行した固形がんのように有効な治療方法のないがんに対する治療法開発に繋がること期待される。

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 0件）

1. 著者名 Hosokawa Mika, Tetsumoto Sekai, Yasui Mirano, Kono Yusuke, Ogawara Ken-ichi	4. 巻 677
2. 論文標題 3-deazaneplanocin A, a histone methyltransferase inhibitor, improved the chemoresistance induced under hypoxia in melanoma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 26 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.08.003	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今西啓泰、細川美香、大江彩恵、田中章太、上田久美子、大河原賢一
2. 発表標題 エピジェネティック修飾薬前処置による低酸素下がん細胞における抗がん剤効果の改善
3. 学会等名 日本薬剤学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川美香、今西啓泰、大江彩恵、河野裕允、大河原賢一
2. 発表標題 エピジェネティック修飾薬は低酸素下がん細胞における抗がん剤の効果を改善する
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安井みらの、鎌本静会、細川美香、河野裕允、大河原賢一
2. 発表標題 エピジェネティック修飾薬による細胞内メカニズムの変化は低酸素下における抗がん剤耐性を改善する
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鎌本 静会、細川 美香、安井 みらの、河野 裕允、大河原 賢一
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素阻害薬により低酸素下の抗がん剤耐性を改善する機構の検討
3. 学会等名 第72回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022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	大河原 賢一 (Ogawara Ken-ichi) (30291470)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	

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
---------	---------