

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16767

研究課題名（和文）ホモシステインによるアポトーシスに着目した難治性絨毛癌に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic method for drug resistant choriocarcinoma by focusing on apoptosis by homocysteine

研究代表者

西野 公博（Nishino, Kimihiro）

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80801448

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、難治性絨毛癌の治癒率向上のため、ホモシステインによるアポトーシスに着目した新規治療法開発のための基盤づくりのために行われた。本研究により、ホモシステインが絨毛癌細胞のアポトーシスを誘導しうることが証明された。また、絨毛癌細胞へのMTX投与により細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇したこと、さらに、MTX耐性絨毛癌細胞にMTXを投与しても、細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇しないことが証明され、MTXの抗腫瘍効果の作用機序として、細胞内ホモシステイン濃度の上昇が関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

絨毛癌患者のうち、約15%の患者は化学療法抵抗性に陥り、寛解に至らずに死亡するため、既存の化学療法とは異なる機序にもとづく新規治療法の開発が強く望まれていた。絨毛癌細胞の葉酸代謝に着目した本研究により、ホモシステインが絨毛癌細胞のアポトーシスを誘導しうることが証明された。このことから、難治性絨毛癌に対する新規治療法として、ホモシステインを応用したものを開発する基盤が確立された。以上の研究成果は、第76回日本産科婦人科学会で発表され、今後のさらなる研究の発展に対する学術的、社会的意義は大きく、難治性絨毛癌の治療成績向上に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to investigate the following two things in order to improve the efficacy of the treatment of drug resistant choriocarcinoma and to develop a new therapeutic method. One is whether homocysteine can introduce apoptosis of choriocarcinoma cells which are malignant form of trophoblastic cells. The other is whether an increase in homocysteine concentration is contributed to kill choriocarcinoma cells when MTX is administered. This study illustrated that homocysteine introduced apoptosis of choriocarcinoma cells. This study also demonstrated that homocysteine concentration was increased in supernatant of choriocarcinoma cells when MTX is administered, and that homocysteine concentration was not increased in supernatant of resistant choriocarcinoma cells. This study evidenced that an increase in homocysteine concentration was contributed to kill choriocarcinoma cells when MTX was administered.

研究分野：産婦人科

キーワード：ホモシステイン 葉酸代謝 アポトーシス 難治性癌 絨毛癌

1. 研究開始当初の背景

絨毛癌は胎盤を構成する絨毛細胞を起源とする悪性腫瘍である。絨毛癌は化学療法感受性が高く、約 85% の患者で寛解が得られる一方、約 15% の患者は化学療法抵抗性に陥り、化学療法レジメンの変更を繰り返しても、寛解が得られずに死亡する。近年、化学療法やその支持療法が急速に進歩しているにも関わらず、こうした難治性絨毛癌の治療成績が改善していないのは、既存の化学療法のみでは化学療法抵抗性に陥った絨毛癌を制御できないためであり、化学療法抵抗性を克服する新規治療戦略の確立が急務である。

絨毛癌に対する化学療法でキードラッグとして使用されるメソトレキセート (MTX) は葉酸代謝経路を阻害する一方で、副次的に細胞内ホモシステイン濃度が上昇することが想定される。最近、ホモシステインが絨毛細胞のアポトーシスを誘導することが報告された。そこで研究代表者は、絨毛細胞が癌化した絨毛癌に対しても、ホモシステインがアポトーシスを誘導し得るのではないかと、MTX の抗腫瘍効果の作用機序として、細胞内ホモシステイン濃度の上昇が関与しているのではないかと仮説を立てた。もしこの仮説が立証されれば、難治性絨毛癌に対する新規治療法として、ホモシステインを応用したものを開発する基盤が確立されるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、難治性絨毛癌の予後を改善させるため、絨毛癌に対する化学療法において中心的役割を果たす MTX の効果を高め、MTX に抵抗性を示す絨毛癌に対しても、MTX が抗腫瘍効果を十分に発揮することができるような新規治療戦略の基礎を確立することである。より具体的には、ホモシステインが絨毛癌のアポトーシスを誘導し得るのではないかと、MTX の抗腫瘍効果の作用機序として、細胞内ホモシステイン濃度の上昇が関与しているのではないかと、これらを検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ホモシステイン投与による絨毛癌細胞のアポトーシス誘導の検討

ホモシステイン添加による絨毛癌細胞増殖抑制の検討

ホモシステイン投与により絨毛癌細胞のアポトーシスが誘導されるか検討するまえに、絨毛癌細胞株 Jar、BeWo、JEG3 の培地にホモシステインを 48 時間添加し、まずは癌細胞の増殖が抑制されるかを検討した。ホモシステイン添加濃度をそれぞれ、0、1、2、5mM と振り分け、48 時間後に細胞増殖を観察した。

ホモシステイン添加による絨毛癌細胞のアポトーシス誘導の検討

において、ホモシステイン添加により絨毛癌細胞の増殖が抑制されるのが、アポトーシスによ

るものなのか、あるいは、細胞周期の停止によるものなのかを検討するため、Jar 細胞にホモシステインを 24 時間添加し、Annexin V/PI を用いたフローサイトメトリーを用いて測定した。また、ホモシステイン添加による絨毛癌細胞のアポトーシス誘導がより低濃度でも生じるか検討するため、絨毛癌細胞株 Jar の培地にホモシステインをそれぞれ、0、250、500、1000 μM の濃度となるように添加し、一定時間経過後に細胞内タンパクを回収し、ウェスタンブロッティング法で cleaved PARP の検出を試みた。

(2) MTX 投与によるホモシステイン濃度の上昇についての検討

MTX 投与による絨毛癌細胞内ホモシステイン濃度についての検討

MTX 投与により、絨毛癌細胞内ホモシステイン濃度が上昇するか検討するため、絨毛癌細胞株 Jar、BeWo、及び、JEG-3 の培地にそれぞれ、PBS (コントロールとして用いる) と MTX を添加し、絨毛癌細胞内ホモシステイン濃度の測定を行った。それぞれの絨毛癌細胞を播種し、24 時間培養後、PBS、及び、1 μM の MTX を添加し、48 時間培養した後、細胞抽出液を回収した。細胞抽出液のホモシステイン濃度定量は、セルバイオラボ社のホモシステイン ELISA キットを用いた。

MTX 投与による絨毛癌細胞培養上清中ホモシステイン濃度についての検討

MTX 投与により絨毛癌細胞培養上清中ホモシステイン濃度が上昇するか検討するため、以下のような実験を行った。オーバーナイトで培養した絨毛癌細胞の培養上清を除去し、さらにオーバーナイトで培養した。このとき、培養上清にそれぞれ、0、 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7}M となるように MTX を添加し、培養上清を全量回収し、ホモシステイン濃度を測定した

MTX 耐性株を用いた MTX 投与による絨毛癌細胞培養上清中のホモシステイン濃度上昇について検討

MTX 耐性株では、MTX 投与により細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇しないことを確認するため、MTX 親株と MTX 耐性株を用いて と同様の実験を行った。添加する MTX は 0M、または 10^{-8}M とした。

4. 研究成果

(1) ホモシステイン投与による絨毛癌細胞のアポトーシス誘導の検討

ホモシステイン添加による絨毛癌細胞増殖抑制の検討

Jar、BeWo、JEG3、いずれの絨毛癌細胞株においても、ホモシステインの容量依存性に細胞増殖が抑制されているのが確認された。

ホモシステイン添加による絨毛癌細胞のアポトーシス誘導の検討

ホモシステイン 1mM 添加では、初期アポトーシス、後期アポトーシスのいずれにおいても、その

増加は認められなかったが、ホモシステイン 5mM 添加では、その両者の増加が認められた。以上より、ホモシステイン添加による絨毛癌細胞の増殖抑制効果が、アポトーシスによるものであることが確認された。

また、低濃度ホモシステイン添加実験では、ホモシステイン添加後 1 日目ではいずれの濃度においても cleaved PARP のバンドが検出されなかったが、7 日目では 250、500、1000 μ M のいずれの濃度においても cleaved PARP のバンドが検出され、かつ、ホモシステイン濃度依存性にバンドが濃く検出された。以上のことから、低濃度ホモシステイン添加によっても、絨毛癌細胞のアポトーシスが誘導されるのが確認された。

(2) MTX 投与によるホモシステイン濃度の上昇についての検討

MTX 投与による絨毛癌細胞内ホモシステイン濃度についての検討

いずれの絨毛癌細胞株においても、MTX 添加により、絨毛癌細胞内ホモシステイン濃度の低下がみられ、予想に反するものであった。播種する絨毛癌細胞数、添加する MTX 濃度、MTX 添加時間など、様々な組み合わせで条件検討を試みたが、一定の傾向を示す結果は得られなかった。

MTX 投与による絨毛癌細胞培養上清中ホモシステイン濃度についての検討

MTX 濃度依存性に、培養上清中のホモシステイン濃度が上昇しているのが確認された。

MTX 耐性株を用いた MTX 投与による絨毛癌細胞培養上清中のホモシステイン濃度上昇について検討

MTX 親株では MTX 添加により細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇したのに対して、MTX 耐性株では上昇しなかった。

以上の結果により、ホモシステインが絨毛癌細胞のアポトーシスを誘導しうることが証明された。また、絨毛癌細胞への MTX 投与により細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇したこと、さらに、MTX 耐性絨毛癌細胞に MTX を投与しても、細胞培養上清中のホモシステイン濃度が上昇しないことが証明され、MTX の抗腫瘍効果の作用機序として、細胞内ホモシステイン濃度の上昇が関与することが明らかとなった。

本研究により、難治性絨毛癌に対する新規治療法として、ホモシステインを応用したものを開発する基盤が確立された。以上の研究成果は、第 76 回日本産科婦人科学会で発表され、今後のさらなる研究の発展に対する学術的、社会的意義は大きく、難治性絨毛癌の治療成績向上に貢献しうると考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Oda Yukari, Niimi Kaoru, Yoshida Kosuke, Tamauchi Satoshi, Yokoi Akira, Yasui Yuko, Nishiko Yuki, Shibata Mayu, Shimizu Yusuke, Yoshihara Masato, Ikeda Yoshiki, Yoshikawa Nobuhisa, Nishino Kimihiro, Yamamoto Eiko, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Establishment and characterization of a non-gestational choriocarcinoma patient-derived xenograft model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-023-11626-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 西野公博、安井裕子、西子裕規、柴田真由、小田結加里、渡邊絵里、吉田康将、新美薫、山本英子、梶山広明
2. 発表標題 ホモスチニンによるアポトーシスに着目した難治性絨毛癌に対する新規治療法の検討
3. 学会等名 第76回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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