

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460246

研究課題名(和文) エピジェネティック解析情報に基づいた新規抗癌剤耐性克服法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an novel reversal of anticancer drug resistance based on the epigenetic information

研究代表者

高良 恒史 (Takara, Kohji)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：00329939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞が抗癌剤に抵抗性を示す現象には、様々なメカニズムが関与している。今回、遺伝子の機能発現を変化させるエピジェネティクス現象に着目し、これらの現象と癌細胞の抗癌剤抵抗性(耐性)との関連性を検討した。その結果、遺伝子全体に生じるエピジェネティクス現象は、モデル癌細胞とその耐性細胞で相違しなかった。しかし、これらの現象に関連する遺伝子の発現プロファイルは、細胞間で異なっていた。また、エピジェネティクス現象をリセットできる薬物の処置により、抗癌剤感受性はいずれの細胞においても増強した。従って、抗癌剤耐性とエピジェネティクス現象の関連性は十分解明できなかったが、新たな耐性克服法の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： The various types of mechanism are participated in the phenomena which shows the resistance to anticancer drugs in cancer cells. Herein, from the viewpoints of epigenetics causing the change in the gene function, the relation with the drug resistance and epigenetics were examined. As results, the differences in the global DNA methylation were not found in HeLa and its resistant cells. However, the expressions of mRNA involving in the epigenetics were different among the cells. Treatment with drugs having the activity of demethylation increased sensitivity to cisplatin in either cells. Consequently, the novel possibility of reversal of resistance may be demonstrated, although the relation with the drug resistance and epigenetics has not reached the sufficient evidence.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：エピジェネティクス 癌 抗癌剤耐性

1. 研究開始当初の背景

“薬剤の有効性や副作用の発現は、個人の遺伝的特徴に関係する”。このように、ゲノム情報に基づいて患者個々の遺伝的特徴を把握し、個々に最適な薬物治療法の確立を目指すファーマコジェノミクス研究が世界中で幅広く展開され、薬物療法に大きなインパクトを与え続けている。

このような個人差の実体は、ゲノム塩基配列の違い(ジェネティック変異)、特に、塩基配列の1つの塩基のみが異なる一塩基多型に起因していると考えられている。

しかしながら、2003年のヒトゲノム解読宣言後、遺伝子の概数が明らかになりつつある一方で、高等生物の複雑さが、遺伝子の数のみでは説明できないことも明らかとなっている。

そこで、ゲノム塩基配列以外にも個人差として遺伝的に伝達されるエピジェネティクスが注目されている。

エピジェネティクスの実体は、DNA そのものに対するメチル化化学修飾及びDNAを巻きつけてクロマチン構造を作るヒストンタンパクに対するアセチル化化学修飾である。エピジェネティクスは、DNAの塩基配列の変化なしに、遺伝的しかも可逆的に遺伝子機能の発現を変化させる現象である。

すなわち、遺伝子機能の発現に影響するエピジェネティクス変異が、抗癌剤耐性のメカニズムにも影響を及ぼす可能性は十分に想定される。また、耐性細胞におけるエピジェネティクス変異が、新たな耐性克服のアプローチになる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

癌細胞の抗癌剤に対する耐性獲得機構として、様々な分子(蛋白)の変異、あるいは発現・活性の変動が既に明らかにされている。

しかしながら、癌細胞が抗癌剤に対する耐性を獲得するメカニズムに関して、エピジェネティックな観点から解析した研究は、ほとんど実施されていないのが現状である。

本研究では、癌細胞の抗癌剤に対する耐性獲得とエピジェネティック変異との関連性を解析し、さらに抗癌剤耐性の克服に向けた新たなアプローチ法について検討する。具体的には、以下の3点を目的とする。

(1) 抗癌剤耐性を獲得した癌細胞(耐性変異株)とその親株細胞を用いて、ゲノムワイドのメチル化異常を比較解析する。

(2) 既知の耐性遺伝子の発現に及ぼすエピジェネティック変異の影響を評価する。

(3) エピジェネティック変異のリセットによる耐性克服法の可能性を評価する。

3. 研究の方法

実験には、モデル癌細胞として HeLa 細胞を選択し、HeLa 細胞をシスプラチン、パクリタキセル及び SN-38 (イリノテカン活性代謝物) で長期曝露することにより樹立した耐性変異株を用いた。

これら細胞におけるゲノムワイドのメチル化度は、Methylamp™ Global DNA Methylation kit (Epigentek)を用いて測定した。また、エピジェネティクス関連遺伝子の発現は、マイクロアレイ解析及びリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

メチル基を S-アデノシン-L-メチオニンからシトシンの5位に転移させ、CpG アイランドのメチル化を引き起こす DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)の活性は、EpiQuick DNMT Activity/Inhibition Assay Ultra kit により測定した。

脱メチル化作用を有する 5-アザシチジン(5-AZA)処置が、これら細胞の抗癌剤感受性に及ぼす影響を WST-1 法により評価した。

4. 研究成果

各細胞における抗癌剤感受性は、既報告と同様、そのプロファイルは細胞間で異なっていた。しかしながら、ゲノムワイドのメチル化度は、HeLa 及びその耐性変異株において、有意な相違を認めなかった(Fig. 1)。これは、ゲノム全体のメチル化異常ではなく、各遺伝子レベルでのメチル化異常を検討する必要性を示唆している。

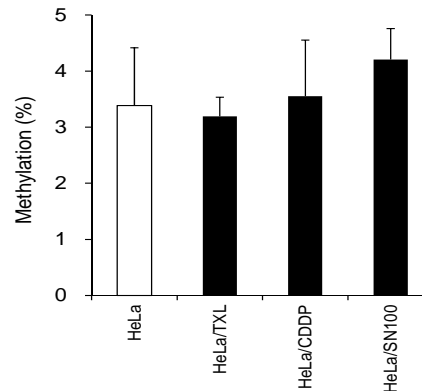


Fig. 1. The global DNA methylation in HeLa and its resistant cells.

そこで、メチル化された DNA に対して脱メチル化作用を示す TET(ten-eleven translocation)に着目し、各細胞の TET ファミリーの mRNA 発現を検討した。その結果、顕著ではなかったものの、TET ファミリーの発現は細胞間で相違することが示された(Fig. 2)。また、エピジェネティクス関連遺伝子として、DNA(cytosine-5-)-methyl Transferase (DNMT)、methyl-CpG binding domain protein (MBD)、および histone deacetylase(HDAC)の mRNA 発現を検討した結

果、各遺伝子のサブファミリーの発現が、HeLa 及び耐性変異株において相違するものが観察された。従って、抗癌剤に対する耐性化にエピジェネティクス関連遺伝子の発現変動が関与する可能性が考えられた。

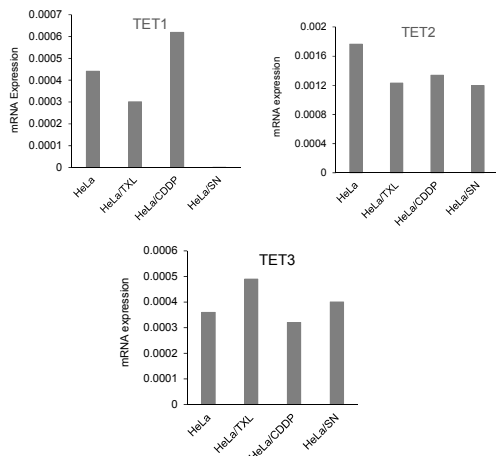


Fig. 2. The mRNA expression of TET family in HeLa and its resistant cells.

これらエピジェネティクス関連遺伝子のうち、DNAのメチル化反応に關する DNMT に着目し、各細胞における DNMT 活性を測定した。その結果、DNMT 活性も細胞間で相違し、これらの活性とシスプラチンの 50%増殖阻害濃度 (IC₅₀ 値) には負の關連傾向が認められた (Fig. 3)。DNMT 活性の低下と CDDP 低感受性との關連性が示唆されたものの、その詳細なメカニズムは不明である。

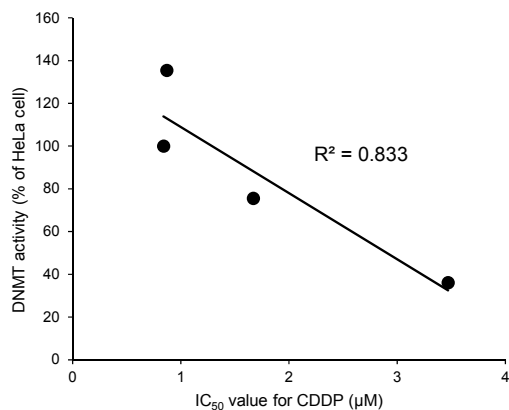


Fig. 3. Relationship of DNMT activity and CDDP sensitivity in HeLa and its resistant cells.

一方、脱メチル化作用を有する 5-アザシチジン (5-AZA) で各細胞を処置することにより、CDDP に対する感受性がすべての細胞において回復した (Table 1)。これは、5-AZA による脱メチル化、すなわちエピジェネティクスのリセットが、CDDP 感受性を増強させることを示唆している。従って、エピジェネティクスのリセットが、抗癌剤耐性の克服につながる新たなターゲットと考えられた。しかしながら、DNMT 活性と CDDP 感受性との關連性 (Fig. 3) の結果は、5-AZA 処置による感受性の回復

結果と相反していると考えられる。これは、相反作用を有する DNMT 活性と TET3 発現が、本研究において正の關連傾向を示した結果も得られたことから、DNMT 活性のみに着目したことが要因と推察され、エピジェネティクス関連分子を網羅的に解析することが必要と考えられた。

Table 1. Effects of 5-AZA on the IC₅₀ values for CDDP in HeLa and its resistant cells

Cell	IC ₅₀ value for CDDP (µM)			
	HeLa	HeLa/TXL	HeLa/CDDP	HeLa/SN100
Control	0.84 ± 0.29	0.87 ± 0.33	3.47 ± 4.18	1.67 ± 0.97
+ 0.1 µM 5AZA	0.60 ± 0.19	0.67 ± 0.27	2.49 ± 1.50	1.07 ± 0.53
+ 1 µM 5AZA	0.40 ± 0.13	0.44 ± 0.19	1.20 ± 0.50	0.35 ± 0.13

以上の研究成果から、HeLa 及びその耐性変異株において、ゲノム全体におけるメチル化は、いずれの細胞においても同等であったことから、抗癌剤に対する耐性化にはゲノム全体としてのメチル化異常は生じていないと考えられた。しかしながら、メチル化または脱メチル化に關するエピジェネティクス関連遺伝子の発現が、各細胞において相違した。これは個々の遺伝子のメチル化変異は生じている可能性を示唆しており、今後、これらの解明が必要であると考えている。

また、脱メチル化作用を有する 5-AZA で各細胞を処置することにより、CDDP 感受性がいずれの細胞においても増強したことから、脱メチル化、すなわちエピジェネティクスのリセットが抗癌剤感受性に影響を及ぼすことが示された。従って、抗癌剤に対する耐性が、エピジェネティクスリセットを利用して克服できる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

中山優子、木下 淳、峯垣哲也、山本和宏、高良恒史: ABCB5 発現抑制によるシスプラチン耐性の誘導.

日本薬学会第 136 年会(横浜)
2016 年 3 月 27 日 ~ 3 月 29 日

中山優子、木下 淳、峯垣哲也、山本和宏、高良恒史: アミノ酸トランスポーターの発現と抗癌剤耐性との關連性.

日本薬学会第 136 年会(横浜)
2016 年 3 月 27 日 ~ 3 月 29 日

中山優子、深澤郁也、木下 淳、峯垣哲也、山本和宏、高良恒史：アミノ酸トランスポーターを標的としたシスプラチン耐性の克服。第 25 回日本医療薬学会年会(横浜) 2015 年 11 月 21 日～11 月 23 日

中山優子、山本和宏、峯垣哲也、木下 淳、高良恒史：アキシチニブで長期曝露したヒト腎臓癌由来 Caki-2 の細胞特性。日本薬学会第 135 年会(神戸) 2015 年 3 月 26 日～3 月 28 日

山本彩佳、峯垣哲也、棚橋真実、宮本恵輔、荒木 悠、稲垣恵未、林 絵里、伊藤 恵、吉本咲貴、中山優子、高良恒史、辻本雅之、西口工司：Poly(ADP-ribose)polymerase 阻害剤 Veliparib 耐性ヒト乳癌細胞株の樹立とその特性。日本薬学会第 135 年会(神戸) 2015 年 3 月 26 日～3 月 28 日

水本篤志、山本和宏、高良恒史、中山優子、中川 勉、平野 剛、平井みどり：腎細胞癌におけるスニチニブ不応性および耐性メカニズムの探索。日本薬学会第 135 年会(神戸) 2015 年 3 月 26 日～3 月 28 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

関連論文

A. Mizumoto, K. Yamamoto*, Y. Nakayama, K. Takara, T. Nakagawa, T. Hirano, M. Hirai: Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor constitutes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *J. Pharm. Exp. Ther.* **355**, 152-158 (2015).

Chavez JD, Schweppe DK, Eng JK, Zheng C, Taipale A, Zhang Y, Takara K, Bruce JE*: Quantitative interactome analysis reveals a chemoresistant edgotype. *Nat. Commun.* **6**, 7928 (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高良 恒史 (TAKARA KOHJI)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号：00329939

(2) 研究分担者

峯垣 哲也 (TETSUYA MINEGAKI)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10549306

木下 淳 (ATSUSHI KINOSHITA)
姫路獨協大学・薬学部・講師
研究者番号：60454766

中山 優子 (YUKO NAKAYAMA)
姫路獨協大学・薬学部・助手
研究者番号：50708419