

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830065

研究課題名(和文)Oncogenic Kras-JNK経路の癌幹細胞性維持に関わる役割

研究課題名(英文)The impact of JNK activity on the cancer stem cells

研究代表者

岡田 雅司 (Okada, Masashi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：70512614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌幹細胞においてJNK活性が癌幹細胞性維持に必須であること、膵癌において高頻度で見られるKrasの活性型変異がJNKの活性を上昇させることを見出した。JNK阻害薬として頻繁に使用されるSP600125およびヒトにおいて安全が見出されている子宮内膜症の治療薬として開発されたAS602801処理によって癌幹細胞の幹細胞性および腫瘍創始が抑制されることをin vitroおよびin vivoにて見出した。更に膵癌幹細胞では非癌幹細胞に比して抗癌剤処理後の活性酸素種の上昇が低く抑えられるが、JNK阻害薬処理で抗癌剤処理誘導性活性酸素種の上昇を促進することにより抗癌剤抵抗性を解除することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated that JNK activity is necessary for maintenance of cancer stem cell (CSC) capacity on pancreatic CSCs as well as glioblastoma and lung CSCs in our previous reports. SP600125, a JNK inhibitor, treatment inhibits self-renewal and tumor-initiating capacity. Moreover, systemic administration of SP600125 reduces tumor-initiating CSCs in vivo. The SP600125 has been used in the overwhelming majority of studies, but the clinical safety profile is unknown. Therefore, we used a novel JNK inhibitor, AS602801 that has been developed for the treatment of inflammatory endometriosis. The AS602801 treatment also inhibits CSC capacity and tumor initiating capacity in vitro and in vivo. Generally chemoresistance associated with CSCs, we show that JNK is critically involved in the resistance of pancreatic CSCs to 5-FU and gemcitabine. The JNK inhibition promotes 5-FU or GEM-induced increase of intracellular reactive oxygen species.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん幹細胞 腫瘍発生 JNK ROS 薬剤抵抗性 Kras

### 1. 研究開始当初の背景

難治癌の一つである膵臓癌では 80-95%と高頻度で Kras 遺伝子の恒常活性化型変異が認められ、変異 Kras を膵臓特異的に発現誘導させた膵臓マウスモデルでは発現後数週間で膵臓にて腫瘍が発生し始め発現誘導を抑制すると腫瘍の退縮がおきるという報告もあり変異 Kras が腫瘍の発生および維持の両者において重要な役割を果たしていることはすでによく知られている。一方、癌幹細胞が腫瘍の発生や維持に重要な役割を持っていることが知られるようになってきたが、これまでのところ癌幹細胞維持における Kras の役割は報告されていない。

我々は癌幹細胞に特徴的な腫瘍創始能を維持する上で JNK が重要な役割を果たしていることをグリオーマおよび肺癌で見出している。この JNK は元来 Kras によって活性化されるキナーゼとして見出された経緯もあり膵臓癌幹細胞で変異 Kras が JNK 活性化に関与している可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

Kras 遺伝子の恒常活性化型変異は膵臓癌で高頻度で見出されており、腫瘍の発生や維持への関与が知られているがその機序については未だ不明な点が多い。腫瘍の発生や維持には、近年、癌幹細胞の関与が指摘されているが Kras の癌幹細胞維持における役割はまだ知られていない。我々はこれまでに癌幹細胞において c-Jun N-terminal Kinase (JNK) が癌幹細胞の維持に関わっていることを報告してきたが、ごく最近 JNK が膵臓癌幹細胞の維持にも関わっていること、膵臓癌幹細胞において Kras が JNK の活性化に関わっていること等を示す予備的知見を得た。これらの知見から我々は変異 Kras が JNK を介して膵臓癌幹細胞の幹細胞性維持に重要な役割を果たしている、という新たな仮説を着想するに至った。そこで本研究ではこの我々独自の仮説、すなわち癌幹細胞維持における Kras-JNK 経路の役割について検証を試みる。

### 3. 研究の方法

膵臓癌幹細胞において変異 Kras による JNK 経路活性化が幹細胞性(自己複製能・腫瘍創始能)の維持に必要なとされるかを以下の 4 項目に沿って検討する。基本的には 1.-3. を並行して行い予想通りの結果が得られた場合 4. に進むことになるが、申請者らはこれまで JNK と癌幹細胞性の関連性を研究してきたことから、まず項目 1. から重点的に実施することとする。

- (1). 膵臓癌幹細胞の自己複製能・腫瘍創始能に JNK が必要とされるかを阻害薬、ロックダウン法で検討する。
- (2). 膵臓癌幹細胞の自己複製能・腫瘍創始能に Kras が必要とされるかをロックダウン法で検討する。

- (3). 膵臓癌幹細胞で JNK の活性化に変異 Kras が関与しているかを Kras ロックダウン法にて検討する。
- (4). Kras が JNK を介して膵臓癌幹細胞の維持に関与していることを示すため、活性化型 JNK 発現により Kras ロックダウン法による幹細胞性消失効果がキャンセルされるかを検討する。

### 4. 研究成果

- (1). PANC-1, PSN-1 由来膵臓癌幹細胞 (Cancer Stem Cell: CSC) を用いて JNK 特異的阻害薬である SP600125 処理および JNK 遺伝子ロックダウンが種々の癌幹細胞マーカーとして知られる CD133, Sox2, Nanog, c-Myc などの発現量を抑制した。
- (2). SP600125 の前処理および JNK 遺伝子ロックダウンは自己複製能の評価として用いられる sphere 形成を顕著に減少させた。
- (3). JNK 阻害処理をあらかじめ施した PANC-1 CSC をヌードマウスに移植するとコントロール処理群に比して腫瘍創始が顕著に抑制された。
- (4). あらかじめヌードマウスに PANC-1 CSC を移植し、一定の大きさになった時に JNK 阻害薬を投与した後、その腫瘍を取り出して分散後、新たにヌードマウスに移植数を振って移植した。この連続移植実験により、JNK 阻害薬処理群は *in vivo* での癌幹細胞数を減少させた結果腫瘍創始を顕著に抑制することを明らかにした。
- (5). 頻繁に使用される SP600125 はヒトでの安全性が試験されていないため、現在のところ唯一安全性試験をクリアしている子宮内膜症の治療薬として開発された AS602801 を使用して SP600125 を用いて行った上記実験を行うと、*in vitro* で癌幹細胞マーカーの発現低下、sphere 形成能を失わせること、腫瘍創始を抑制すること、*in vivo* でがん幹細胞の数を減少させることが可能であることを明らかにした。
- (6). 一般的に癌幹細胞は薬剤耐性が高いとされるが、樹立した膵臓癌幹細胞においても 5-FU, ゲムシタピンに対して同様に耐性が高いことを見出した。
- (7). これらの膵臓癌幹細胞では JNK 活性が非癌幹細胞に比して高いということを見出し、更に、この JNK 活性を SP600125 で抑制すると 5-FU, ゲムシタピンの感受性が向上することを見出した。

- (8). 5-FU やゲムシタピン処理により活性酸素が上昇し、それゆえ細胞死が誘導されるが、膵癌幹細胞に対して JNK 阻害薬を処理すると、抗瘍剤処理によって誘導される活性酸素種の上昇が非常に亢進しやすい状態になっていることを明らかにした。

#### 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 8 件)

Okada M., Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C. : The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016, in press (査読有り)

Seino M\*, Okada M\*, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C. (\***Equal Contribution**): Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016 Jan;35(1):593-601. (査読有り)

Sakaki H, Okada M\*,\*\* Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C. (\***Co-first author**, \*\***Corresponding author**): GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6607-14. (査読有り)

Seino M\*, Okada M\*, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. (\***Co-first author**): Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2015 Jan;35(1):85-96. (査読有り)

Shibuya K\*, Okada M\*, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, Kitanaka C. (\***Co-first author**): Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget.* 2015 Jan 20;6(2):651-61. (査読有り)

Suzuki S\*, Okada M\*, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C. (\***Co-first author**): JNK

suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. *Oncotarget.* 2015 Jan 1;6(1):458-70. (査読有り)

Seino M\*, Okada M\*, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C. (\***Co-first author**): Requirement of JNK signaling for self-renewal and tumor-initiating capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Res.* 2014 Sep;34(9):4723-31. (査読有り)

Okada M., Shibuya K, Sato A, Seino S, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C.: Targeting the K-Ras--JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. *Oncotarget.* 2014 Jul 15;5(13):5100-12. (査読有り)

[学会発表](計 3 件)

Masashi Okada, Keita Shibuya, Atsushi Sato, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, and Chifumi Kitanaka: Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation; 生化学会分子生物学会合同大会、2015年12月1日 4日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

Masashi Okada, Keita Shibuya, Atsushi Sato, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, and Chifumi Kitanaka: Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation; 日本癌学会総会、2015年10月8日 10日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Masashi Okada, Atsushi Sato, Keita Shibuya, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, Yoshitaka Narita, Soichiro Shibui, Takamasa Kayama, and Chifumi Kitanaka: JNK contributes to temozolomide resistance of glioma stem cells via regulation of MGMT expression; 日本癌学会総会、2014年9月25日 27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡田 雅司 (MASASHI OKADA)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号：70512614