

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350974

研究課題名(和文) MET誘導物質の探索とがん治療薬への開発

研究課題名(英文) Discovery of MET-inducing compounds as anti-cancer chemotherapeutic agents

研究代表者

田代 悦 (Tashiro, Etsu)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：00365446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、制がん剤耐性を獲得した悪性がん細胞ではEMTが誘導されていることが報告されているが、そのEMT誘導メカニズムについては不明な点が多く残っていた。本研究ではまずシスプラチン持続暴露によってEMTが誘導されたがん細胞を樹立することに成功した。さらに樹立した細胞に対し、ケミカルゲノミクスの手法を用いて以下の事を明らかにした。すなわち、制がん剤耐性の獲得に伴うEMT誘導のメカニズムの一つとして、シスプラチンを添加することでTGF- β 産生の増加によるTGF- β シグナルが亢進し、これによってEMTが誘導、そして制がん剤耐性を獲得する、というモデルを提唱した。

研究成果の概要(英文)：There are now growing evidences suggesting an association between EMT, a hallmark of tumor malignancy, and chemoresistance to many cytotoxic drugs. However, it has not been fully clear about its mechanism. Here, we established cisplatin-resistant clones of human colorectal carcinoma LoVo cells (CDDPr/LoVo cells) by continuously exposing LoVo cells to cisplatin and we found that EMT was induced in CDDPr/LoVo cells. Thus, we performed chemical genomics approach to address the mechanism by which EMT was induced in CDDPr/LoVo cells. As a result, we found that the secretion of TGF- β in CDDPr/LoVo cells was elevated compared to that in LoVo cells. Moreover, when cisplatin was treated with LoVo cells, the secretion of TGF- β was enhanced within a few days after cisplatin treatment, which resulted in EMT induction. Since mesenchymal cells were resistance against cisplatin-induced apoptosis, it is likely that cisplatin-induced EMT by TGF- β secretion contributes to acquire the chemoresistance.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：EMT 制がん剤耐性 シスプラチン TGF-beta

1. 研究開始当初の背景

EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) とは上皮がん細胞が間葉系細胞へとその形質を転換する現象で、EMT が誘導されたがん細胞は高い運動能や薬剤耐性などの悪性度を獲得するため、がん治療を困難にする。しかしながら、がんが悪性化する過程でどの様に EMT が誘導されるのかそのメカニズムは不明なままであった。よって、EMT を阻害する物質、もしくは EMT の逆プロセスである MET を誘導する物質は、がん悪性化過程での EMT 誘導メカニズムを解析するための有効なバイオプローブになるばかりでなく、がん細胞の悪性度を減衰させる新しいタイプの抗がん剤としても期待できる。

2. 研究の目的

以上の研究背景を踏まえ本研究では、EMT を制御する低分子化合物を取得し、その低分子化合物の作用機序解析を通してがん悪性化における EMT 誘導機構の解析を目的とした。

3. 研究の方法

EMT の評価は上皮マーカーである E-cadherin、間葉マーカーである N-cadherin などの発現をウェスタンブロッティングおよび Real-Time RT-PCR で検出した。また培地中の TGF- β 量は ELISA にて定量した。さらに標準阻害剤キット (SCADS) は (旧) 文科省新学術領域研究・がん研究分野の特性を踏まえた支援活動・化学療法基盤支援活動から提供して頂いた。

4. 研究成果

(1) EGF 刺激による E-cadherin 発現減少のメカニズム解析

EMT を誘導する内在性因子として TGF- β がよく知られており、TGF- β による EMT 誘導機構も詳細に解析されてきたが、その他の EMT を誘導する内在性因子については不明な点が多く残っている。そこで我々は、がん細胞種ごとに EMT を誘導する内在性因子が異なっているのではないかと考え、幾つかのがん細胞に対し、TGF- β や EGF など内在性因子を添加して形態変化と上皮マーカーである E-cadherin の発現減少を指標に検討した。その結果、大腸がん LoVo 細胞に EGF を添加すると強固な細胞間接着が希薄になって間葉系のような細胞形態になり、また E-cadherin の発現が転写レベルで減少することを見出した (図 1)。

そこで LoVo 細胞における EGF 刺激による E-cadherin 発現減少のメカニズムを解析した。まず E-cadherin の発現は Snail や Slug など EMT 制御転写因子群によって制御されていることから、EGF 刺激によるこれら転写因子の発現を検討した。その結果、TGF- β は Snail や Slug の発現を上昇させたのに対し、EGF は Snail や Slug だけでなく、TWIST, ZEB1, ZEB2 の発現に影響がなかった。したがって、

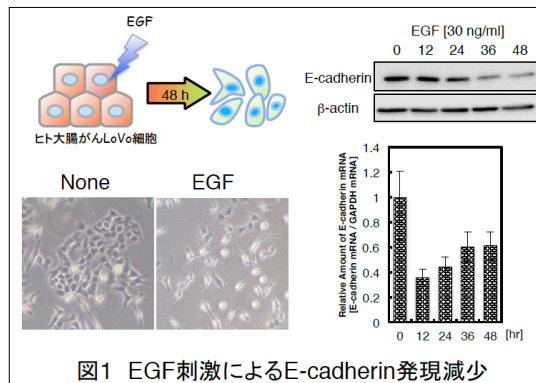


図1 EGF刺激によるE-cadherin発現減少

EGF は TGF- β の様に EMT 制御転写因子群の発現を介して E-cadherin の発現を制御しているのではなく、別のメカニズムで制御していることが考えられた。そこで次に、ケミカルゲノミクス手法で解析した。すなわち、標準阻害剤キット (SCADS) に含まれる化合物の中から、EGF による E-cadherin 発現減少をキャンセルする化合物を探した。その結果、MEK-ERK 経路を阻害する U0126 が EGF 刺激による E-cadherin 発現減少をキャンセルした (図 2)。一方で、EGF は MEK-ERK 経路以外にも PI3K-Akt 経路も活性化するが、PI3K 阻害剤 Wortmannin は EGF 刺激による E-cadherin 発現減少には影響を与えなかった。また、MEK-ERK 経路の下流についても解析したところ、JNK が EGF による E-cadherin 発現減少に関与していることがわかった。さらには、EGF は細胞遊走を活性化するが、EGF による細胞遊走は U0126 によって阻害されたが Wortmannin では阻害されなかった。以上の結果より、LoVo 細胞では EGF 刺激によって MEK-ERK 経路の活性化とそれに引き続く JNK の活性化を介して E-cadherin の発現が減少すること、これによって細胞間接着が希薄になって高い運動能を獲得して細胞遊走を引き起こすことが示唆された。

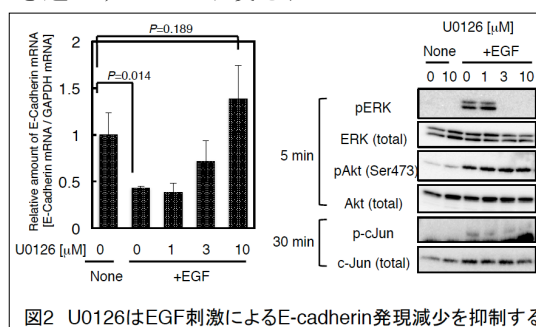


図2 U0126はEGF刺激によるE-cadherin発現減少を抑制する

(2) シスプラチン持続暴露による EMT 誘導

近年、転移能や制がん剤耐性を獲得した悪性がん細胞では EMT が誘導されていることが報告されているが、その EMT 誘導メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、制がん剤耐性と EMT の関連に着目し、制がん剤耐性がん細胞の樹立を試みた。

① シスプラチン耐性細胞の樹立

様々ながん細胞に対し、シスプラチン、パクリタキセル、ドキシソルビジンなど制がん剤を持続的に暴露し、3ヶ月間培養した。その結果、大腸がん LoVo 細胞にシスプラチンを持続暴露した時のみ、生き残った細胞（耐性細胞）を得ることに成功した。生き残った細胞の形態を観察すると、上皮細胞特有の強固な細胞間接着が消失し、間葉系細胞に特徴的な細長い形態に変化していることを見出した。そこでシスプラチン耐性細胞 (CDDP^r/LoVo 細胞) は EMT が誘導されているのではないかと考え、EMT マーカーを検出した。その結果、親株である LoVo 細胞に比べて上皮マーカー E-cadherin の発現減少、間葉マーカー N-cadherin の発現上昇、さらには Slug や Twist, ZEB2 といった EMT 制御転写因子の発現も上昇していた (図 3)。以上の結果より、CDDP^r/LoVo 細胞は EMT が誘導された細胞であることが明らかになった。

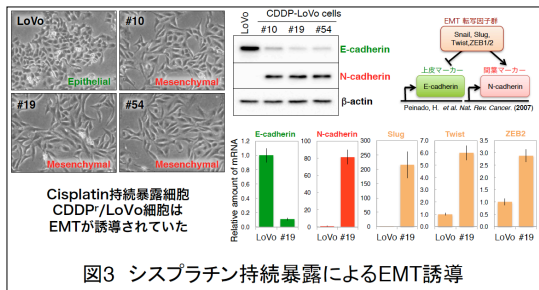


図3 シスプラチン持続暴露によるEMT誘導

② CDDP^r/LoVo 細胞における TGF-βシグナルの亢進

シスプラチン持続暴露による EMT 獲得の分子機構解析を目的に、ケミカルゲノミクス的手法を用いて CDDP^r/LoVo 細胞の形質を上皮の形質に戻す化合物の探索をおこなった。具体体には、やはり標準阻害剤キット (SCADS) に含まれる化合物の中に、細胞間接着が希薄な CDDP^r/LoVo 細胞の形態を再び親株と同様に強固な細胞間接着にする化合物を探索した。その結果、TGF-β受容体の阻害剤 TGF-βR inhibitor II (TK2) や SB431452 が細胞形態を元に戻すことを見出した。また TK2 や SB431452 は、親株に比べて発現減少していた E-cadherin の発現を回復させ、逆に親株に比べて発現上昇していた N-cadherin の発現を減少させた (図 4)。さらには、CDDP^r/LoVo 細胞はシスプラチンを添加してもアポトーシスが誘導されないが、TK2 や SB431452 を前処

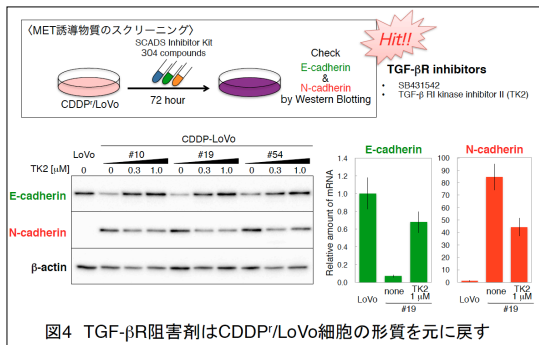


図4 TGF-βR阻害剤はCDDP^r/LoVo細胞の形質を元に戻す

理した CDDP^r/LoVo 細胞にシスプラチンを添加するとアポトーシスが誘導されたことから、TK2 や SB431452 は CDDP^r/LoVo 細胞のシスプラチン耐性も元に戻すことが明らかとなった。以上の結果より、CDDP^r/LoVo 細胞では TGF-βシグナルが亢進しており、これによって間葉系の形質を維持、制がん剤によるアポトーシス耐性を獲得していることが示唆された。そこで次に、CDDP^r/LoVo 細胞で TGF-βの産生が亢進している可能性について検討した。CDDP^r/LoVo 細胞の培養液中に含まれる TGF-β量を ELISA にて測定したところ、親株である LoVo 細胞に比べて増加していた (図 5)。したがって、CDDP^r/LoVo 細胞では TGF-β産生が増加することで TGF-βシグナルが亢進していると考えられた。

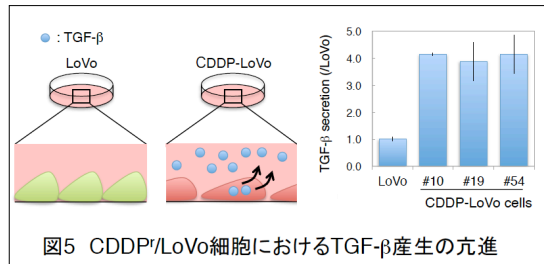


図5 CDDP^r/LoVo細胞におけるTGF-β産生の亢進

③ シスプラチン短時間暴露による EMT 誘導

CDDP^r/LoVo 細胞では TGF-β産生が増加することで TGF-βシグナルが亢進していることがわかったが、シスプラチン耐性を獲得した結果として TGF-β産生が増加したのか、それともシスプラチンによって TGF-β産生が増加したため EMT が誘導されてシスプラチン耐性を獲得したのかを検証することとした。まずは親株 LoVo 細胞にシスプラチンを添加すると、24 時間後から培養液中の TGF-β量が増加し、3 日後には約 4 倍になった (図 6)。またシスプラチンを添加すると 3 日後には E-cadherin mRNA の減少、N-cadherin mRNA と Slug mRNA の増加が観察された (図 6)。さらには、シスプラチンを添加する時に TK2 を同時に添加しておくと 3 日後の N-cadherin の発現上昇が抑制された。したがって、シスプラチンを数ヶ月も持続暴露しなくても、わずか3日間で EMT が誘導されることがわかり、それはシスプラチン添加による TGF-β産生の増加がトリガーになっていることが示唆された。また、LoVo細胞に TGF-βを添加すると 3 日後には EMT が誘導されるが、この細胞はシスプラチンによるアポトーシス耐性になっていた。以上の結果より、シスプラチンを添加すると数日以内に TGF-β産生の増加とそれによる EMT 誘導が起こり、これによってシスプラチン耐性を獲得したと考えられる。

④ シスプラチンによる EMT 誘導の普遍性

LoVo 細胞で観察されたシスプラチンによる EMT 誘導がどこまで普遍性を持つのか検討するため、LoVo 以外 7 種のがん細胞にシスプラチンを添加し、3 日後の EMT 誘導を評価した。その結果、LoVo 細胞以外にシスプラチン

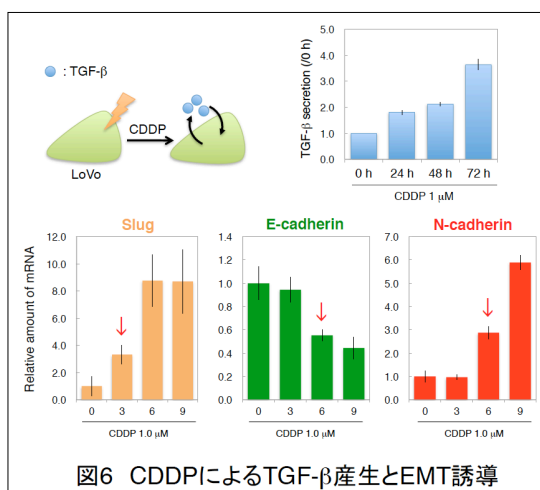


図6 CDDPによるTGF-β産生とEMT誘導

が EMT を誘導できたのは肺癌細胞 A549 だけだった。その一方で、シスプラチンを添加しても EMT が誘導されないがん細胞はいずれも TGF-β 受容体の遺伝子に変異するなど TGF-β シグナルが不活性化している細胞だった。

以上、制がん剤耐性の獲得に伴う EMT 誘導のメカニズムの一つとして、シスプラチンを添加することで TGF-β 産生の増加による TGF-β シグナルが亢進し、これによって EMT が誘導、そして制がん剤耐性を獲得する、というモデルを提唱した。

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 15 件)

- 1) Igarashi Y, Natsuoka N, In Y, Kataura T, Tashiro E, Saiki I, Sudoh Y, Duangmal K, Thamchaipenet A
Nonthmicin, a Polyether Polyketide Bearing a Halogen-Modified Tetronate with Neuroprotective and Antiinvasive Activity from Actinomadura sp.
Org. Lett., **19**, p1406, 2017 査読あり
- 2) Shikata Y, Yoshimaru T, Komatsu M, Katoh H, Sato R, Kanagaki S, Okazaki Y, Toyokuni S, Tashiro E, Ishikawa S, Katagiri T, Imoto M
Protein kinase A inhibition facilitates the antitumor activity of xanthohumol, a valosin-containing protein inhibitor
Cancer Science 2017, in press 査読あり
- 3) Ikeda H, Shikata Y, Watanapokasin R, Tashiro E, Imoto M
Metacycloprodigiosin induced cell death selectively in b-catenin-mutated tumor cells
The Journal of Antibiotics, **70**, p109-12, 2017 査読あり
- 4) Tashiro E, Henmi S, Odake H, Ino S, Imoto M
Involvement of the MEK/ERK pathway in EGF-induced E-cadherin down-regulation
Biochem Biophys Res Commun, **477**, p801-6, 2016 査読あり

- 5) Tashiro E and Imoto M
Screening and target identification of bioactive compounds that modulate cell migration and autophagy
Bioorganic & Medicinal Chemistry, **24**, p3283-90, 2016 査読あり
- 6) Tashiro E and Imoto M
Chemistry and biology of the compounds that modulate cell migration
J Ind Microbiol Biotechnol, **43**, p213-9, 2016 査読あり
- 7) Mizotani Y, Itoh S, Hotta K, Tashiro E, Oka K, and Imoto M
Evaluation of drug toxicity profiles based on the phenotypes of ascidian *Ciona intestinalis*
Biochem Biophys Res Commun, **463**, p656, 2015 査読あり
- 8) Krajanc A, Imoto M, Tashiro E, Fujimaki T, Shinjo S, and Watanapokasin R
Apoptosis induction associated with the ER stress response through up-regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid
BMC Complementary & Alternative Medicine, 15:26, 2015 査読あり
- 9) Kiga M, Nakayama A, Shikata Y, Sasazawa Y, Murakami R, Nakanishi T, Tashiro E, and Imoto M
SMK-17, a MEK1/2-specific inhibitor, selectively induces apoptosis in b-catenin-mutated tumors
Scientific Report, **5**, p8155, 2015 査読あり
- 10) Tashiro E and Imoto M
Chemical biology of compounds obtained from screening using disease models
Arch Pharm Res, **38**, p1651-60, 2015 査読あり
- 11) 田代悦、井本正哉
メタボロミクスと分子標的治療
日本臨床, **73**, p1268-72, 2015 査読無し
- 12) Yoshimaru T, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, and Katagiri T
Xanthohumol suppresses oestrogen-signaling in breast cancer through the inhibition of BIG3-PHB2 interactions
Scientific Report, **4**, p7355, 2014 査読あり
- 13) Fujimaki T, Saiki S, Tashiro E, Yamada D, Kitagawa M, Hattori N, and Imoto M
Identification of licopyranocoumarin and glycyrurol from herbal medicines as neuroprotective compounds for Parkinson's disease
PLoS One, **9**, e100395, 2014 査読あり
- 14) Magi S, Saeki Y, Kasamatsu M, Tashiro E, and Imoto M
Chemical genomic-based pathway analyses for epidermal growth factor-mediated signaling in migrating cancer cells
PLoS One, **9**, e96776, 2014 査読あり
- 15) Magi S, Takemoto Y, Kobayashi H,

Kasamatsu M, Akita T, Tanaka A, Takano K, Tashiro E, Igarashi Y, and Imoto M
5-lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1 regulate epidermal growth factor-induced cell migration through Tiam1 upregulation and Rac1 activation
Cancer Science, **105**, p290-296, 2014 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 井本正哉、今辻紗也佳、田代悦
Cisplatin 持続暴露による耐性獲得と EMT 誘導機構の解析
日本がん転移学会
2017 年 7 月 26 日 グランキューブ大阪「大阪府・大阪市」
- 2) 田代悦、井本正哉
シスプラチン持続暴露による EMT 誘導機構の解析
日本がん分子標的治療学会
2017 年 6 月 15 日 九州大学「福岡県・福岡市」
- 3) 田代悦、今辻紗也佳、井本正哉
シスプラチン耐性細胞における ROCK による E-cadherin 発現制御
日本癌学会
2016 年 10 月 7 日 パシフィコ横浜「神奈川県・横浜市」
- 4) Tashiro E
Discovery of ER stress-induced XBP1 activation inhibitor as cancer chemotherapeutic agent
第 5 回理研・MaxPlanck ジョイントシンポジウム
2016 年 4 月 18 日 ベルリン・マックスプランク研究所 (招待講演)「Berlin (Germany)」
- 5) 今辻紗也佳、大嶽弘之、奈良部進、田代悦、井本正哉
Cisplatin 持続暴露による EMT 誘導機構
日本農芸化学会年次大会
2016 年 3 月 29 日 札幌市教育文化会館「北海道・札幌市」
- 6) Imatsuji S, Tashiro E, Imoto M
TGF- β R inhibitor induced Mesenchymal-epithelial transition in CDDP-resistant tumor cells
日本癌学会年次大会
2015 年 10 月 9 日 名古屋国際会議場「愛知県・名古屋市」
- 7) 田代悦、大嶽弘之、奈良部進、井本正哉
抗がん剤耐性と EMT の関係に着目した MET 誘導物質の探索系構築
日本農芸化学会年次大会
2015 年 3 月 27 日 岡山大学「岡山県・岡山市」
- 8) 田代悦、井本正哉
HDAC 阻害剤 SAHA による MET 誘導
日本がん分子標的治療学会
2014 年 6 月 26 日 仙台市情報産業プラ

ザ「宮城県・仙台市」

[図書] (計 1 件)

- 1) 田代悦、井本正哉
EMT を標的としたがん治療
日本臨床 2014 年 2 月増刊号
「最新がん薬物療法学-がん薬物療法の最新知見-」 査読無し

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等：特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 悦 (TASHIRO ETSU)
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：00365446

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

井本 正哉 (IMOTO MASAYA)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号：60213253

(4) 研究協力者

該当無し