

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 21 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18437

研究課題名(和文) 難治癌幹細胞のJNKシグナルを標的とした薬剤感受性の回復とその機序

研究課題名(英文) Overcoming the drug resistance of cancer stem cells by targeting JNK pathway

研究代表者

鈴木 修平 (Suzuki, Shuhei)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90637175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌のみならず肺癌や膠芽腫といった各種難治癌の癌幹細胞においてJNK経路の阻害はスカベンジ経路(特にカタラーゼ・MnSOD)の減弱を介して、抗癌剤処理時の活性酸素種の上昇、つまりは薬剤抵抗性の減弱につながることを明らかにした。また、BHTなど特定のスカベンジ物質により薬剤抵抗性減弱効果がキャンセルされることも確かめた。xenograftを用いたin vivoモデルの確立にも成功した。SP600125だけでなく臨床応用されている薬剤AS602801でも同様の効果を得て、さらにJNKを阻害する薬剤Xも発見し、一部の成果を学会報告・出版し、その他の結果も投稿準備中である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that JNK inhibition amplifies chemotherapy-induced reactive oxygen species leading chemo-sensitivity in intractable cancer stem cells(CSCs) such as lung cancer CSCs and glioblastoma CSCs as well as pancreas cancer CSCs through attenuation of the scavenging process, by catalase and MnSOD in particular. Particular scavenging substance such as BHT is able to cancel amplifying chemotherapy-induced reactive oxygen species and chemo-sensitivity. We also succeeded to establish in vivo therapeutic model with xenograft. In addition to common JNK inhibitor SP600125, AS602801 clinically is proven to also obtain the same effect, and we discovered drug-X which inhibits JNK. We reported some presentation in an academic congress and in publication. And the remains are under preparation to be submitted to the academic journals.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：癌 化学療法 JNK 活性酸素種 薬剤抵抗性 xenograft

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は腫瘍内科医として各種難治癌に対して化学療法を行っているがその治療効果は決して高いものではない。その原因の一つとして高い薬剤抵抗性を有する細胞集団である癌幹細胞の存在が示唆されている。

我々は過去の研究を通じて、グリオブラストーマや肺癌、膵癌といった難治癌の癌幹細胞に対して c-Jun N-terminal Kinase (JNK) 経路を阻害することによって癌幹細胞の幹細胞性を減弱させることができることを明らかにしており、研究開始当初、それらの知見に加えて、膵癌幹細胞において、JNK 経路が活性酸素種 (ROS) の減弱を介してその高い薬剤抵抗性に寄与しているということを発見・報告した。

2. 研究の目的

前項に述べたように、膵癌幹細胞の高い薬剤抵抗性に JNK 経路を介した ROS 減弱機構が寄与しているという知見をもとに、その機構が膵癌以外の肺癌やグリオブラストーマといった難治癌幹細胞でも共通して存在しているのかどうかを確かめる。また、JNK 経路を抑制することで抗癌剤処理により発生する ROS の増幅を得て、癌幹細胞がもつ高い薬剤抵抗性を克服することで、それら一連の処理が難治癌幹細胞の治療モデルとして確立させるのではないかという仮定の元で、その治療モデル確立について in vivo と in vitro で検討を加える。そして、その ROS 増幅がどのような機序で起きているのかについても検討を加える。

3. 研究の方法

膵癌幹細胞だけでなく、他の難治癌幹細胞に対しても JNK 経路の阻害により薬剤耐性を克服することおよび ROS の増幅が普遍的であるか、さらに、JNK 阻害薬を用いた治療法を提示できるかを検討する。具体的には 1. と 2. とを並行しかつ重点的に行い、予想通りの結果を得ることができた場合、3, 4. について検討していくこととした。

- (1). JNK 阻害薬により抗癌剤耐性を克服する事が各種難治癌由来癌幹細胞において普遍性を持つか、ということ、細胞増殖および殺細胞効果を指標にして in vitro にて確認する。
- (2). JNK 阻害薬が抗癌剤誘導性 ROS 上昇を増幅するという現象が難治癌癌幹細胞において癌種を超えて普遍性を持つかということ、蛍光性 ROS 指示薬を指標に明らかにする。
- (3). JNK 阻害薬投与による抗癌剤耐性克服が治療効果に結びつくか、ヌードマウスに移植した癌幹細胞の腫瘍体積を

指標として調べる。

- (4). JNK 阻害による抗癌剤誘導性 ROS 上昇を増幅させる詳細なメカニズムを探索する。

4. 研究成果

- (1). PANC-1, PSN-1 由来癌幹細胞株 (Cancer Stem Cells : CSCs) に対して代表的な JNK 阻害剤である SP600125 による前処理もしくは JNK1 と JNK2 の遺伝子ノックダウン導入によって、CSCs では細胞内 ROS レベルの上昇がみられるが、5-fluorouracil や gemcitabine といった抗癌剤処理を施すことでさらに増幅がみられる。
- (2). (1) でみられた細胞内 ROS レベルの増幅は還元剤である N-アセチルシステインやジブチルヒドロキシルエンによる処理によって減弱させることができる。
- (3). (1) でみられた細胞内 ROS レベルの上昇は、CSCs の生細胞数の減弱や死細胞率の上昇につながっており、薬剤抵抗性を減弱することができた。また、その薬剤抵抗性減弱も N-アセチルシステインやジブチルヒドロキシルエンによる処理によってキャンセルさせることができた。
- (4). CSCs へ JNK 阻害剤による処理を施すことで、カタラーゼと Manganese superoxide dismutase (MnSOD) の発現の減弱がみられ、それらが細胞内 ROS レベルの増幅につながっていることが示唆された。
- (5). 上記で見られた結果は肺癌やグリオブラストーマといった難治癌細胞株に由来する CSCs でも同様の機序が観察され、膵癌 CSCs に限らず、他難治癌の CSCs でも確認される現象であることが示唆された。
- (6). 世界中で幅広く用いられている試薬 JNK 阻害剤 SP600125 はまだ臨床応用されておらず、in vitro におけるヌードマウスへの安全性はある程度担保されているものの、ヒトでの安全性は不明である。そこで、子宮内膜症の治療薬として研究が進められ、ヒトへの安全性が担保されている JNK 阻害剤である AS602801 を用いても in vitro において類似の結果を得られた。
- (7). JNK 阻害効果を有する異なる物質 X を用いても (6) 同様の結果を得ることができることが分かった。

(8). PANC-1 CSCs による xenograft を用いたヌードマウスへの皮下腫瘍形成・発育モデルを用いた in vivo における JNK 阻害剤と抗癌剤の逐次投与治療モデルを確立することができ、JNK 阻害剤投与後に抗癌剤を投与した群では、抗癌剤のみや JNK 阻害剤のみの投与に比して腫瘍形成や生育を阻害する傾向が認められ、マウスへの毒性も耐容可能な範囲であった。

ただし、一部データは未発表・投稿準備中である。

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 7 件)

Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Takeda H, Sanomachi T, Seino S, Narita Y, Kayama T, Kitanaka C, Okada M. Licochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction. *FEBS Open Bio*. 印刷中。(査読有)

Takeda H, Okada M, Suzuki S, Kuramoto K, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C. Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine. *Anticancer Res*. 2016 Dec;36(12):6311-6318. (査読有)

Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C. Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells alone and in Combination with Metformin. *Anticancer Res*. 2016 Nov;36(11):6083-6092. (査読有)

Suzuki S, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C. Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance. *Anticancer Res*. 2016 Oct;36(10):5153-5162. (査読有)

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 May 10;7(19):27021-32. (査読有)

Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C. 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)

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

[学会発表](計 4 件)

Masashi Okada, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, Hiroyuki Takeda and Chifumi Kitanaka. Targeting GLUT1 inhibits the self-renewal and tumorinitiating capacity of cancer stem cells. 日本癌学会総会. 2016年10月6-8日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

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. 生化学会分子生物学会合同大会. 2015年12月1-4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8-10日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

鈴木修平, 吉岡孝志. 膵癌幹細胞がもつ薬剤耐性への JNK の関与. 第19回日本がん分子標的学会学術集会, 2015年6月10-12日, 松山全日空ホテル (愛媛県松山市).

[図書](計 1 件)

鈴木修平, 岡田雅司, 吉岡孝志. 北隆館/ニューサイエンス社, 月刊「細胞」, 2017年130-132頁.

[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〕

東北がんプロフェッショナル養成推進プラン 4 大学合同学生セミナー. 2015 年 12 月 6 日, 山形国際ホテル(山形県山形市)にて成果報告を行った。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 修平 (SHUHEI SUZUKI)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：90637175