

令和 2 年 5 月 6 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10044

研究課題名（和文）エピジェネティクスによる薬剤耐性機序におけるp38 の関与の研究

研究課題名（英文）p38alpha and epigenetics on drug resistance

研究代表者

浅野 健（Takeshi, Asano）

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：70277490

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）：p38はある種の抗がん剤に関する薬剤耐性では中心的な役割を持っていることがほぼ、証明された。しかし、細胞株の種類によりその反応が異なり、ユニバーサルな役割としてのp38の役割には確証を得られなかった。これはp38の上流、下流のsignal transduction系がより重要である可能性が否定できないが、この点に関しては十分な確証を得る結果を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤の薬剤耐性に関して新しい治験が得られた。p38は色々な生体内の反応では重要な役割を持っており、今後の癌、特に白血病の治療において新しい薬剤耐性を克服する薬剤の開発に一つのプラットフォームを提供できると考えられる。今後、臨床分野で使用可能な薬剤の探索、開発を行っていく方向へ向かえば、現在、打つ手のない、再発、難治の癌、白血病に対して新たな治療法を提供できると考えている。

研究成果の概要（英文）：We confirmed the central role of drug resistance on certain anti-leukemia drugs. However, because strong variabilities on the reactions of p38alpha in each cell lines were observed, we could not conclude the universal role of p38alpha on drug resistance.

研究分野：小児科・血液

キーワード：薬剤耐性 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性白血病は小児で最も多い悪性腫瘍である。近年の化学療法の進歩によりその予後は飛躍的に改善した。しかし、依然 15%が再発するのも事実である。再発した白血病の治療はより有効な化学療法によって寛解に入った後の造血幹細胞移植が一般的である。しかし、現時点ではサルベージに用いられる化学療法は基本的には量を増やすのみで再発に特異的なものは少ない。抗癌剤の増量に対して抵抗性を示す場合、薬剤耐性の克服が大きく問題となってくる。我々は長年、抗癌剤の薬剤耐性の研究、特にエピジェネティクスの観点から薬剤耐性のメカニズムとその克服を研究してきた。エピジェネティクスは DNA のメチル基修飾、クロマチン、タンパク質の翻訳後修飾による遺伝子機能の発現の調節で DNA の塩基配列の変化無しで遺伝子の発現が変化するメカニズムであり細胞分裂後もその形質を維持する。我々の最近の研究でエピジェネティクスの一つであるメチル化に関して薬剤耐性白血病の網羅的メチル化解析と遺伝子発現解析のデータを統合し、cascade 解析を行うことで p38 $\alpha$ がメチル化が関係する薬剤耐性に重要な分子であることを発見した。

### 2. 研究の目的

本研究は抗がん剤の薬剤耐性に係わる分子としての p38 $\alpha$ の病態を解明するものである。従来、p38 $\alpha$ は JNK 経路と同様に紫外線、放射線、酸化、熱ショック、抗原刺激、サイトカインなどのストレス応答に関与し、下流では細胞質において MAPK-activated protein kinase 2 などの分子をリン酸化・活性化させることで細胞のアポトーシス、細胞周期停止、炎症反応を制御していることが知られている。我々は薬剤耐性白血病の網羅的メチル化解析と発現解析のデータを cascade 解析を行うことで p38 $\alpha$ がメチル化が関係する薬剤耐性に重要な分子であることを発見した。今回の研究はその p38 $\alpha$ の薬剤耐性における役割を解明し、薬剤耐性を克服するための方策を探索することである。

### 3. 研究の方法

#### 1) 使用する薬剤耐性白血病細胞株

我々がすでに樹立している MX2 (脂溶性ドキシソルピシン) 耐性株 (BALL, K562)、ドキシソルピシン耐性株 (BALL, K562, Reh)、クロファラビン耐性株 (NALL, SKW3)、ネララビン耐性株 (BALL, Molt4, NALL, SKW3)、ベンダムスチン耐性株 (BALL, Molt4, NALL, Reh, SKW3)、メソトレキサート耐性株 (BALL, K562)、エトポシド耐性株 (MDA-MB231, FM3A)、ピンクリスチン耐性株 (BALL, K562, NALL, Reh) を用いる (カッコ内は親株の細胞株の名称)。

#### 2) 薬剤耐性白血病における p38 $\alpha$ の発現変化、機能変化、メチル化、アセチル化の変化の検討

白血病細胞の親株 (薬剤感受性株) と薬剤耐性細胞の p38 $\alpha$  の状態 (mRNA, 蛋白発現、リン酸化蛋白の発現) を検討する。

mRNA はリアルタイム PCR 法で定量的に、蛋白発現、リン酸化蛋白の発現変化は western blot 法で測定する。同時にフローサイトメーターで測定できる方法を追求する。

p38 $\alpha$  遺伝子のプロモーター領域のメチル化、ヒストンアセチル化を薬剤感受性細胞と薬剤耐性細胞とで検討する。いずれも我々が確立した real time PCR を使った定量性のある方法で行う。p38 $\alpha$  のプロモーター領域には転写因子である Sp1 の結合サイトが多く見られることが知られている。メチル化の検討は GC rich region にある CpG islands のメチル化を検索できるようなプライマーを設計し、methylation specific PCR をリアルタイム PCR 法で行うことで定量的に検討する。ヒストンのアセチル化に関しては抗アセチル化 H3, H4 抗体と細胞破砕液を反応・沈降させ、抗体を結合した DNA を用いて p38 $\alpha$  のプロモーター領域に設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR 法を行い、定量的に結合した DNA 量を測定する。我々が確立したリアルタイム PCR を用いる方法は従来から行われてきた電気泳動後にエチジウムブロマイドの発光強度を測定するよりも簡便かつ定量性が優れていることが実証されている。

#### 3) p38 $\alpha$ の上流、下流に存在し、cascade 解析で関係が深いと考えられる分子群の発現変化、機能変化、メチル化、アセチル化の変化の検討

p38 $\alpha$  上流に位置する MAPKK として TAB1, Cdc25B, MKK3, MKK6 MKP-7, 下流に位置する基質として p73, SAP-1, MIF1, MAPKAPK3, CKII- $\alpha$ , ATF-2, Myf-6, Caspase 3 に関しても同様方法を用いて解析を行う。これらの分子群に加えて、メチル化に重要な役割を持ち近年 p38 $\alpha$  によってリン酸化がおこることが報告された DNMT3A, MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) 阻害薬が自己免疫疾患に対して臨床治験が始まっている MK2 も同様な解析を行う。

#### 4) p38 の増幅・抑制による関連遺伝子発現の変化と細胞の phenotype の変化の検討

2), 3)の結果を validate するために遺伝子そのものの発現を変化させ、関連する分子群の変化、細胞の薬剤感受性の変化を検討する。

##### 遺伝子発現増幅

p38 $\alpha$  cDNA (分子量 41267、理研より購入予定) または上流の MAPK kinase 6 (MKK6) cDNA を Tet-ON/OFF 発現誘導システムを用いて通常のリポフェクション、または electroporation 法を用いて transfection を行い、p38 $\alpha$  自身、上流、下流の分子群 (特に cascade 解析で強く関

係しているとされる遺伝子群)の mRNA 発現、蛋白発現(リン酸化も含む) 薬剤感受性の変化を検討する。加えて DNMT3A および、MK2、それに関連した Cdk25, MK3, MK5 の発現変化も検討する。薬剤感受性試験には今回は通常の 96 穴プレートで培養、測定する方法より、より臨床に近い結果が得られる Cell-able システムを用いる。これはプレート底に spheroid 形成させやすいポリマー加工が施されており、接着細胞ではより再現性が高い薬剤感受性試験ができることが報告されている。我々はこのシステムを用いることで白血病細胞のような浮遊細胞でも同様に再現性の高い結果が得られることを報告している。

#### 遺伝子発現抑制

p38α の機能を抑制させる薬剤(SB203580, SB 202190) 、 siRNA (3 種類の候補 siRNA, negative

control, GAPDH に対する siRNA(positive control)を用いて遺伝子発現を強制的に抑制させる。Transfection は通常の方法、または electroporation で行い、p38α 自身、上流、下流の分子群の mRNA 発現、蛋白発現(リン酸化も含む) 薬剤感受性の変化を検討する。加えて DNMT3A および、MK2、それに関連した Cdk25, MK3, MK5 の発現変化も検討する。薬剤感受性試験には強制発現実験と同様に Cell-able システムを用いる。

5) 実臨床で用いられている薬剤を用いた薬剤耐性克服

実際に臨床で用いられている脱メチル化薬(decitabine, azacytidine)、HDAC 阻害薬(バルプロ酸、メラトニン)を用いて、抗癌剤への薬剤耐性が克服できるかを検討する。

## 4 . 研究成果

p38α のプロモーター領域でのメチル化の変化が少なかった。

白血病細胞の親株(薬剤感受性株)と薬剤耐性細胞の p38α の状態(mRNA, 蛋白発現、リン酸化蛋白の発現)を mRNA はリアルタイム PCR 法で定量的に、蛋白発現、リン酸化蛋白の発現変化は western blot 法で測定した。親株に比して耐性株では p38α の発現は蛋白、mRNA とも上昇していた。しかし、その程度は耐性を示す薬剤、細胞株で大きく差があり、果たしてこれが耐性そのものに寄与しているという確証は得られなかった。

p38α のプロモーター領域の GC rich region にプライマーを作成し、methylation specific PCR をリアルタイム PCR 法で行うことで定量的に検討した。薬剤感受性の親株、耐性株で一定の傾向が認めなかった。

p38α cDNA、または上流の MAPK kinase 6 (MKK6) cDNA を Tet-ON/OFF 発現誘導システムを用いて transfection を行い、p38α 自身、上流、下流の分子群の mRNA 発現、蛋白発現、薬剤感受性の変化を検討した。MAPK6 の ON/OFF により p38α 遺伝子発現はうまく制御可能になったが、下流の遺伝子群の変化は細胞株、耐性薬剤の種類によってさまざまであり、多様な pathway を下流に有しているということがわかった。また薬剤耐性の変化の程度もまちまちであり、p38α の薬剤耐性への関与にはや悪剤や細胞の種類によって異なり、その影響力には濃淡があることが分かった。しかし、いずれの耐性細胞でもある程度(臨床的に効果があるかは別として)の割合で p38α が関与していることが証明された。

#### 遺伝子発現抑制

p38α の機能を抑制させる薬剤、siRNA を用いて遺伝子発現を強制的に抑制させ、p38α 自身、上流、下流の分子群の mRNA 発現、蛋白発現(リン酸化も含む) 薬剤感受性の変化を検討した。上記の発現増強実験と同様、p38α 遺伝子の発現は抑制されたが、上流の遺伝子の発現増強、下流の遺伝子の発現低下の程度は細胞株、耐性薬剤の種類によって差があり、また、Cdk25, MK3, MK5 の発現の変化も統一した変化は認めなかった。薬剤耐性細胞株における感受性の復活の程度と下流の遺伝子群の変化に一定の相関が見いだせなかった。

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 Asano T, Narazaki H, and Fujita A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in a morpholino anthracycline derivative-resistant leukemia cell line: p38 as a novel candidate for resistance.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pharmacology Research & Perspectives	6. 最初と最後の頁 e00285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.285	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0件

〔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
研究 分 担 者	藤田 敦士  (Fujita Atsushi)  (50366704)	日本医科大学・医学部・助教    (32666)	