

令和元年6月20日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10559

研究課題名(和文) エピゲノム制御に基づく薬剤耐性克服と新規大腸癌幹細胞標的療法の基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research on drug resistance mediated by epigenetic regulation and novel colorectal cancer stem cell targeted therapy

研究代表者

下里 修 (SHIMOZATO, OSAMU)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・室長心得

研究者番号：30344063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん難治性の一因である薬剤抵抗性を克服するために、その仕組みの解明が必須である。本研究から、3重メチル化されたヒストンH3K4の脱メチル化酵素JHDM1Bが、アジュバント療法を受けた大腸がん患者の予後に影響し、その仕組みとして、JHDM1Bによる薬剤抵抗性関連遺伝子群の包括的なエピゲノムの転写抑制が関与することが明らかになった。

JHDM1Bの発現を制御する「遺伝子スイッチ」として期待される有機化合物ピロール・イミダゾール-ポリアミドの1次構造が薬物動態に与える影響を検討した。PIPの1次構造は分子の疎水性を変え、結果的に当該分子の生体中の腫瘍組織への集積に影響することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能進行性大腸がんでは化学療法が主な選択となるが、薬剤抵抗性の獲得が治療を困難にしている。本研究はJHDM1Bを起点とするエピゲノムの薬剤抵抗性の一端を明らかにした。JHDM1Bのがんにおける機能は不明な点が多く残されており、本研究の学術的意義は大きいと考える。また、この成果は難治性大腸がんの新たな治療戦略を構築する上で重要な知見をもたらすと考え、本研究の社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Molecular mechanisms underlying drug resistance should be clarified to cure patients with refractory malignant tumors. In the present study, we demonstrated that a lower expression of the H3K4me3-related demethylase JHDM1B is associated with the poor prognosis of colon cancer patients received adjuvant chemotherapy and that JHDM1B repressed several drug resistance-related genes through the H3K4me3 modification. These findings suggest that the expression level of JHDM1B correlates with the sensitivity of colon cancer patients to FOLFOX regimen.

The present study also revealed a relationship between the hydrophobicity and the primary structure of pyrrole-imidazole-polyamide (PIP), which is considered as a gene switch to regulate JHDM1B expression. This study revealed that the primary structure of PIP alters the degree of hydrophobicity of the molecule, which in turn affects the accumulation of the molecule in tumor tissue in vivo.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 癌幹細胞 エピゲノムの制御 JHDM1B 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行大腸がんは、転移浸潤を伴い、予後不良である。近年、*KRAS* 変異型に対する FOLFIRI+Bevacizumab (*KRAS* 野生型には FOLFIRI +Cetuximab)、あるいは *BRAF* 変異型には FOLFOXIRI+Bevacizumab といったドライバー遺伝子の変異に応じたレジメンの開発により、その短期予後は改善されつつある。一方で、長期予後は必ずしも納得のいくものではなく、大腸がんの発生源となる癌幹細胞の根絶、特にその薬剤耐性の克服が課題と考えられている。

がん難治性の本体として想定される「癌幹細胞」に関する基礎研究は重要な課題であるが、これを解析しようと単離するには技術的困難がある。こうした背景の中で、正常組織幹細胞の培養法であるスフェア培養は癌幹細胞の培養モデルになると考えられている。申請者らはこれまでに、大腸がんをモデルにして、癌幹細胞の薬剤耐性機構を解析してきた。その中で、ヒストン脱メチル化酵素 JHDM1B によるエピゲノム制御の関与が存在し、当該分子が大腸がん細胞の FOLFIRI 耐性における中心的な制御因子である可能性を示した。よって、*JHDM1B* 遺伝子の発現を制御する新技術の創出は、切除不能進行大腸がんに対する治療法開発への発展が期待される。

千葉県がんセンター研究所では、DNA 結合性人工有機化合物 Pyrrole-Imidazole polyamide (PIP) に HDAC 阻害剤である SAHA を付加した化合物 (PIP-SAHA) を応用したエピゲノム制御技術に基づく創薬開発を進めている。さらに申請者らは、PIP が癌幹細胞へ特異的に集積することを見出している (未発表データ)。

## 2. 研究の目的

JHDM1B を起点としたエピゲノム制御による薬剤耐性獲得機構の全様解明、ならびに *JHDM1B* 発現増強に基づく薬剤感受性の向上を目指した PIP-SAHA による癌幹細胞標的エピゲノム創薬開発の基盤研究を本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト大腸がん細胞の培養

ヒト大腸がん由来細胞株は 10% 仔牛胎児血清を含む DMEM 培養液を用いて CO<sub>2</sub> インキュベーター内 (37℃、5%CO<sub>2</sub>) で培養し、トリプシン/EDTA 溶液を用いて継代維持した。一方、がん細胞のスフェアを作製する場合は、維持継代していた細胞株を、無血清培養液 {B-27 サプリメント、上皮細胞成長因子 (EGF)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を含む DMEM/Ham's F-12 培養液} の中で、低吸着性細胞培養プレートを用いて培養した。

### (2) ノックダウン細胞の作製とその生物学的影響の評価

内在性 *JHDM1B* のノックダウン (KD) は、レンチウイルスを用いて、shRNA を大腸がん細胞に導入した。抗がん剤に対する感受性は、大腸がん細胞を 5-FU あるいは L-OHP の存在下で 48 時間培養し、その生存率を WST 法で検討した。

### (3) *JHDM1B* の標的遺伝子探索

*JHDM1B* を KD した細胞およびコントロール細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ (アジレント社) を用いて網羅的遺伝子発現を解析した。

### (4) PIP の合成、疎水性度、担癌マウス体内動態の解析

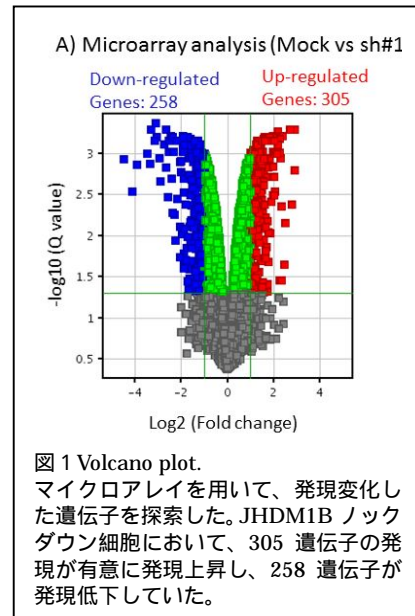
PIP はペプチド合成機を利用して合成し精製した。当該化合物の疎水性度は、高速液体クロマトグラフィーを応用し、オクタノール-水分係数の既知である有機化合物を標準試料として用い

定量した。当該化合物は、尾静脈からヒト大腸がん由来細胞株 LS180 細胞と SW480 細胞を皮下に接種したヌードマウスに注入して、*in vivo* イメージングシステムを用いて体表面の蛍光を経時的に撮影し、画像解析から平均蛍光強度を算出した。また、同マウスを解剖し、各臓器における蛍光強度も前述した方法で評価した。

#### 4. 研究成果

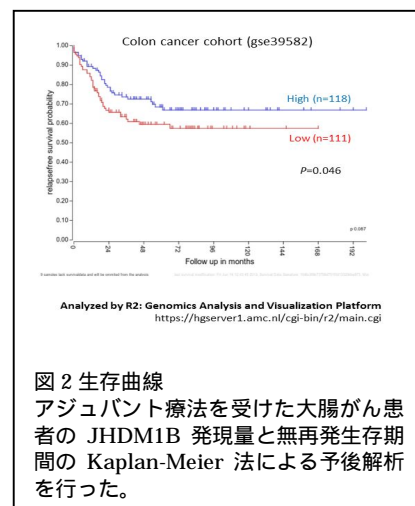
##### (1) JHDM1B の標的遺伝子の探索

正常組織幹細胞の培養法であるスフェア培養はがん難治性の本体として想定される「癌幹細胞」の培養モデルとして注目されている。申請者らは、大腸がん細胞から誘導したスフェアは 5-フルオロウラシル (5-FU) やオキサリプラチン (L-OHP) に対する抵抗性を獲得し、同時に、3 重メチル化ヒストン H3K4 (H3K4me3) の脱メチル化酵素の一つである JHDM1B の発現低下が観察された。そこで、両者の間にある関連性を検討するために、shRNA を用いて JHDM1B 遺伝子をノックダウンした大腸がん細胞 (以下、KD 細胞という) を作製し、通常の 2 次元培養下における 5-FU および L-OHP に対する感受性を検討した。その結果、コントロール細胞と比べ KD 細胞では、5-FU および L-OHP への抵抗性を獲得していた。この仕組みを理解するために、遺伝子発現変化の全体像をマイクロアレイ法で検討した。その結果、抗酸化関連遺伝子群に加えて、薬物代謝関連遺伝子群の発現上昇が観察された (図 1)。



##### (2) 実臨床における JHDM1B 発現レベルの意義

実臨床における JHDM1B 発現レベルの影響を解析するために、大腸がんコホートの臨床情報と発現レベルを解析した。その結果、JHDM1B の低発現が術後アジュバント療法を受けた患者の無再発生存期間の短縮につながる予後不良因子であった (図 2) ことに加えて、マイクロアレイ解析で挙げた薬剤抵抗性関連遺伝子の中には、高発現である場合に患者の予後不良を示す遺伝子が見出された。興味深いことに、予後への影響は、H3K4me3 修飾に関する他のメチル基転移酵素や脱メチル化酵素では認められなかった。



##### (3) JHDM1B によるエピゲノムの薬剤耐性の獲得

上記の実験結果から、JHDM1B はエピゲノム的にこれらの薬剤抵抗性遺伝子群を包括的にエピゲノム的に制御している可能性が示唆された。そこで、JHDM1B が当該遺伝子の発現をエピゲノム的に制御する因子であるかどうかを、クロマチン免疫沈降で検討した。その結果、発現変化した一部の遺伝子についてはその上流部分に JHDM1B が結合し、KD 細胞では当該遺伝子上流部分の H3K4me3 のレベルが亢進していた (図 3)。反対に、JHDM1B cDNA を過剰発現する OE 細胞を作製し薬剤感受性を検討すると、5-FU や L-OHP に対する感受性が高まることを見出した。当該細胞内の遺伝子発現状況を解析した結果、KD 細胞で発現上昇していた抗酸化関連遺伝子群は、OE 細胞で発現低下していた。以上から、JHDM1B の発現レベルは大腸がん化学療法 (FOLFOX) の感受性

を示唆するマーカーとなりうると考えられた(論文投稿準備中)。

#### (4) PIPの担癌マウスにおける薬物動態の検討

PIPは、その主成分であるイミダゾールとピロールの組み合わせ(1次構造)によって塩基配列を認識し、塩基配列特異的にDNA分子と相互作用する。この特性から、特定の遺伝子発現を正あるいは負に制御する「スイッチ」としての応用が期待される。これまでの先行研究から、皮下移植腫瘍組織内への集積が認められるが、その仕組みは解明されていない。さらに、PIPの1次構造は疎水性度といった物性に大きく影響し、そのため当該化合物の体内動態にも影響を及ぼす可能性が示唆される。そこで、異なるピロール/イミダゾール比を持つ5種類のFITC標識PIPを合成し、その疎水性度への影響を検討した。その結果、親水性度の高いイミダゾール残基数の上昇は当該化合物の疎水性度を低下させることを見出した。次に、疎水性度の最も高い、中間、最も低い化合物を担癌マウスへ注入し、当該化合物の体内動態を検討した。すべてのPIPは腫瘍組織内に集積したが、疎水性度によってその動態は異なっていた。すなわち、疎水性の高いPIP分子は腫瘍と同様に肝臓へ集積し、疎水性度が

下がるにつれて肝臓から腎臓へと集積する臓器が変化していった(図3)。さらに、疎水性度の高いPIPは長期間体内で循環し、接種してから3週間が経過しても腫瘍部で検出された。しかし、疎水性度が低下するにしたがって腫瘍部への貯留も短縮していった。以上からPIPの一次構造は、その疎水性度に影響し、その結果として体内動態や腫瘍集積/貯留性を変化させることを見出した(Inoue *et al.*, Bioorg Med Chem 2018 掲載)

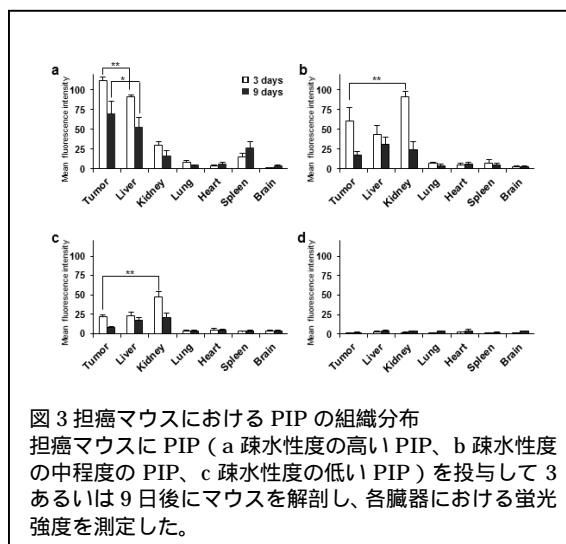


図3 担癌マウスにおける PIP の組織分布  
担癌マウスに PIP (a 疎水性度の高い PIP、b 疎水性度  
の中間の PIP、c 疎水性度の低い PIP) を投与して 3  
あるいは 9 日後にマウスを解剖し、各臓器における蛍光  
強度を測定した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Sang, M., Nakamura, M., Ogata, T., Sun, D., Shimozato, O., Nikaido, T., Ozaki, T. Impact of RUNX2 gene silencing on the gemcitabine sensitivity of p53mutated pancreatic cancer MiaPaCa2 spheres. Oncology Report, 2018, 39, 2749-2758. 査読有

Inoue Takahiro, Shimozato Osamu, Matsuo Nina, Mori Yusuke, Shinozaki Yoshinao, Lin Jason, Watanabe Takayoshi, Takatori Atsushi, Koshikawa Nobuko, Ozaki Toshinori, Nagase Hiroki Hydrophobic structure of hairpin ten-ring pyrrole-imidazole polyamides enhances tumor tissue accumulation/retention in vivo. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018, 26, 2337-2344. 査読有

Osamu Shimozato, Masashi Matsushita, Kyosuke Uchiumi, Yusuke Mori, Meijie Sang, Toshinori Ozaki. Drug resistance of cancer stem cell. BIO Clinica, 2017, 32, 53-58. 査読有

[学会発表](計8件)

下里 修、疎水性を高める1次構造はヘアピン型ピロールイミダゾールポリアミドが有する腫瘍集積性を高める。第77回日本癌学会学術集会2018年

森祐輔、下里修、早田浩明、内海京寛、井上貴博、篠崎喜脩、渡部隆義、永瀬浩喜、尾崎俊文。DNA副溝結合性化合物pyrrole-imidazole polyamideの能動輸送を介したがん細胞内移行メカニ

ズム。第26回日本癌病態治療研究会 2017年

T. Inoue, O. Shimosato, N. Matsuo, Y. Shinozaki, T. Watanabe, A. Takatori, N. Koshikawa, T. Ozaki, H. Nagase. The hydrophobicity influences the pharmacokinetic property of a DNA minor-groove binder PIP in vivo. 第76回日本癌学会学術総会 2017年。

下里 修、早田浩明、尾崎俊文。スフェア培養を用いたがん幹細胞が有する悪性形質獲得機構の解明。第16回日本再生医療学会総会 2017年

下里 修、早田浩明、尾崎俊文。Internalization of DNA minor groove binder pyrrole-imidazole polyamide into cancer cells via actin-dependent mechanism. 第75回日本癌学会学術総会 2016年

下里 修、尾崎俊文。Internalization of DNA minor groove binder pyrrole-imidazole polyamide into cancer cells via active transport machineries. International symposium for the drug-discovery of the pyrrole-imidazole polyamides as novel biomedicines. 2017年

井上貴博、下里 修、尾崎俊文。Lipophilicity is a critical determinant essential for the efficient incorporation of pyrrole-imidazole polyamides into tumor tissues. International symposium for the drug-discovery of the pyrrole-imidazole polyamides as novel biomedicines. 2017年

内海京寛、下里 修、早田浩明、尾崎俊文。スフェア形成能を有する大腸がん細胞のエピゲノム的薬剤耐性機構の解析。第25回日本癌病態治療研究会、2016年。

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：尾崎 俊文

ローマ字氏名：Toshinori Ozaki

所属研究機関名：千葉県がんセンター（研究所）

部局名：研究所・発がん研究グループ

職名：室長

研究者番号（8桁）：40260252

研究分担者氏名：早田 浩明

ローマ字氏名：Hiroaki Soda

所属研究機関名：千葉県がんセンター（研究所）

部局名：医療局・消化器外科

職名：主任医長

研究者番号（8桁）：90261940

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。