

平成30年6月8日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19348

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素JMJD2Aは切除不能胃癌の新しい治療効果予測因子である

研究課題名(英文) JMJD2A as a novel predictor for chemotherapy response in metastatic gastric cancer

研究代表者

中川 忠彦 (NAKAGAWA, Tadahiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任助教

研究者番号：40634275

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)：JMJD2Aノックダウン細胞を用いて、5-FU、cisplatin、docetaxelのIC50をWSTアッセイにより評価したところ、JMJD2Aノックダウン細胞のIC50はいずれも高まった。また、DCS療法を施行した29症例を対象に、2コース終了後の腫瘍縮小率と治療前のJMJD2Aの染色スコアを比較したところ強い相関を示した。以上の結果より、JMJD2Aはこれらの薬剤の強い感受性因子であることが示唆されるとともに、治療前の胃癌生検組織を用いてJMJD2A発現を調べることで、DCS療法の感受性を予測しうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is no appropriate predictor of chemotherapeutic treatment for metastatic gastric cancer (MGC). We have selected 15 candidate predictor genes by genome-wide association study using gastric cancer tissues of responders and non-responders to S-1, cisplatin and docetaxel (DCS) therapy. Knockdown experiments of these 15 genes with siRNA revealed that JMJD2A is the best predictor for response to these drugs. When IC50s of 5-FU, cisplatin and docetaxel in gastric cancer cell line that was knocked down by siRNA were analyzed by WST assay, they were significantly higher than those in the control cells. Subsequently, we investigated JMJD2A expression in the biopsy specimens from 29 patients with MGC before treatment by immunohistochemistry. There was a significant correlation between immunostaining score and reduction rate of the tumors evaluated after 2 courses treatment with DCS therapy. Our data strongly suggest that JMJD2A is a promising predictor of response to these drugs in MGC.

研究分野：分子生物学

キーワード：胃癌 JMJD2A 抗癌剤感受性因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃癌とDCS療法

我が国における死亡原因の第1位は癌であり、とくに胃癌、大腸癌、膵癌、食道癌などの消化器癌による死亡率が過半数を占めている。これは、世界的にも同様の傾向であり、消化器癌に対する有効な治療法の開発が求められている。

胃癌に対する化学療法は、我が国ではS-1+CDDPやS-1+docetaxel、米国では5-FU+CDDP+docetaxelなどが施行されている。これらの治療法の奏効率は50~72%であるが、その効果を予測するバイオマーカーは未だ開発されていない。従って、28~50%の無効な症例に対して化学療法を施行しているという問題点がある。また、治療が奏効している症例も、やがて耐性を獲得して無効となり予後不良な転機をたどる。つまり、消化器癌治療の新しいバイオマーカーの開発が必須であり、また耐性因子を同定して耐性克服薬を開発することが必要である。

当教室ではこれまで、切除不能進行胃癌を対象にS-1(5-FU系)+CDDP+docetaxel 3剤併用化学療法の第1相試験、2相試験を行い(Bri J Cancer, 2006, Cancer Chemother Pharmacol, 2010)、stage3症例にはneoadjuvant療法の第2相試験を行い(Cancer Chemother Pharmacol, 2013)、その高い有効性を報告した。また、治療前の生検標本を用いて、本療法の著効群と非奏効群における全ゲノム発現プロファイリングを解析し、治療効果を予測しうる29個の遺伝子を抽出した(図1)。

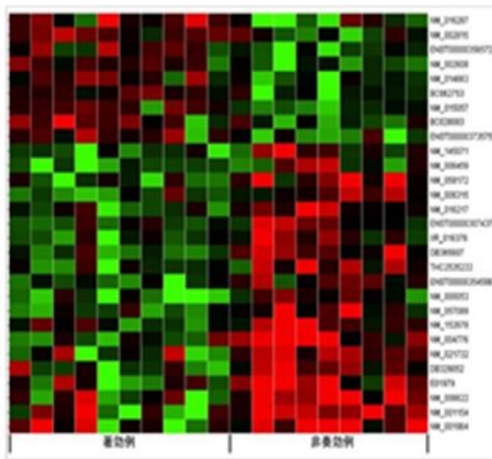


図1.胃癌に対するDCS療法の著効例及び非奏効例のmicroarray解析

(2) 切除不能進行胃癌におけるJMJD2Aの発現

申請者は予備実験として、DCS療法を施行した切除不能進行胃癌症例10例を対象に、胃癌組織における29個の遺伝子のmRNA発現

を定量的リアルタイムPCR法により確認し、発現と腫瘍縮小率との関連性を検討した。その結果、アレイ解析により感受性因子として抽出されたJMJD2A(Jumonji Domain Containing 2A)の発現と腫瘍縮小率に有意な相関が見られた。

また申請者は、preliminaryながら、JMJD2Aを含む15遺伝子を選択し、siRNAを用いて胃癌細胞株におけるこれらの遺伝子発現をノックダウンすることで、5-FU、CDDP、docetaxelの感受性や耐性の変化を検討した。その結果、JMJD2Aをノックダウンした細胞では、野生株と比較して5-FUに対する感受性が明らかに低下した。このことから、JMJD2Aは5-FUの感受性因子である可能性が考えられる。同様にDCS療法における他の薬剤(DTX, CDDP)についても検討が必要である。

以上より、DCS療法の薬剤効果にJMJD2A発現が関与することが示唆された。また、JMJD2Aはヒストン脱メチル化酵素であり、ヒストンの脱メチル化によりクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を調節する。そのため、JMJD2Aを介した他の遺伝子の発現を起因とする抗癌剤感受性(耐性)の機序が存在する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、進行胃癌におけるJMJD2Aの治療標的因子あるいは効果予測マーカーとしての有用性を立証するために、以下の検討を行う。

(1) JMJD2Aと薬剤感受性

胃癌培養細胞株のJMJD2Aノックダウン細胞(過剰発現細胞)を用いて薬剤耐性試験を行い、野生株と比較して感受性(耐性)に影響があるのかを確認する。

(2) JMJD2Aの発現と治療効果

多数のDCS療法施行の胃癌症例を対象とした胃癌組織におけるJMJD2A発現を免疫染色法により確認し、発現と治療効果(腫瘍縮小率など)との関連性を検討する。

(3) JMJD2Aの標的遺伝子の探索

mRNAマイクロアレイによって、JMJD2Aにより遺伝子発現が調節される標的遺伝子の探索を行い、標的遺伝子によるJMJD2Aを介した抗癌剤感受性の変化の機序を調べる。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株(MKN45、KATO-III、MKN74)を用いて、JMJD2Aの発現をsiRNAによりノックダウンし、5-FU、CDDP、docetaxelに対する感受性の変化を検討する。IC50の評価にはWST assayを用いる。

(2) 多数例の胃癌患者におけるJMJD2Aの発現と薬剤の治療効果(腫瘍縮小率や無増悪

生存期間 (Progression Free Survival ;PFS) など)との関係を調べる。JMJD2A の蛋白質発現の確認は免疫染色 (LSAB 法) により行う。評価は、染色スコア (染色強度 × 陽性率) を用いる。染色強度は、強陽性が2点、弱陽性が1点、陰性が0点とした。陽性率は、染色された細胞数を観察視野全体の細胞数で割った値である。

(3) JMJD2A プラスミドを作成する。JMJD2A を有する pOTB7 ベクター (RIKEN) を、BamHI、SmaI 酵素で切断し、myc-His ベクター (Invitrogen) の BamHI、PmeI サイトに挿入し、JMJD2A 発現プラスミドを作成した。

(4) MKN45 親株細胞と JMJD2A ノックダウン細胞を用いて mRNA マイクロアレイにより発現に変化のある遺伝子を解析する。マイクロアレイは SurePrint G3 Unrestricted GE 8X60K (Agilent) を使用した。解析は Gene Spring (Agilent) にて行った。

4. 研究成果

(1) MKN45 親株細胞と JMJD2A ノックダウン細胞を用いて、5-FU、cisplatin、docetaxel の IC50 を WST assay により評価したところ、JMJD2A ノックダウン細胞の IC50 は各々20倍、2.4倍、1.2倍に高まり、3つの薬剤に対する感受性がいずれも低下した。KATO-III および MKN74 においても同様の結果が得られた。

(2) DCS 療法を施行した 29 症例を対象に、2 コース終了後の腫瘍縮小率と治療前の JMJD2A の染色スコアを比較したところ強い相関を示した (図2)。染色スコアと (Progression Free Survival ;PFS)、組織型、性別には相関が見られなかった。

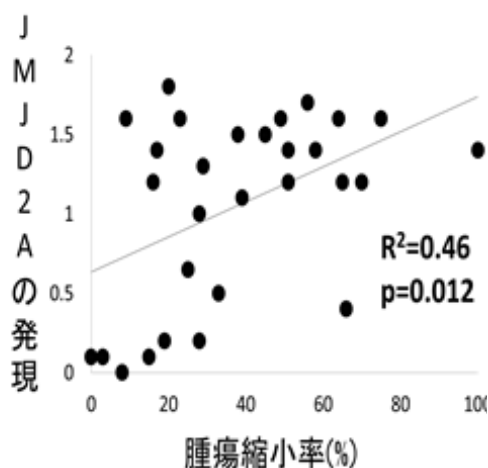


図2. JMJD2A 発現と腫瘍縮小率との相関

(3) MKN45 細胞に JMJD2A 発現プラスミドを遺伝子導入した。ウェスタンブロッティングにより、JMJD2A の高発現を確認した (図3)。これにより、JMJD2A 過剰発現細胞における実験を行うことが可能となった。

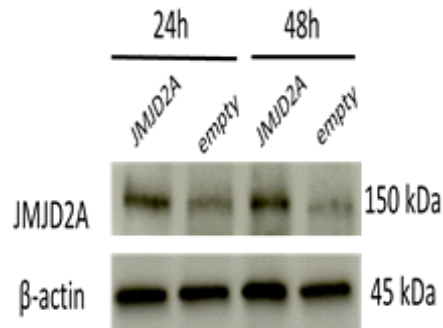


図3. JMJD2A 発現ベクターの作成と WB による発現確認

(4) マイクロアレイ解析により、JMJD2A を介して遺伝子発現が調節される標的遺伝子の探索を行い、ヒートマップを製作した (図4)。JMJD2A のノックダウンにより多くの遺伝子の発現が制御されることが明らかとなった。今後は選出された標的遺伝子について研究を行っていく。

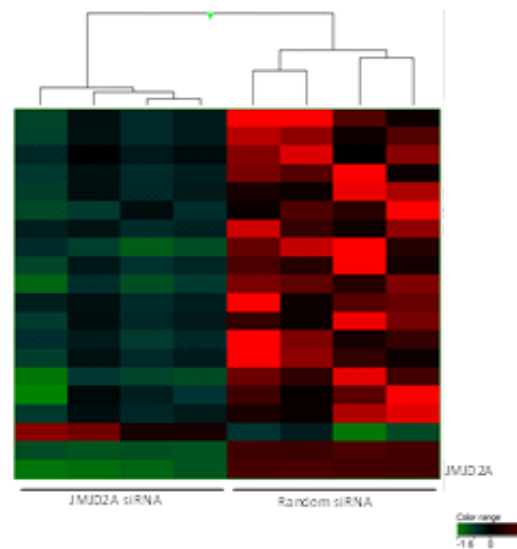


図4. JMJD2A ノックダウン細胞とコントロール細胞の遺伝子発現比較

以上の結果より、JMJD2A はこれらの薬剤の強い感受性因子であることが示唆されるとともに、治療前の胃癌生検組織を用いて JMJD2A 発現を調べることにより、DCS 療法の感受性を予測しうることが示唆された。また、JMJD2A はヒストン脱メチル化酵素であり、種々の遺伝子発現を調節している。従って、JMJD2A が直接これらの薬剤感受性に関与し

ている可能性や他の薬剤感受性遺伝子・耐性遺伝子を介して間接的にこれらの薬剤感受性に関与する可能性がある。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

中川忠彦, 棚橋俊仁, 木村哲夫, 岡本耕一, 谷口達哉, 村山典聡, 田中宏典, 坂東良美, 佐藤康史, 六車直樹, 高山哲治. ヒストン脱メチル化酵素 JMJD2A は切除不能進行胃癌において CCDC8 の発現を調節することで薬剤感受性を制御している. 第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

中川忠彦, 木村哲夫, 岡本耕一, 曾我部正弘, 宮本弘志, 坂東良美, 六車直樹, 岡久稔也, 高山哲治. ヒストン脱メチル化酵素 JMJD2A は切除不能進行胃癌における新しい治療効果予測因子である. 第75回日本癌学会学術総会, 2016年10月, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 忠彦 (NAKAGAWA, Tadahiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・特任助教
研究者番号: 40634275