

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20171

研究課題名(和文) ヒストンメチル化制御を介した卵巣がん新規治療法の確立を目指して

研究課題名(英文) Establishment of novel treatment for ovarian cancer via histone methylation control

研究代表者

榊 宏諭 (SAKAKI, HIROTSUGU)

山形大学・医学部・医員

研究者番号：80744458

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)：これまで研究者は卵巣癌幹細胞に対してGSKJ4が細胞死を誘導し、癌幹細胞性を喪失させることを報告した。その後の共同研究者との研究で、GSKJ4が非小細胞肺癌の細胞株で細胞死を誘導することを見出した。このことにより、GSKJ4の効果が癌幹細胞に特異的ではなく、癌細胞にも効果のあることが示唆された。さらにGSKJ4とシスプラチン、タキソール、メトホルミンを併用することで癌細胞に対する効果を上乘せすることを見出した。加えて、GSKJ4の作用機序として、細胞周期に影響を与え、アポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We reported that GSKJ4 induces cell death in ovarian cancer stem cells and causes cancer stem cell properties to be lost. Subsequent studies with collaborators have found that GSKJ4 induces cell death in non-small cell lung cancer cell lines. This suggested that the effect of GSKJ4 is not specific to cancer stem cells but also to cancer cells. Furthermore, it was found that by combining GSKJ4 and cisplatin, taxol, metformin, the effect on cancer cells is added. In addition, as a mechanism of action of GSKJ4, it was shown that cell cycle was induced by influencing the cell cycle and inducing apoptosis.

研究分野：婦人科癌

キーワード：GSKJ4 Histone methylation JMJD3

1. 研究開始当初の背景

近年、卵巣がんの治療抵抗性・再発の重要な要因としてがん幹細胞に注目が集まっている。これまでに申請者が所属する研究室では、卵巣がんを始めとする種々のがん幹細胞の幹細胞性制御について数々の報告を行ってきた。これらの一連の研究過程で、H3K27 のメチル化制御が卵巣がん幹細胞維持に重要な役割を果たしている可能性を見出し、ごく最近、申請者(産婦人科専門医)は H3K27 の脱メチル化酵素 JMJD3/UTX の阻害剤である GSKJ4 が卵巣がん幹細胞に対し、細胞死とがん幹細胞性(自己複製能・腫瘍創始能)喪失を誘導するという事を明らかにし、国際誌に報告するに至った。

この成果は、H3K27 のメチル化制御が卵巣がんの発生や再発に重要な役割を果たしており、GSKJ4 を始めとする脱メチル化酵素阻害薬が卵巣がん幹細胞標的治療薬の候補になり得る事を示唆している。

2. 研究の目的

この一連の研究の中で、申請者は予想外なことに通常の(=がん幹細胞ではない)卵巣がん細胞である A2780、SKOV-3 に対し、正常ヒト線維芽細胞では細胞死はおろか増殖抑制自体も来さない濃度での GSKJ4 処理が顕著な細胞死を誘導するという予備的知見を得た。この知見はすなわち H3K27 のメチル化の促進は卵巣がん幹細胞のみならず、非がん幹細胞化した細胞をも死滅させうる可能性も示している。

以上より申請者は、がん幹細胞以外の、通常のがん細胞(=非がん幹細胞)に対する GSKJ4 の効果を確認することとした。

また、これまでの検討において、細胞死誘導効果を持つ可能性は示唆されているが、その作用機序に関しては不明瞭な点が多い。これらの機序を明らかにすることも今回の研究の目標とした。

さらに、通常、実際の臨床現場においては複数種類の抗癌剤を併用するのが一般的である。そこで、現在一般的に臨床の現場で用いられている抗癌剤と GSKJ4 を用いることで相互に作用を拮抗することなく、むしろ相乗効果を生むことが期待される。本研究でもシスプラチン(CDDP)、タキソール(PTX)、さらに当研究室で以前より抗腫瘍効果を報告してきたメトホルミンと GSKJ4 の相乗効果についても検討を行った。

3. 研究の方法

通常のがん細胞として今回は非小細胞肺癌細胞株 A549、H1299 および PC9 を用いた。また、GSKJ4 が正常細胞に与える影響を調べるため、ヒト胎児肺線維芽細胞株 IMR90 を用いた。GSKJ4 の効果を確認するため、WST-8 assay およびトリパンプルーを用いた Dye exclusion assay を行った。また、細胞周期を検討するため Flow cytometry を、

Apoptosis についての検討を行うため Western blot assay を行った。また、薬剤の長期的な細胞増殖抑制効果を検討するために Colony assay を行った。

4. 研究成果

GSKJ4 の非小細胞肺癌細胞株に対する殺細胞効果の確認

まず我々は、WST-8 assay にて正常細胞に影響を与えない GSKJ4 の濃度を検討した。結果として 4 μ M であれば IMR90 の生細胞率に有意差を生じないこと確認した (Fig1A)。

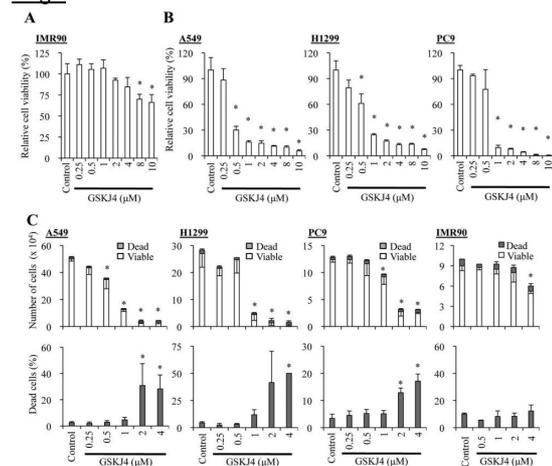
次に、非小細胞肺癌細胞株 A549、H1299、PC9 でも同様に WST-8 assay を用いて GSKJ4 の細胞増殖抑制効果を検討した。結果として、いずれも細胞株においても GSKJ4 1 μ M で有意な細胞増殖抑制効果を確認した (Fig1B)。

次に、トリパンプルーを用いた Dye exclusion assay により GSKJ4 により細胞死誘導効果を検討した。

結果として、いずれの細胞株においても GSKJ4 1 μ M で有意な細胞増殖抑制、および 2 μ M での有意な死細胞割合の増加を認めた。この濃度が、正常細胞である IMR90 の生細胞数および死細胞割合に影響を及ぼさない、つまりがん細胞特異的な効果であることも同時に確認した (Fig1C)。

以上より、GSKJ4 は正常細胞に影響を与えない濃度で、非小細胞肺癌細胞株の細胞増殖を抑制し細胞死を誘導することが示された。

Fig1



GSKJ4 による細胞死誘導の機序の解明

先の研究で、GSKJ4 によるがん幹細胞のがん幹細胞抑制作用は、DNA のトリメチル化による、がん幹細胞性を維持するための蛋白の発現が抑制されるためだと推察されていたが、細胞死の機序に関しては不明であった。そこで、Flow Cytometry を用いて、GSKJ4 投与による細胞周期の変化を検討した。

結果として、G1 期の細胞割合がいずれの非小細胞肺癌細胞株においても、GSKJ4 の濃度依存的に増加していた (Fig2A)。

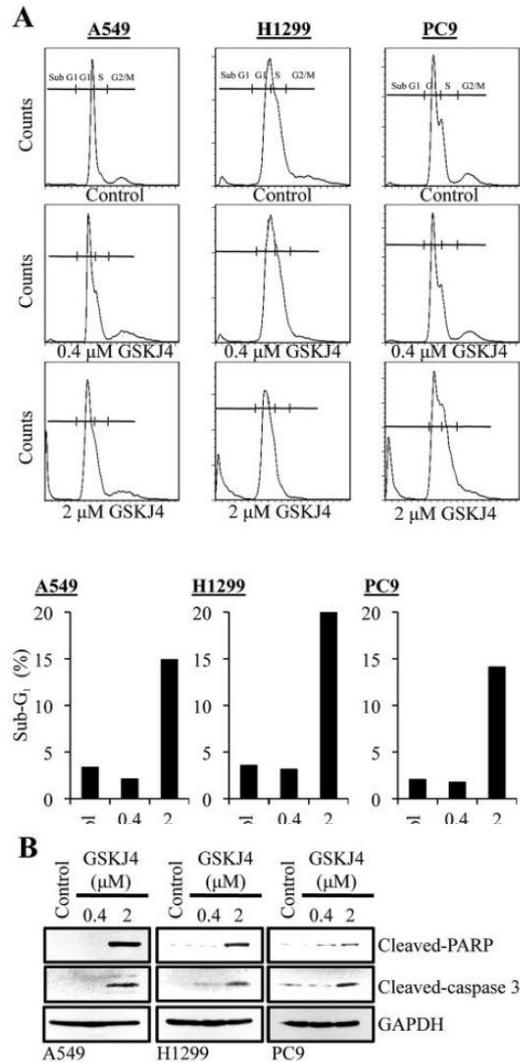
また、Apoptosis について、Western blot

法を用いて Apoptosis マーカーである Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 の発現について検討を行った。

結果として、いずれの非小細胞肺癌細胞株においても GSKJ4 においても GSKJ4 の濃度依存性に Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 は増加していた (Fig2B)。

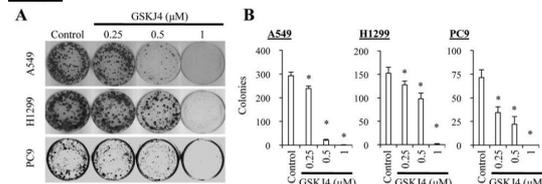
以上より、GSKJ4 の細胞死誘導の機序は、細胞周期を G1 期に留め、Apoptosis を誘導することであることが示された。

Fig2



GSKJ4 の長期的な細胞増殖抑制効果の検討

Fig3



これまでの検討ではいずれも、GSKJ4 処理後 72 時間で細胞死誘導効果および細胞増殖抑制効果の検討を行ってきた。しかし、がん再発予防という見地からは、薬剤の長期的な腫瘍細胞増殖抑制効果を検討する必要がある。

そこで Colony assay 法を用いて、GSKJ4 の非小細胞肺癌細胞株に対する、長期的な細胞増殖抑制効果を検討した。今回の検討では GSKJ4 投与後、144 時間培養を続け、非小細胞肺癌細胞株の Colony 形成数を検討した。

結果として、いずれの非小細胞肺癌細胞株においても、GSKJ4 濃度依存的に、Colony 増殖抑制を認めた。この結果から、GSKJ4 は短期的のみならず、長期的な腫瘍細胞増殖抑制効果を持つことが示された (Fig3)。

シスプラチンおよびタキソールと GSKJ4 の併用効果の検討

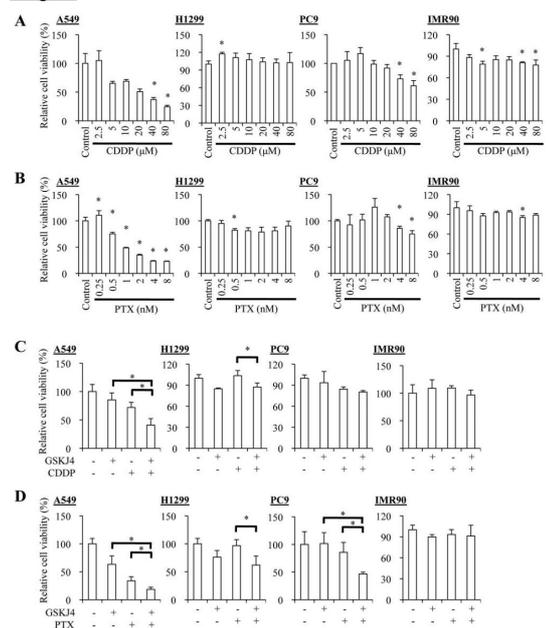
次に、非小細胞肺癌の治療として臨床の現場において頻用されている抗癌剤の中で、今回はシスプラチンおよびタキソールと GSKJ4 との併用効果について検討した。方法として、シスプラチン、タキソールおよび GSKJ4 それぞれ単剤とシスプラチン+GSKJ4 およびタキソール+GSKJ4 との細胞増殖抑制効果を WST-8 assay で検討した。

結果として、いずれの非小細胞肺癌細胞株においても、シスプラチンおよびタキソールと GSKJ4 は各々単剤で用いた場合よりも併用した場合の方が、細胞増殖抑制効果をより強く発揮していた。

以上のことから、GSKJ4 はシスプラチンおよびタキソールと併用した場合、効果を阻害することなく上乘せ効果を発揮することが示された (Fig4)。

加えて、それらの濃度は IMR90 の細胞増殖には影響を与えないことから、GSKJ4 とシスプラチン、GSKJ4 とタキソールの組み合わせのいずれもがん細胞特異的な効果であることも併せて示された。

Fig4



メトホルミンと GSKJ4 の併用効果の検討
当教室では、以前より糖尿病治療薬であるメトホルミンががん幹細胞および通常ののが

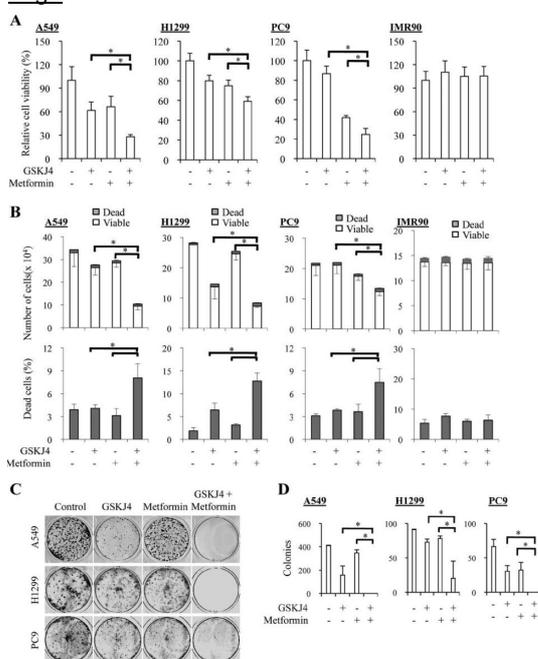
ん細胞に対して、がん細胞能を喪わせ、細胞死を誘導することを報告してきた。そこで、このメトホルミンとGSKJ4の併用効果についても検討を行った。

結果として、WST-8 assay およびトリパンブルーを用いたDye exclusion assayのいずれにおいても、正常細胞IMR90に影響を与えない濃度のGSKJ4およびメトホルミンの単剤及びその組み合わせにおいて、いずれの非小細胞肺癌細胞株でも、GSKJ4およびメトホルミン単剤と比較して、GSKJ4とメトホルミン併用群で有意に生細胞数の減少および死細胞率の増加を認めた(Fig5A, B)。

さらにColony assayを用いて長期的な細胞増殖抑制効果を検討したが、やはり先ほどの検討と同様に、GSKJ4およびメトホルミン単剤群と比較し、併用群で有意なColony数の低下を認めた(Fig5C)。

以上より、GSKJ4はメトホルミンと併用することによりその効果を阻害することなく、短期および長期的な細胞増殖抑制効果および細胞死誘導効果が上乗せすることが示された。

Fig5



以上のことより、GSKJ4はがん幹細胞のみならず、少なくとも非小細胞肺癌においては通常のがん細胞に対しても抗腫瘍効果を有しており、また、その効果は実際の臨床で用いられている抗がん剤であるシスプラチンおよびタキソールの効果を阻害することなく上乗せ効果があり、また、当教室がこれまでに抗腫瘍効果を報告してきたメトホルミンとも併用効果があることが示された。

5. 主な発表論文

(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1件)

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 (査読あり)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊 宏諭 (SAKAKI Hirotugu)

山形大学医学部 医員

研究者番号: 80744458