

令和元年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15958

研究課題名(和文)c-Relを標的とした新規膵癌治療の開発

研究課題名(英文)Development of novel pancreatic cancer treatment targeting c-Rel

研究代表者

吉田 真誠 (YOSHIDA, MAKOTO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70561025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子NF- κ Bのサブユニットの1つであるc-Relが癌細胞の生存や増殖に関与していることは知られている。我々はc-Relは低酸素環境で誘導されるHIF-1の標的遺伝子であり、低酸素環境において、誘導されることを発見した。しかし、c-Rel阻害ががん細胞阻害につながるかは不明であった。そこで、今回、新規c-Rel inhibitorであるIT-901を用いて、c-Rel阻害が低酸素環境下で膵癌細胞の増殖や、上皮間葉転換、幹細胞様性質を抑制させることで抗腫瘍効果を検討し、c-Rel阻害が低酸素環境でこれらの効果を有することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌に対する新たな作用機序を有する抗癌治療が期待される中、我々は転写因子NF- κ Bのサブユニットであるc-Relに注目した。我々はc-RelがHIF-1の標的遺伝子であり、がん組織などの低酸素環境において、誘導されることを発見したが、c-Rel阻害ががん細胞阻害につながるかは不明であった。そこで、新規c-Rel inhibitorであるIT-901を用いて、c-Rel阻害が低酸素環境下で抗腫瘍効果を有するかどうかを検討し、c-Rel阻害が低酸素環境でこれらの効果を有することがわかった。今後、膵癌に対して新たな作用機序を有する治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is known that c-Rel, one of the subunits of transcription factor NF- κ B, is involved in the survival and growth of cancer cells. We found that c-Rel is a target gene of HIF-1 and induced in hypoxic environment, but it was unclear whether c-Rel inhibition would lead to cancer cell inhibition. In this time, we showed IT-901, c-Rel inhibition compound, suppresses the proliferation of pancreatic cancer cells, epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like properties in a hypoxic environment. It turned out that c-Rel inhibition has these anti-tumor effects in hypoxic environment.

研究分野：膵癌

キーワード：c-Rel 膵癌 HIF-1 NF- κ B IT-901

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

1. 研究開始当初の背景

切除不能膵癌に対する抗がん剤の成績は MST 約 6~11 ヶ月と十分でなく、新たな作用機序の薬物の登場が望まれている。HIF-1 は低酸素環境下で誘導される因子であり、十分な酸素が供給されない癌組織内では低酸素状態が生じるため、HIF-1 が活性化し、低酸素下での細胞生存に関与していると報告されている(Harris AL, et al. Nat Rev Cancer 2002)。また、NF-kB は転写因子であり、サブユニット RelA/p65, RelB, c-Rel, p50/p105 そして p52/p100 からなるファミリーを形成し、様々な働きを有している。HIF-1 はNF-kBを活性化することが知られているが、報告されてきたのは主に RelA であり、c-Rel と HIF-1 との関連性を示す報告はなかった。HIF-1 の標的遺伝子である ANKRD37 が見出され(Yair Benitua, et al. Nucleic Acids Res. 2009)、申請者は ANKRD37 KO マウスを作成することで HIF-1 は ANKRD37 を介して c-Rel を誘導することを見出した(投稿中)。これまで低酸素環境下での HIF-1 と c-Rel との関連性はこれまで知られておらず、膵癌細胞株を使用して検討することとした。

2. 研究の目的

申請者は膵癌細胞株で、転写因子 NF-kB のサブユニットの1つである c-Rel が HIF-1 の標的遺伝子であり、低酸素下における膵癌の生存や増殖に関与している事を最近見出した(投稿中)。c-Rel は通常酸素環境下で、癌細胞の epithelial-mesenchymal transition (EMT)、幹細胞様性質(stem-like features)を誘導することが報告されているが低酸素中の検討はない。また、NF-kB は positive feedback として HIF-1 の活性化に関与しているとの報告があるが、癌細胞内での詳細な検討はない。今回、新規 c-Rel inhibitor である IT-901 を用いて、c-Rel 阻害が低酸素下で膵癌細胞の増殖や、EMT、幹細胞様性質を抑制させることで抗腫瘍効果を検討し新たな膵癌治療の開発を目的とする。また腫瘍細胞内での HIF-1 の下流因子に関して網羅的に解析する。

3. 研究の方法

以下に従い、評価検討した。

<in vitro>

- (1) 各膵癌細胞株における c-Rel 発現の評価
- (2) IT-901 による c-Rel 抑制能の評価
- (3) IT-901 処理後のアポトーシスアッセイ
- (4) IT-901 処理後の EMT の抑制効果の検討
- (5) IT-901 処理後の幹細胞性質抑制効果の検討
- (6) IT-901 による膵癌細胞株に対する増殖能抑制の検討
- (7) 最適な抗癌剤の検討
- (8) 抗癌剤処理でのアポトーシス、抗腫瘍効果の検討

<in vivo>

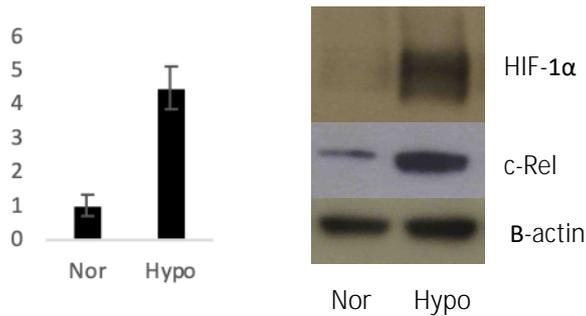
- (9) 担癌マウスでの癌組織内の低酸素領域含有の確認
- (10) 担癌マウスに対する IT-901 の効果の検討
- (11) 担癌マウスに対する IT-901 併用抗癌剤投与の効果の検討

(12) IT-901 投与における有害事象の検討

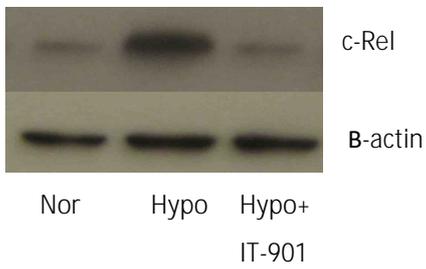
(13) IT-901 未投与と投与したモデルにおいて、腫瘍細胞内の HIF-1 α , その下流因子をマイクロアレイ, RNA sequence を用いて網羅的解析を行う。

4 . 研究成果

(1) 膵癌細胞株 BxPC-3, Mia-PaCa2, ASPC-1 細胞株において、低酸素培養において、c-Rel の発現を認めた。(BxPC-3 の結果のみ示す)



(2) IT-901 は 8.0 μ mol/L で最も c-Rel 抑制効果を認めた。

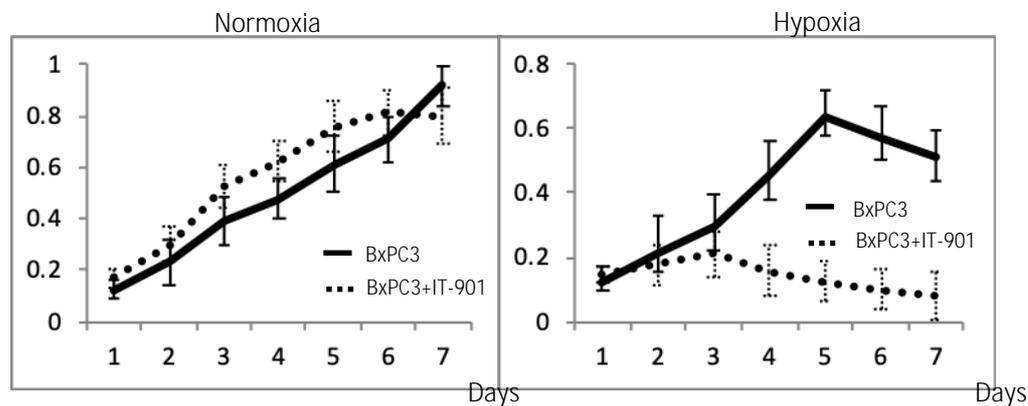


(3) 低酸素下での IT-901 未処理に比較し、IT-901 処理で膵癌細胞株のアポトーシスが亢進することをアポトーシスアッセイで確認した。

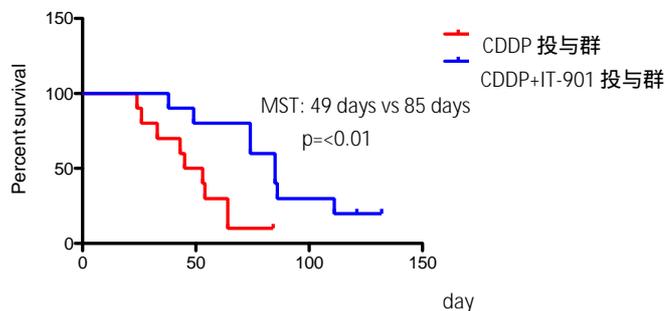
(4) IT-901 処理後の低酸素下での EMT の抑制効果を EMT のマーカーである Slug や Vimentin の発現がウェスタン プロットで低下することで確認した。

(5) IT-901 処理後の低酸素下での幹細胞性抑制効果をフローサイトメトリーで ALDH1 の発現が IT-901 処理前と比較し、低下することで確認した。

(6) BxPC-3 細胞に IT-901 処理をすると、Normoxia では増殖能に差は認められなかったが、Hypoxia においては、IT-901 処理で増殖能は低下した、



- (7) シスプラチン, SN38, 5-FU, ゲムシタピンで細胞増殖能を検討し, ゲムシタピン以外は概ね良好な増殖抑制効果を認めた.
- (8) シスプラチン, SN38 で IT-901 処理と非処理とで低酸素下でアポトーシスアッセイと細胞増殖アッセイやコロニー形成アッセイを行い, アポトーシス誘導と抗腫瘍効果に有意差を認めた.
- (9) 膵癌細胞株の皮下の担癌マウスを用いて, 癌組織内の低酸素領域含有の確認を CA-9 による免疫染色を行うことで確認した. また, 同組織内の HIF-1 や c-ReI の発現を免疫染色や q-PCR, ウェスタンブロットで認めた.
- (10) IT-901 を 5%グルコースを用いて希釈し, 尾静脈投与を行った. その上で膵癌の担癌マウスにおいて IT-901 の効果の検討を行ったが, 皮下モデル, 同所モデルともに IT-901 投与なし群とあり群とで腫瘍効果に差を認めなかった.
- (11) そのため, シスプラチンを既報の方法(Yoshida M, et al. PLoS One 2012)を用いて, IT-901 追加群は追加なし群とを同所モデルで比較し, 腫瘍縮小効果と生存期間の延長を認めた.



- (12) 有害事象は現在, 全例の結果が出ておらず, まだ正確な頻度や項目は不明である.
- (13) マイロアレイなどは未提出である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。