

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：25201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07942

研究課題名(和文) JMJD2Aは進行胃癌においてエピジェネティック調節により薬剤感受性を制御する

研究課題名(英文) JMJD2A is associated with drug sensitivity through epigenetic regulation in metastatic gastric cancer

研究代表者

中川 忠彦 (NAKAGAWA, Tadahiko)

島根県立大学・看護栄養学部・助教

研究者番号：40634275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、進行胃癌に対するdocetaxelおよびcisplatin、S-1(DCS)の3剤併用療法の治療効果を予測しうるJMJD2Aについて検討を行った。胃癌培養細胞株の親株細胞とJMJD2Aノックダウン細胞を用いて網羅的遺伝子解析を行ったところ、ノックダウン細胞ではプロアポトーシス遺伝子であるCCDC8の発現が著しく低下した。そして、CCDC8のノックダウンにより胃癌細胞株がDCSに対して耐性化した。また、免疫沈降法によりJMJD2AはCCDC8と複合体を形成することも明らかとなった。JMJD2AはCCDC8の発現の密接な調節を介して薬剤感受性に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、docetaxelおよびcisplatin、S-1に対する耐性や感受性を規定する遺伝子として、JMJD2AおよびCCDC8が同定された。JMJD2AおよびCCDC8による新しい個別化医療に繋がる。また、これらを治療標的とした耐性克服薬の開発にも繋がる。さらに、他の癌種においても、JMJD2AおよびCCDC8を含む候補遺伝子がバイオマーカーや耐性因子として機能している可能性があり、患者への負担の少ないオーダーメイド医療への実現に繋がるだけでなく、耐性の克服を標的とした新薬の開発に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：Jumonji domain-containing protein 2A (JMJD2A), histone lysine demethylases, has been implicated in tumorigenesis. However, its expression profile and role in drug resistance in gastric cancer (GC) remains unknown. Here, we investigated the role of JMJD2A in chemotherapeutic susceptibility and its clinical relevance in GC. A whole-gene expression array of JMJD2A-knockdown GC cells demonstrated a significant decrease in coiled-coil domain containing 8 (CCDC8), a downstream target of JMJD2A. Direct interaction between CCDC8 and JMJD2A was verified using immunoprecipitation. Inhibition of CCDC8 restored drug resistance to docetaxel, cisplatin, and S-1. Our results indicate that JMJD2A is a novel epigenetic factor of chemotherapeutic susceptibility in GC, and JMJD2A/CCDC8 is a potential therapeutic target.

研究分野：分子生物学、分子栄養学

キーワード：胃癌 薬剤感受性 エピジェネティック調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。現在、第3相試験を行っている。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、治療効果を予測する29個の遺伝子を抽出したことを報告した (Oncology, 2017)。

(2) 申請者は、DCS療法を施行した切除不能進行胃癌症例29例を対象に、胃癌組織におけるJMJD2A蛋白質の発現を免疫染色により確認し、発現レベル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。

(3) 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。そこで申請者は、JMJD2AをsiRNAによりノックダウンした細胞とコントロール細胞(random siRNA添加)をGene expression arrayにより網羅的に解析した。この解析結果からJMJD2Aが制御する標的遺伝子として10個を抽出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、JMJD2Aによるヒストン脱メチル化を介した標的遺伝子の発現制御の機序を明らかにすること、JMJD2Aおよび標的遺伝子のバイオマーカーとしての有用性を立証すること、JMJD2Aおよび標的遺伝子の治療ターゲットへの可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) JMJD2Aが制御する標的遺伝子の発現確認

Gene expression arrayにより抽出されたJMJD2Aが制御する標的遺伝子のパリエーションを以下のように行う。JMJD2Aの発現をsiRNAによりノックダウンし、JMJD2A標的遺伝子(CCDC8、TXLNB、SPATA21)の発現をTaqman PCR及びWestern blot法により確認する。JMJD2Aが各標的遺伝子の発現を調節することを検討する。

(2) 培養細胞を用いたJMJD2Aの感受性因子としての意義の検討

複数の胃癌細胞株を用いて抗癌剤感受性因子としての意義を明らかにする。胃癌細胞株(MKN45、NUGC-4、KATO-III)を用いて、siRNAによるJMJD2Aノックダウン細胞およびコントロール細胞(ネガティブコントロールsiRNAトランスフェクション)に種々の濃度の5-FU、CDDPまたはdocetaxelを加えて培養し、WST assayによりIC50を算出し感受性の変化を検討する。また、JMJD2A発現ベクターを遺伝子導入したJMJD2A過剰発現細胞およびコントロール細胞(empty vectorトランスフェクション)においても前述と同様に感受性の変化を検討する。

(3) JMJD2Aの発現の変化によるヒストンメチル化状態の解明

ヒストンH3K9の高メチル化状態では、クロマチン構造が凝集し、転写因子が接触できず、遺伝子発現が低下する。一方、ヒストンH3K9の低メチル化状態では、クロマチン構造が緩み、転写因子が接触でき、遺伝子発現が上昇する。このようにヒストンH3K9のメチル化状態により遺伝子の発現が制御される。胃癌培養細胞株(MKN45、NUGC-4)を用いて、JMJD2Aノックダウン細胞およびJMJD2A過剰発現細胞、コントロール細胞におけるヒストンH3K9のメチル化状態を調べる。ウエスタンブロッティング法により、トリメチル化あるいはジメチル化のヒストンH3K9を認識する抗体を用いて、その発現の増減を確認する。

(4) JMJD2A 標的遺伝子 (CCDC8) の薬剤感受性への影響の検討

JMJD2A の標的遺伝子である CCDC8 発現を siRNA によりノックダウンし、Taqman PCR により mRNA 発現を、Western blot 法により蛋白質発現を確認する。胃癌培養細胞株を用いて、CCDC8 ノックダウン細胞およびコントロール細胞に種々の濃度の 5-FU, CDDP または docetaxel を加えて培養し、WST assay により IC50 を算出し感受性の変化を検討する。

(5) JMJD2A および標的遺伝子の蛋白質相互作用の検討

胃癌培養細胞株 (MKN45) を用いて免疫沈降法を行う。まず初めに、抗原を含む溶液 (MKN45 細胞の溶解液) に JMJD2A 抗体を添加し、溶液中で抗原-抗体複合体を形成させる。次いで、ビーズに固相化した protein A を添加し、抗原-抗体複合体をビーズに吸着させる。そして、ビーズをよく洗浄した後、ビーズから抗原を溶出する。

4 . 研究成果

(1) JMJD2A ノックダウン条件下では、CCDC8 および TXLNB、SPATA21 の mRNA および蛋白質の発現量が減少した。

(2) JMJD2A をノックダウンした場合は、胃癌培養細胞株 (MKN45 および NUGC-45) において 5-FU, CDDP または docetaxel いずれの薬剤に対しても耐性が大きく上昇した。一方、JMJD2A を過剰発現した場合は、胃癌培養細胞株 (MKN45 および KATO-III) において各薬剤に対する感受性に大きな変化は見られなかった。

(3) JMJD2A はヒストン脱メチル化酵素であり、ヒストン H3K9 のトリメチル状態をジメチル状態にする。胃癌培養細胞株では、JMJD2A をノックダウンすることにより、トリメチル化ヒストン H3K9 の発現は増加し、ジメチル化ヒストン H3K9 は減少した。一方、JMJD2A を過剰発現することにより、トリメチル化ヒストン H3K9 の発現は減少し、ジメチル化ヒストン H3K9 は増加した。

(4) CCDC8 ノックダウンにより 5-FU および CDDP、docetaxel の各薬剤においても耐性が上昇した。特に docetaxel に対して顕著な変化を示した。

(5) JMJD2A 抗体を用いて免疫沈降により溶出した液に対して、ウエスタンブロッティング法により、CCDC8 抗体を反応させたところ、CCDC8 の発現が確認された。この結果から、JMJD2A は CCDC8 と複合体を形成することが明らかとなった。

以上の結果より、JMJD2A はヒストン脱メチル化によるエピジェネティック制御と、複合体を形成することによる直接的な相互作用により、CCDC8 の発現調節を介して薬剤感受性に関与していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa T, Sato Y, Tanahashi T, Mitsui Y, Kida Y, Fujino Y, Hirata M, Kitamura S, Miyamoto H, Okamoto K, Muguruma N, Bando Y, Takayama T	4. 巻 3
2. 論文標題 MJD2A sensitizes gastric cancer to chemotherapy by cooperating with CCDC8	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 426-436
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-019-01024-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 康史, 棚橋 俊仁, 中川 忠彦, 北村 晋志, 宮本 弘志, 岡本 耕一, 六車 直樹, 高山 哲治
2. 発表標題 JMJD2A ヒストン脱メチル化酵素はCCDC8と協調し胃癌に対する化学療法感受性を制御する
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 康史, 棚橋 俊仁, 中川 忠彦, 北村 晋志, 宮本 弘志, 岡本 耕一, 六車 直樹, 高山 哲治
2. 発表標題 JMJD2A histone demethylase sensitizes gastric cancer to chemotherapy by cooperating with CCDC8
3. 学会等名 第92回胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasushi Sato, Tadahiko Nakagawa, Toshihito Tanahashi, Sinji Kitamura, Hiroshi Miyamoto, Kouichi Okamoto, Naoki Muguruma, Tetsuji Takayama
2. 発表標題 JMJD2A is a novel epigenetic factor of chemotherapeutic susceptibility in gastric cancer
3. 学会等名 ESMO congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 忠彦, 棚橋 俊仁, 宮本 佳彦, 岡崎 潤, 武原 正典, 村山 典聡, 三好 人正, 谷口 達哉, 坂東 良美, 岡本 耕一, 佐藤 康史, 六車 直樹, 高山 哲治
2. 発表標題 JMJD2A (KDM4A) は切除不能進行胃癌においてCCDC8を介して抗癌剤感受性を制御する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 忠彦, 棚橋 俊仁, 宮本 佳彦, 岡崎 潤, 三好 人正, 岡本 耕一, 曾我部 正弘, 宮本 弘志, 坂東 良美, 佐藤 康史, 六車 直樹, 岡久 稔也, 高山 哲治
2. 発表標題 JMJD2A (KDM4A) は切除不能進行胃癌においてCCDC8の発現調節を介して抗癌剤感受性を制御する
3. 学会等名 第37回Cytoprotection研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川 忠彦, 棚橋 俊仁, 宮本 佳彦, 武原 正典, 村山 典聡, 田中 宏典, 三好 人正, 谷口 達哉, 坂東 良美, 岡本 耕一, 佐藤 康史, 六車 直樹, 高山 哲治
2. 発表標題 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の発現調節を介して抗癌剤感受性を制御する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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	高山 哲治 (TAKAYAMA Tetsuji) (10284994)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐藤 康史 (SATO Yasushi) (80343383)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関