

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16363

研究課題名（和文）Dcl1k1に注目した大腸癌新規治療の開発-5FUとDcl1k1阻害薬の併用療法-

研究課題名（英文）Development of new therapy for colorectal cancer focusing on Dcl1k1 -Combined treatment with 5FU and Dcl1k1 inhibitor-

研究代表者

竹本 圭宏 (TAKEMOTO, Yoshihiro)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50622213

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： Dcl1k1は癌幹細胞マーカーとして知られており、これまでに膀胱癌においてGEMとDcl1k1阻害剤であるLRRKの併用処理は、Chk1のリン酸化の抑制を介して、S期で細胞周期を停止させることなく、細胞周期を進行させ、細胞傷害性効果を増強させることを明らかにした。本研究では大腸癌細胞株を用いて行い、5-FUとLRRKの併用処理は5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させ、S期での細胞周期の停止を解除した。また5-FUとLRRKの併用処理によりアポトーシスは誘導されなかったが、5-FU、LRRK単剤に比べ、細胞生存率は減少する傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dcl1k1は大腸癌の癌幹細胞マーカーの候補として注目されるようになり、その他の癌種でも研究が進められている。現在は癌幹細胞マーカーだけではなく、発癌や転移 に関しても重要な役割を果たしている。Dcl1k1阻害薬もLRRK-IN-1やXMD92など様々な薬剤が存在し、それらを用いた抗腫瘍効果も動物実験レベルで報告されている。臨床では、大腸癌、膀胱癌、乳癌などの予後不良因子になり得るという報告があるが、治療標的としての研究はまだ進んでいない。本研究は大腸癌に対する化学療法を中心に位置する5-FUの効果を高めるため、Dcl1k1阻害薬を併用する研究であり、今後の大腸癌治療の進歩に貢献できると思われる。

研究成果の概要（英文）：Background/aim: The aim of the present study was to explore the cytotoxic effects of 5-FU, in combination with inhibition of Dcl1k1, a tumor stem cell marker that regulates pro-survival signaling in colorectal cancer cells, in the human colon cancer cell line, COLO-320. Materials and methods: The effects of 5-FU treatment plus Dcl1k1 inhibition on the phosphorylation of Chk1, cell cycle, DNA damage, apoptosis, and cell survival in COLO-320 cells were evaluated. Results: Combined treatment with 5-FU and a Dcl1k1 inhibitor, LRRK, decreased 5-FU-induced phosphorylation of Chk1 and canceled 5-FU-induced cell-cycle arrest at the S phase. Combined treatment with 5-FU and LRRK failed to induce poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) cleavage, but tended to decrease cell survival compared to individual treatment with 5-FU or LRRK. Conclusion: These results indicate that a combination of 5-FU and LRRK may be an effective, novel approach for colorectal cancer therapy.

研究分野：消化器外科

キーワード：Dcl1k1 大腸癌 5-FU Chk1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年大腸癌における外科治療および化学療法は目覚ましく進歩しており、早期癌においては良好な成績が得られているが、進行癌においては未だ再発率は高く、治療の改善が求められている。我々は大腸癌の癌幹細胞マーカーとして知られている Dcl1 に注目し、既存の抗癌剤である 5-FU と Dcl1 阻害薬を併用し、DNA 障害チェックポイント蛋白質である p-Chk1 の発現を制御することでより強い抗腫瘍効果が得られると考えている。我々の先行研究では、膀胱癌に対してゲムシタピンに加え Dcl1 阻害薬を併用投与し、pChk1 発現の制御を介して、より強い抗腫瘍効果が得られることが明らかになった。大腸癌において、既存の抗癌剤と Dcl1 阻害薬との併用効果に関する報告はこれまでになされておらず、本研究によって多くの大腸癌患者の予後を改善することが期待される。

2. 研究の目的

ヒト結腸直腸癌細胞株である COLO-320 において Chk1 のリン酸化、細胞周期、DNA 損傷、アポトーシス、および細胞生存に対する 5-FU、Dcl1 阻害剤単剤、5-FU と Dcl1 阻害剤との併用による細胞傷害性効果を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

使用した細胞株と培地: ヒト結腸直腸癌細胞株である COLO-320 を理研パイオリソースセンター (Tsukuba, Japan) から購入した。COLO-320 細胞は 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地を用いて、5% CO₂ を含む 37°C の加湿加温器内で培養された。

試薬: 5-Fluorouracil (5-FU) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入され、DMSO で溶解後、4°C で保管された。LRRK2-IN-1 (LRRK) は、ChemScene (Monmouth Junction, New Jersey, USA) から購入され、DMSO で溶解後、-80°C で保管された。

ウェスタンブロット解析: COLO-320 細胞は、コントロール (DMSO)、5-FU (10 μM)、LRRK (50 μM) 単剤、または 5-FU (10 μM) と LRRK (50 μM) の併用で 24 時間あるいは 48 時間処理された。1:1000 に希釈された目的蛋白質に対する 1 次抗体で 4°C にて一晩反応させ、メンブレンを TBST で洗浄後、1:5000 に希釈された 2 次抗体で室温にて 1 時間反応させた。本研究で用いた 1 次抗体は、抗 DCAMKL1 抗体 (Abgent, San Diego, CA, USA)、抗 Phospho-Chk1 (S317) 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、抗 Chk1 抗体 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 PARP-1 (F-2) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗 -チューブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology) であり、2 次抗体は、マウスおよびウサギ免疫グロブリンを認識する horseradish peroxidase (HRP) で標識されたヤギポリクローナル抗体 (Dako, Glostrup, Denmark) であった。

フローサイトメトリー解析: 細胞周期の G₀ / G₁ 期で COLO-320 細胞を同調させるために、10% FBS を含む RPMI1640 培地を無血清 RPMI1640 培地に置換した。24 時間の血清飢餓後に、無血清 RPMI1640 培地をコントロール (DMSO)、5-FU (10 μM)、LRRK (50 μM) 単剤、または 5-FU (10 μM) と LRRK (50 μM) を含む RPMI1640 10% FBS 培地に置換した。48 時間培養した後、細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水で再懸濁し、140 × g にて 5 分間遠心分離して細胞を分離した。70% エタノールで懸濁し、-20°C、60 分間固定した。固定された細胞を Cell Staining Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA) で洗浄し、細胞を propidium iodide (PI) / RNase (Immunostep, Salamanca, Spain) および FITC で標識された抗 H2A.X Phospho (Ser139) 抗体 (Biolegend) で反応させ、BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。

生細胞アッセイ: COLO-320 細胞を 96-well のプレートに 1×10^4 個 / 100 μl / well の細胞密度で播いた。24 時

間培養した後、COLO-320細胞は、DMSO、5-FU(2 μ M)、LRRK(20 μ M)単剤、または5-FU(2 μ M)とLRRK(20 μ M)の併用で48時間処理された。Cell Count Reagent SF(Nacalai Tesque)を加えて、4時間インキュベーションし、450nmでの吸光度をiMarkマイクロプレートリーダー(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)で測定した。

統計解析: 統計解析にはJMP Pro 13.1.0 software(SAS Institute Inc.)を使用した。群間の差異はTukey's testで評価した。 P 値 < 0.05を統計学的に有意差ありとした。

4. 研究成果

5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させた。

5-FUとDcl1阻害剤であるLRRKとの併用処理が、5-FU処理により誘導されるChk1のリン酸化を減少させるかどうかを調べるために、COLO-320細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK単剤、または5-FUとLRRKの併用で24時間処理し、ウェスタンブロットング解析を行った。COLO-320細胞において、5-FU処理はコントロールと比較して、Chk1のリン酸化を有意に誘導した(図1AおよびB)。5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU単剤処理と比較して、5-FU誘導性のChk1のリン酸化を有意に減少させた(図1AおよびB)。Dcl1の発現はコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK単剤、5-FUとLRRKの併用処理において同様に検出された(図1A)。

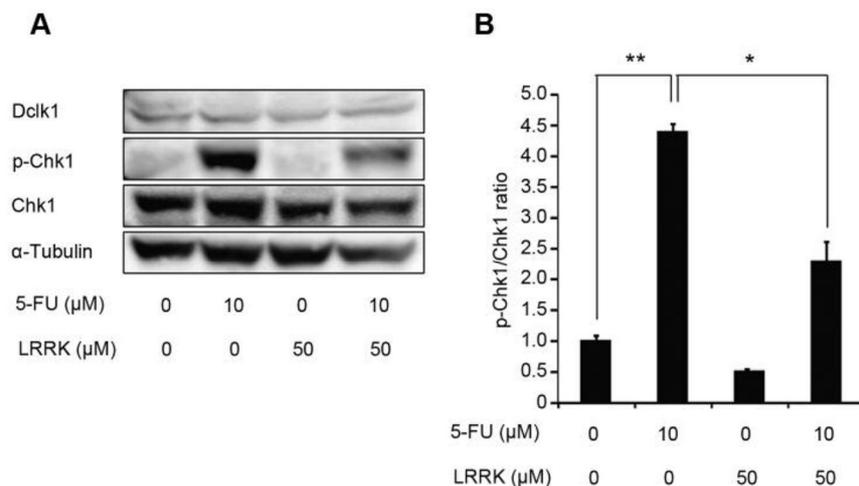


図 1. Chk1 のリン酸化に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響 (A) コントロール(DMSO)、5-FU(10 μ M)、LRRK(50 μ M)単剤、または 5-FU(10 μ M)と LRRK(50 μ M)の併用で24時間処理された COLO-320 細胞から蛋白質抽出液を作製し、Dcl1、p-Chk1、Chk1、 α -チューブリンの発現をウェスタンブロットング解析により検出した。 α -チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(B) ImageJ ソフトウェアを用いて各バンドの発色強度を定量した。コントロールにおける Chk1 の発現量に対する p-Chk1 の発現量比を基準とした。各々の棒グラフは、3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を表している。*, P < 0.05; **, P < 0.01; N.S., 有意差なし。

5-FUとLRRKの併用処理は、5-FU誘導性の細胞周期の停止を解除した。

細胞周期の進行に対する5-FU、LRRK単剤、5-FUとLRRKの併用による影響を調べるために、フローサイトメトリー解析を行った。COLO-320細胞を24時間、血清飢餓状態にして、G0/G1期に同調させ、次に、無血清RPMI1640培地をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK単剤、または5-FUとLRRKを含むRPMI1640 10%FBS培地に置換した。48時間培養した後、細胞周期およびDNA損傷解析を行った。5-FU単剤処理は、S期での細胞周期の停止を誘導し、LRRK単剤処理はコントロールと比較してG2/M期における細胞の割合を増加させた(図2、上部パネル)。注目すべきことに、5-FUとLRRKの併

用処理は、5-FU 誘導性の S 期での細胞周期の停止を解除した(図 2、上部パネル)。さらに、DNA 損傷マーカーとして、 γ -H2A ヒストンファミリーメンバー X (γ -H2AX) 陽性細胞の割合を調べたところ、 γ -H2AX 陽性細胞の割合は、コントロールと比較して 5-FU 単剤処理後に増加したが、LRRK 単剤処理後にはほとんど変化しなかった(図 2、下部パネル)。予想に反して、5-FU 単剤処理と比較して、5-FU と LRRK の併用処理後は γ -H2AX 陽性細胞の割合が減少した(図 2、下部パネル)。

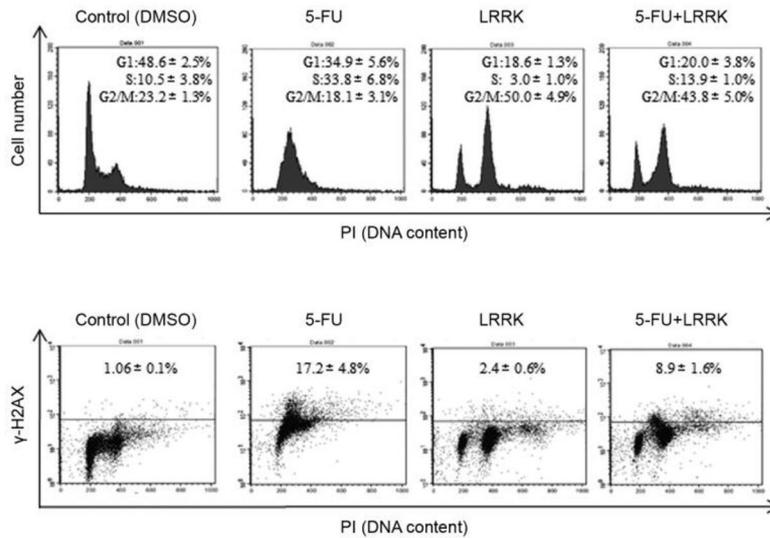


図 2. 細胞周期および DNA 損傷に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響

24 時間の血清飢餓の後、COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU (10 μ M)、LRRK (50 μ M) 単剤、または 5-FU (10 μ M) と LRRK (50 μ M) の併用で 48 時間処理し、FACS 解析を行った。横軸はヨウ化プロピディウム (PI) 染色強度を示す。縦軸は細胞数 (上部パネル)、 γ -H2AX の発現レベル (下部パネル) を示す。 γ -H2AX 陽性細胞は、DMSO で処理された COLO-320 細胞における γ -H2AX 陽性細胞の割合が約 1% となるラインを基準として決定された。各上部パネルおよび下部パネルの数値は、各々、各細胞周期における細胞の割合および γ -H2AX 陽性細胞の割合を表している。数値は 3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を示す。

5-FU と LRRK の併用では、poly(ADP-ribose) polymerase1 (PARP-1) の切断が誘導されなかった。

アポトーシスに対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用による影響を調べるために、COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用で 48 時間処理した後、ウェスタンブロッティング解析を行った。5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK による単剤処理と比較して、PARP-1 切断を誘導しなかった(図 3A および B)。

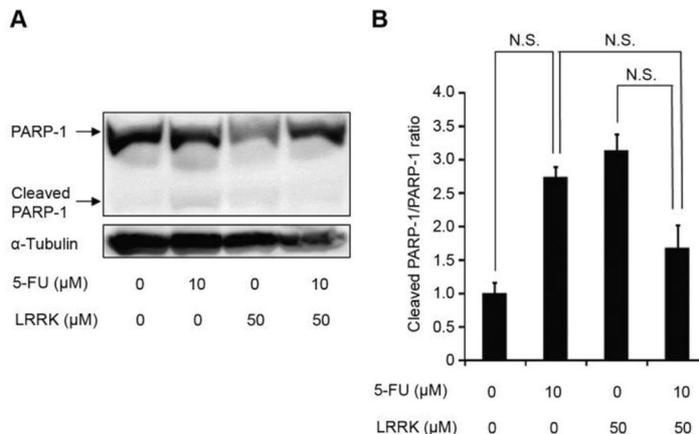


図 3. PARP-1 切断に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響 (A)コントロール(DMSO)、5-FU(10 μ M)、LRRK(50 μ M)単剤、または 5-FU(10 μ M)と LRRK(50 μ M)の併用で 48 時間処理された COLO-320 細胞から蛋白質抽出液を作製し、PARP-1、切断型 PARP-1、 α -チューブリンの発現をウェスタンブロットング解析により検出した。 α -チューブリンをローディングコントロールとして使用した。(B)ImageJ ソフトウェアを用いて各バンドの発色強度を定量した。コントロールにおける PARP-1 の発現量に対する切断型 PARP-1 の発現量比を基準とした。各々の棒グラフは、3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を表している。N.S., 有意差なし。

5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK による単剤処理と比較して COLO-320 細胞の生存率を減少させる傾向があった。

細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、または 5-FU と LRRK の併用による影響を調べるために、COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU、LRRK 単剤、または 5-FU と LRRK の併用で 48 時間処理した後、生細胞アッセイを行った。5-FU および LRRK の濃度(各々 2 μ M および 20 μ M)は、5-FU または LRRK 単剤処理で 70-80%の細胞生存率を示した濃度に基づいて決定された。細胞生存率は、コントロールと比較して、5-FU(2 μ M)または LRRK(20 μ M)での単剤処理後に有意に減少し、5-FU と LRRK の併用処理は、5-FU または LRRK の単剤処理と比較して細胞生存率を減少させる傾向があった(図 4)。

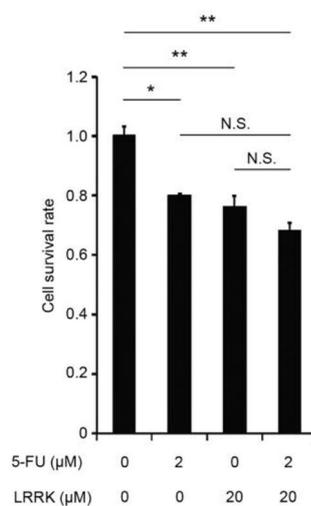


図 4. 細胞生存に対する 5-FU、LRRK 単剤、5-FU と LRRK の併用処理による影響

COLO-320 細胞をコントロール(DMSO)、5-FU(2 μ M)、LRRK(20 μ M)単剤、または 5-FU(2 μ M)と LRRK(20 μ M)の併用で 48 時間処理し、生細胞アッセイを行った。コントロールにおける細胞生存率を基準とした。各々の棒グラフは、3 回の実験での平均値 \pm 標準偏差を表している。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; N.S., 有意差なし。

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 1件）

1. 著者名 Yuki Suehiro, Yoshihiro Takemoto, Arata Nishimoto, Koji Ueno, Bungo Shirasawa, Toshiki Tanaka, Naruji Kugimiya, Atsushi Suga, Eijiro Harada, Kimikazu Hamano	4. 巻 38
2. 論文標題 Dclk1 Inhibition Cancels 5-FU-induced Cell-cycle Arrest and Decreases Cell Survival in Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 6225-6230.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12977.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuki Suehiro, Yoshihiro Takemoto, Arata Nishimoto, Koji Ueno, Bungo Shirasawa, Toshiki Tanaka, Naruji Kugimiya, Atsushi Suga, Eijiro Harada and Kimikazu Hamano
2. 発表標題 Combined cytotoxic effect of Dclk1 inhibition and 5-FU in human colon cancer cell line
3. 学会等名 日本消化器外科学会
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
---------------------------	-----------------------	----