

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16754

研究課題名(和文) JNKシグナル抑制が卵巣癌幹細胞代謝に与える影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of JNK signal suppression on ovarian cancer stem cell metabolism

研究代表者

神 宏諭 (SAKAKI, HIROTSUGU)

山形大学・医学部・客員研究員

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)：卵巣がん細胞株と卵巣がん幹細胞株においてメタボローム解析を行い両細胞株での細胞内代謝経路の違いから治療標的を検討する予定であったが、メタボローム解析を行っても有意な細胞内代謝経路を同定するに至らなかった。そのため、研究方針を変更し、メタボローム解析の際に使用したJNK阻害薬をさらに検討することとした。これまでに報告の無かったJNK阻害薬としてCEP1347に着目した。CEP1347はこれまでに報告のあったJNK阻害薬同様、卵巣がん幹細胞のがん幹細胞性を抑制し、さらに既存の抗がん剤であるタキソールに対する治療抵抗性を改善することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は以前から様々な癌種において治療抵抗性や転移・播種、再発の原因として報告されていた。一方、卵巣がんは婦人科がんの中でも抗がん剤など既存の治療方法に対する治療抵抗性が高いこと、播種や転移、再発が多いため予後不良な疾患として知られている。そして卵巣がんにも前述のがん幹細胞が存在していることが多数報告されていた。

このことから本研究により卵巣がん幹細胞を標的とした治療法が確立されることで、卵巣がんの治療抵抗性や転移・播種、再発を防ぐことができ、結果として卵巣がん患者の予後を改善することが期待されている。

研究成果の概要(英文)：In the original plane, I planned to perform a metabolomic analysis of ovarian cancer cells and ovarian cancer stem cells to clarify the differences in intracellular metabolic pathways between the two cells and to search for therapeutic targets. However, even when I performed metabolome analysis, I could not identify the intracellular metabolic pathways that would be the therapeutic target.

Therefore, we decided to change the research plane and investigate the JNK inhibitors used in the metabolome analysis. I focused on CEP1347 as a JNK inhibitor that had not been reported so far. I found that CEP1347 suppress the capacity of cancer stem cell property of ovarian cancer stem cells, and further improve the resistance to Paclitaxel as well as the previously reported JNK inhibitors.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：がん幹細胞 卵巣癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行卵巢癌では可及的腫瘍減量術とそれに引き続く化学療法が標準的治療として確立されている。しかしながら、初回治療が奏功した症例でも約8割が5年以内に再発を来し、かつ、再発時には多くの症例が薬剤耐性を示すようになり、卵巢癌治療において再発予防と薬剤耐性の克服は大きな課題となっている。再発と薬剤耐性の原因として卵巢がん幹細胞の存在が報告され<sup>1)</sup>、卵巢がんの再発予防や薬剤耐性克服のため卵巢がん幹細胞を標的とした治療が注目されている。

申請者は、これまでに Jun amino-terminal kinase (JNK) 経路が卵巢がん幹細胞における自己複製能および腫瘍創始能などのがん幹細胞性の維持に必要不可欠であり、JNK 阻害薬によってがん幹細胞性が喪失することを報告したが、その詳細な機序は明らかにされていない。

近年、酵素などによって作り出された細胞内の低分子化合物群(メタボローム)が注目されるようになり、がんに対する治療標的として注目されている。代謝産物は細胞内シグナルの最終産物であるためその阻害剤は従来のシグナル阻害作用を持つ分子標的薬とは異なり、何らかの代償機構が働くことが少ないため通常薬剤耐性であるがん幹細胞に対して殺細胞効果が高いと予想される。卵巢がん幹細胞に対する有効な治療は未だなく、JNK 経路とその代謝経路・代謝産物に着目し、卵巢がん幹細胞に対する新規治療を確立することは、卵巢癌の再発予防と薬剤耐性克服につながり、卵巢癌患者の予後を著しく改善する可能性がある。

研究開始当初は卵巢がん幹細胞と卵巢がん細胞のメタボローム解析を行い、両細胞間の細胞内代謝経路の違いから治療標的を探す予定であったが、メタボローム解析では卵巢がん幹細胞に対する治療標的として有効な細胞内代謝経路の同定には至らなかった。

そこで、がん幹細胞性の維持に必要不可欠である JNK 経路阻害剤を drug repositioning の観点から卵巢癌治療の臨床応用につなげる研究を行う方針とした。これまでの研究では JNK 阻害薬である SP600125 ががん幹細胞のがん幹細胞性や腫瘍創始能を抑制し、既存の抗がん剤の治療抵抗性を改善することを報告してきた<sup>2) 3)</sup>。しかし、SP600125 はヒトに対する安全性の情報が存在しないため早期の臨床応用は困難と考えられた。そこで着目したのが CEP1347 である。CEP1347 は JNK そのものの阻害薬ではないが、JNK 経路上流に位置する MLK3 に対して阻害作用を有することが報告されている。また、CEP1347 はパーキンソン病に対する治療薬として臨床試験が既に Phase2/3 試験が行われており、ヒトに対する安全性の情報が存在している。そこで drug repositioning の観点から CEP1347 を卵巢がん幹細胞に対する治療薬として有効であるか否かを検討することとした。CEP1347 による卵巢がん幹細胞に対する治療効果が証明された場合、卵巢癌の再発および薬剤抵抗性を克服できる新規治療薬となり得る可能性がある。

### 2. 研究の目的

- (1) MLK3 阻害剤である CEP1347 が正常細胞に対して副作用なく投与可能な濃度を明らかにする。
- (2) CEP1347 が JNK 経路阻害作用を持ち、卵巢がん幹細胞の幹細胞性を抑制することが可能であるか否かを明らかにする。
- (3) CEP1347 が卵巢がん幹細胞における薬剤抵抗性を改善することが可能であるか否かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) CEP1347 が正常細胞に与える影響についての検討：IMR90(ヒト胎児由来肺線維芽細胞株)を用いた。IMR90 に CEP1347 (300, 400 nM) を単剤投与または、CEP1347 (300, 400 nM) と paclitaxel (2, 5 nM) を併用投与し、細胞増殖能と細胞死誘導に対する影響を、トリパンブルーを用いた色素排除法で生細胞(viable cells)と死細胞(dead cells)をカウントして検討した。
- (2) CEP1347 が JNK 経路に与える影響についての検討：細胞株としては卵巢がん細胞株 A2780 から樹立した卵巢がん幹細胞株である A2780CSC を用いた。A2780CSC に CEP1347 を投与し、JNK 経路に与える影響を、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した。
- (3) CEP1347 と卵巢がん幹細胞のがん幹細胞性に与える影響についての検討：がん幹細胞性の指標としては幹細胞マーカーの発現や Sphere 形成能で比較した。A2780CSC に CEP1347 を投与し、幹細胞マーカーの発現の変化をウエスタンブロッティング法で検討した。Sphere 形成能については Sphere formation assay で検討した。
- (4) CEP1347 が卵巢がん幹細胞における paclitaxel 感受性に与える影響の検討：A2780CSC に CEP1347 および paclitaxel を単剤または CEP1347 と paclitaxel を併用投与し、細胞死に与える影響を PI-Hoechst を用いた cell death assay で検討した。

### 4. 研究成果

- (1) CEP1347 および paclitaxel の正常細胞(IMR90)に対する影響の検討  
CEP1347 および paclitaxel が正常細胞に与える影響について検討を行った。ヒト胎児正常

肺線維芽細胞(IMR90)に CEP1347 を単剤投与または CEP1347 と paclitaxel の併用投与を行ったところ、CEP1347 は 400 nM までコントロール(薬剤非投与細胞)と比較して生細胞(viable cells)数の減少と死細胞(dead cells)の割合の上昇に有意差を認めなかったが、CEP1347 と paclitaxel の併用投与では、CEP 300 nM と paclitaxel は 2 nM までの投与ではコントロール比較し、生細胞(viable cells)数の減少と死細胞(dead cells)の割合の上昇に有意差を認めなかった(図1)。この結果から以降の実験で、CEP1347 は 400 nM、CEP1347 と paclitaxel の併用ではそれぞれ 300 nM と 2nM の範囲内で検討を行うこととした。

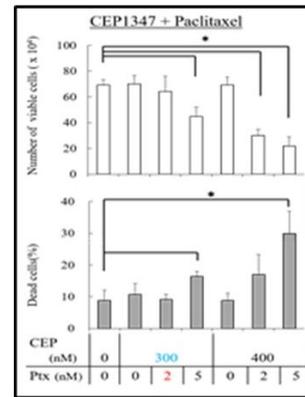


図1. CEP1347, paclitaxelの正常細胞に対する影響

(2) CEP1347 が卵巣がん幹細胞の JNK 経路に与える影響の検討

CEP1347 は JNK 経路上流に位置する MLK3 に対して阻害作用を有することが報告されている。CEP1347 が卵巣がん幹細胞において JNK 経路を抑制するかを検討した。卵巣がん幹細胞である A2780CSC に CEP (200 nM) を 3 日または 6 日間投与したところ、コントロール(薬剤非投与細胞)と比較して MLK3, JNK1/3, JNK2 経路と JNK の活性型である phospho-JNK の発現が抑制された(図2)。この結果から CEP1347 は卵巣がん幹細胞においても JNK 経路を抑制することが確認された。

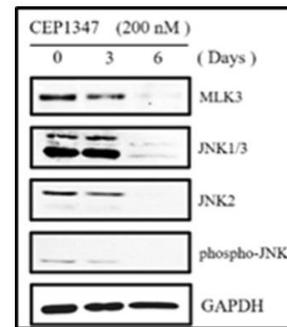


図2. CEP1347のJNK経路に対する影響

(3) CEP1347 が卵巣がん幹細胞の自己複製能に与える影響についての検討

CEP1347 が卵巣がん幹細胞の自己複製能に与える影響について検討を行った。がん幹細胞の自己複製能の確認するため幹細胞マーカー( Sox2, Bmi1, Nanog, C-myc )の発現と、Sphere 形成能を用いた。

CEP1347 (200 nM) を 3 日または 6 日間、卵巣がん幹細胞 A2780CSC に投与し、幹細胞マーカー発現をウエスタンブロット法で検討したところ、CEP1347 を 6 日間投与することでコントロール(薬剤非投与細胞)と比較してすべての幹細胞マーカーの発現が抑制された(図3)。

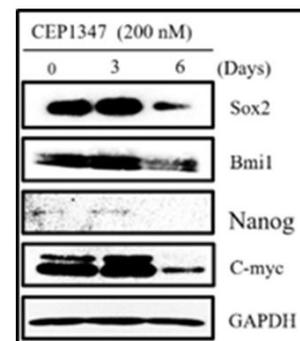


図3. CEP1347の幹細胞マーカー発現に対する影響

さらに、卵巣がん幹細胞 A2780CSC を CEP1347 で 3 日間処理し Sphere 数をカウントしたところ、CEP1347 処理群でコントロール(薬剤非投与)と比較して Sphere 形成が有意に抑制されていた(図4)。

これらの結果から CEP1347 は卵巣がん幹細胞における自己複製能が抑制する作用があることが示唆された。

(4) CEP1347 と paclitaxel 併用による卵巣がん幹細胞における paclitaxel 感受性に対する影響についての検討

卵巣がん幹細胞において CEP1347 が paclitaxel 感受性に対して与える影響についての検討を行った。A2780CSC に PBS (コントロール) CEP1347、paclitaxel をそれぞれ単剤投与または CEP と paclitaxel を併用投与し、PI-Hoechst 染色法で死細胞数をカウントして細胞死誘導作用について比較したところ、CEP および paclitaxel 単剤投与群と比較して CEP と paclitaxel 併用群では有意に細胞死が増強していた(図5)。この結果から、CEP1347 は卵巣がん幹細胞における paclitaxel 感受性を増強し、卵巣がん幹細胞の薬剤抵抗性が改善する可能性が示唆された。

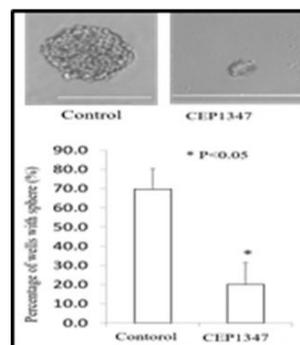


図4. CEP1347のSphere形成能に対する影響

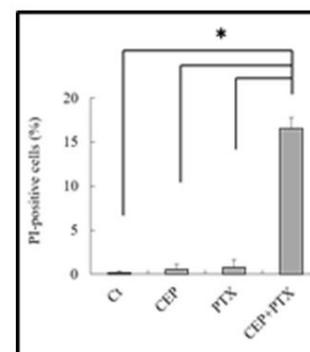


図5. CEP1347と paclitaxel の併用効果についての検討

(5) 本研究のまとめと課題

本研究では、パーキンソン病ですでに臨床応用されている CEP1347 が drug repositioning の観点から卵巣がん幹細胞を標的とした治療薬として有効であるか否かを検討した。卵巣がん幹細胞 A2780CSC を用いた *in vitro* での検討では、CEP1347 が JNK 経路を阻害することで、卵巣がん幹細胞の自己複製能を抑制し、paclitaxel に対する薬剤感受性を増強し、卵巣がん幹細胞の薬剤抵抗性を改善させる可能性があることが示唆された。一方で、がん幹細胞性のもう一つの特徴である腫瘍創始能の検討といった *in vivo* レベルでの検討は行われていないため、将来の臨床応用という点で CEP1347 の卵巣癌患者に対する効果の検討は不十分である。今後ヌードマウスを用いた腫瘍移植実験などのさらに検討を行うことで、CEP1347 が卵巣がん幹細胞を標的とし、卵巣癌の再発および薬剤抵抗性を克服できる新規治療薬となり得る可能性がある。

< 引用文献 >

- 1) Mi Jeong Kwon, et al. Regulation of Ovarian Cancer Stem Cells or Tumor-Initiating Cells. *Int J Mol Sci.* Mar 25;14(4):6624-48. 2013
- 2) Manabu S, et al. Requirement of JNK Signaling for Self-Renewal and Tumor-Initiating Capacity of Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Res.* Sep;34(9):4723-31. 2014
- 3) Manabu S, et al. Time-staggered Inhibition of JNK Effectively Sensitizes Chemoresistant Ovarian Cancer Cells to Cisplatin and Paclitaxel. *Oncol Rep.* Jan;35(1):593-601. 2016

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〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|