

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19571

研究課題名(和文)化学療法抵抗性獲得機序におけるDGK 高発現の意義の解明とその制御法の開発研究

研究課題名(英文)Elucidation of the significance of high expression of DGK α in the mechanism of resistance to chemotherapy and development of its control method

研究代表者

武富 紹信(Taketomi, Akinobu)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：70363364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに脂質キナーゼ分子であるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK) の阻害は、がん細胞に対する抗アポトーシスの抑制による作用と、腫瘍免疫の賦活を介した作用の二方向からの抗腫瘍効果が期待される治療薬となり得ることが報告されてきた。今回、がん細胞に対する抗がん剤処理時、もしくは抗がん剤の耐性ががん細胞においてDGK の発現が上昇しており、それらを阻害することで既存の抗がん剤治療への上乗せ効果、さらには抗がん剤耐性となった消化器がんへの治療効果の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の死亡原因第一位である、がん疾患の撲滅は社会的にも非常に重要な課題である。本研究の遂行により、消化器がんでの抗がん剤耐性とDGK との関連が示され、その阻害による既存の治療への上乗せ効果のみならず、治療抵抗性となった抗がん剤耐性患者への既存治療薬での治療効果が期待できる。すなわち、最終的に本研究は既存の方法では制御困難な消化器がんに対する新しい治療戦略の一つとして、より効果の高いがん治療の確立に寄与でき、その意義は極めて高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Diacylglycerol kinase (DGK), a lipid kinase family, involves in the anti-cancer drug-resistance. DGK plays pivotal roles by anti-apoptotic action in cancer cells, and by suppression of anti-tumor immune system mainly in T cells. This study demonstrated that the expression of DGK was increased not only in cancer cells treated by the anticancer drug, but also in chemo-resistant cancer cells. Therefore, selective inhibition of DGK function has the potential of therapeutic effect on chemo-resistant refractory cancer as well as additional effect to the traditional anticancer drug treatment.

研究分野：肝がん、消化器外科

キーワード：DGK 抗がん剤耐性 消化器がん Cisplatin

1. 研究開始当初の背景

本邦での疾患別死亡者数第一位は 1981 年以降悪性新生物である。近年、がんに関する様々な分子の同定や機能の解明が進められ、より精度・感度の高い診断法や分子標的薬を使用し、有効な治療法が発展してきているものの全ての患者救済には未だ至ってはいない。その中で抗がん剤を用いた化学療法はがん治療における first line となっているが、多くの固形腫瘍では期待通りの効果をあげられていない。その理由の一つが、当初効果を示していた治療に抵抗性を示し、がん細胞が抗がん剤耐性を獲得していくことにある。したがって、がん治療の発展のためにその耐性獲得メカニズムを解明していくことが求められている。

ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、膜脂質シグナルを制御するタンパクとして様々な機能が報告されている。申請者らが注目し研究を進めてきた DGK α は、がんの増殖・抗アポトーシスに関わることや、T 細胞の受容体刺激を減弱しアナジー状態を誘導することが報告されている。これまで申請者は DGK α が肝がんにおいて MAP キナーゼ経路の上流に深く関係していることを報告している (Takeishi K, Taketomi A, et al. J Hepatol 2012)。また最新の研究で、肝がん細胞株に対し抗がん剤処理することにより DGK α の発現が増加することを発見 (未発表データ) し、新たな抗がん剤耐性の機序解明に繋がる可能性が示唆された。

これらの知見、情報から、DGK α を阻害することにより、抗がん剤耐性のがん細胞自身の腫瘍形成の抑制、および T 細胞活性化による宿主抗腫瘍免疫の賦活化といった二方向からの抗腫瘍効果が予想され、新規がん治療の標的として非常に期待できると考えた (図 1)。

そこで本研究において、担がん環境下における DGK α と腫瘍形成と抗がん剤耐性能獲得に関する詳細な作用メカニズムとその制御因子を明らかにし、標準治療では制御困難な消化器がんを対象とした、既存の方法とは全く異なる新しいアプローチによる、より精度・効果の高いがん治療システムの確立に貢献する科学的エビデンスを蓄積する挑戦的な研究を展開する本構想に至った。

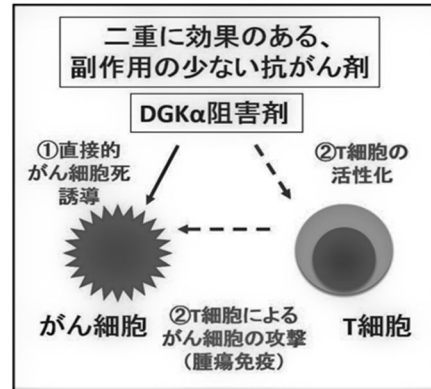


図1. DGK α 阻害による二方向からの抗腫瘍効果

2. 研究の目的

本研究において、がん細胞の抗がん剤耐性獲得機構における DGK α の役割を明らかにするとともに、担がん生体内において、DGK α の腫瘍形成に及ぼす作用メカニズムとその下流・関連因子を探索・同定することにより、標準治療では十分な治療効果が認められない消化器がんを制御することを目的とした。得られた情報・知見をもとに、消化器がんを対象とし、DGK α を標的とした既存の方法とは全く異なる新しい視点からの画期的な次世代型のがん治療法開発に貢献する科学的エビデンスの蓄積を目指した。

3. 研究の方法

- (1) 抗がん剤処理による DGK α 発現上昇の確認
数種類の抗がん剤で各種がん細胞株を一定時間処理した後、DGK α 遺伝子・蛋白質の発現レベルの変動を RT-PCR、ウェスタンブロットで精査した。また、Cisplatin 処理により作成された Cisplatin 耐性肝がん細胞株での DGK α 発現レベルを確認した。
- (2) MTT アッセイによる DGK α 阻害剤と抗がん剤併用による抗腫瘍効果の確認
MTT アッセイを用いて、(1)での DGK α が発現上昇する組み合わせにおいて効果的な抗腫瘍効果を認める抗がん剤・がん細胞を検証した。
- (3) マウス担がんモデルでの DGK α 阻害剤と抗がん剤併用実験
胃がん細胞株を移入したヌードマウス皮内移植マウスモデルにおいて抗がん剤 (Cisplatin 週 2 回腹腔内投与) DGK α 阻害剤 (連日経口投与) を組み合わせて投与し (各群 5 匹ずつ 4 群計 20 匹) 移入後 3 週間腫瘍体積を計測して併用効果を検証した。
- (4) マイクロアレイ解析による DGK α 下流関連分子の探索
(1)での DGK α 発現上昇した抗がん剤処理条件でマイクロアレイ解析を行い、DGK α 下流関連分子を検索した。

4. 研究成果

我々はこれまで、肝がんにおける DGK α の活性阻害による抗腫瘍免疫の賦活を介した抗腫瘍効

果を検討してきた。その結果、担がんマウスモデルにおいて DGK α の阻害により、腫瘍の縮小効果と生存の延長を確認し、DGK α の阻害は肝がんに対する抗腫瘍効果を示すことができた。さらにその過程で、腫瘍細胞の抗がん剤処理により DGK α の遺伝子発現レベルが上昇することを確認し、抗がん剤耐性機構との関連が示唆されたため、引き続き下記のような実験を行った。

(1) 抗がん剤処理による DGK α 発現上昇の確認

各種ヒト消化器がん細胞株において代表的な抗がん剤の二つである Gemcitabine と Cisplatin で処理することで DGK α の遺伝子レベル・蛋白レベルの変動を確認したところ、肝がんを中心として各種消化器がんにおける抗がん剤処理による DGK α 発現増加を確認した。特に肝がんと胃がん細胞株において、Gemcitabine と Cisplatin 処理において遺伝子レベルで DGK α 発現が大きく増加し(図2)、蛋白レベルでの発現上昇も主に肝がん・胃がん細胞株と Cisplatin の組み合わせにおいて確認できた(図3)。

また、肝がん細胞株に Cisplatin 処理を繰り返して作成した Cisplatin 耐性株と野生株で DGK α の定常状態での蛋白発現レベルを比較したところ、肝がん Cisplatin 耐性株では DGK α が野生株よりも高発現していることも見出した。

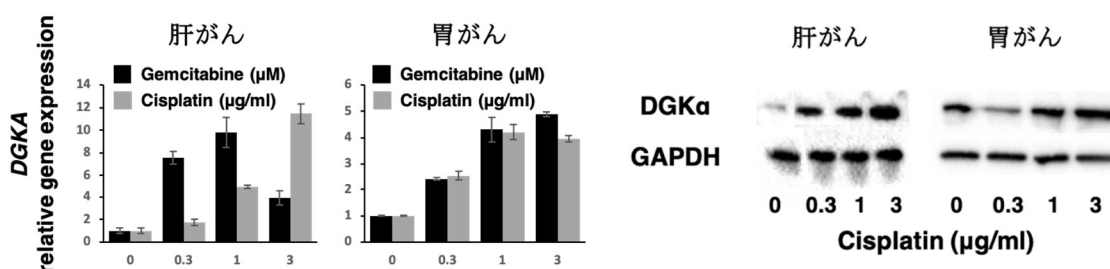


図2. GemcitabineとCisplatin処理によるDGK α 遺伝子発現レベル 図3. Cisplatin処理によるDGK α 蛋白発現レベル

(2) MTT アッセイによる DGK α 阻害剤と抗がん剤併用による抗腫瘍効果の確認

さらに上記抗がん剤処理時に DGK α 発現が上昇する組み合わせの中で Cisplatin 投与において DGK α 阻害剤併用時に、最大 23%の抗腫瘍効果の追加効果が示され、特に肝がん・胃がん細胞株での効果が強く現れた。

(3) マウス担がんモデルでの DGK α 阻害剤と抗がん剤併用実験

胃がん細胞株を移入したヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいても、Cisplatin と DGK α 阻害剤それぞれ単剤での抗腫瘍効果は少ないが、併用時には強い抗腫瘍効果を確認することができた。

(4) マイクロアレイ解析による DGK α 下流関連分子の探索

実験(1)で変動の大きかった肝がん細胞株への Cisplatin 処理時と野生株から抽出した mRNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、DGK α 下流関連分子を検索したが、抗がん剤耐性とつながる有力な遺伝子群を検出することはできなかった。今後、臨床検体での Cisplatin 耐性株などから再度関連候補遺伝子を検索していくことが必要と考えられた。

これらの結果から、既存の化学療法で治療不十分な消化器がんや抗がん剤耐性腫瘍に対する新規治療標的として DGK α の制御が有効である可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Yamaki Atsumi, Akiyama Rino, Murakami Chiaki, Takao Saki, Murakami Yuki, Mizuno Satoru, Takahashi Daisuke, Kado Sayaka, Taketomi Akinobu, Shirai Yasuhito, Goto Kaoru, Sakane Fumio | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Diacylglycerol kinase selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry | 6. 最初と最後の頁 10043 ~ 10056 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.28288 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Fujiyoshi Sunao, Honda Shohei, Minato Masashi, Ara Momoko, Suzuki Hiromu, Hiyama Eiso, Taketomi Akinobu | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Hypermethylation of CSF3R is a novel cisplatin resistance marker and predictor of response to postoperative chemotherapy in hepatoblastoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Hepatology Research | 6. 最初と最後の頁 598 ~ 606 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13479 | 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 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Naoki Okada, Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura, Hideki Yokoo, Toshiya Kamiyama, Akinobu Taketomi |
| 2. 発表標題 Diacylglycerol kinase alpha inhibitor exerts bifunctional antitumor effects |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoki Okada, Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura, Akinobu Taketomi |
| 2. 発表標題 Inhibition of diacylglycerol kinase alpha augments anti-tumor effector T cells in tumor-bearing host. |
| 3. 学会等名 2019 Gastrointestinal Cancers Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡田尚樹、武富紹信、杉山昂、北村秀光、坂根郁夫 |
| 2. 発表標題 Diacylglycerol kinase 阻害による腫瘍免疫を介した肝がん治療効果の検討 |
| 3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Naoki Okada, Akinobu Taketomi, Ko Sugiyama, Hidemitsu Kitamura |
| 2. 発表標題 Inhibition of diacylglycerol kinase alpha activates anti-tumor effector T cells in tumor-bearing host |
| 3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ko Sugiyama, Shunsuke Shichi, Naoki Okada, Hidemitsu Kitamura, Akinobu Taketomi |
| 2. 発表標題 Inhibition of diacylglycerol kinase alpha augments efficacy of anticancer drugs against cancer cells |
| 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 杉山昂、北村秀光、志智俊介、岡田尚樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 新規治療標的Diacylglycerol kinase 阻害と制癌剤投与併用効果の検証 |
| 3. 学会等名 第53回制癌剤適応研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉山昂、北村秀光、志智俊介、岡田尚樹、武富紹信 |
| 2. 発表標題 Diacylglycerol kinase alpha阻害は抗がん剤投与による抗腫瘍効果を増強する |
| 3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 | 北村 秀光 (Kitamura Hidemitsu) (40360531) | 北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授 (10101) | |