

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591959

研究課題名（和文）

DAP キナーゼ関連分子の発現制御による抗癌剤多剤耐性克服癌治療法の確立

研究課題名（英文）

**Multidrug-resistance of cancer cells and their recovery by regulating expressions of DAP kinase-related molecules**

研究代表者：田中 哲二 (TANAKA TETSUJI)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80275255

研究成果の概要（和文）：

Death-associated Protein Kinase(DAPK)発現制御による抗癌剤多剤耐性克服法について、以下の研究成果を得た。

(1) DAPK ノックダウンによる抗癌剤感受性制御解析：

- ① 子宮内膜癌細胞の DAPK ノックダウンは、Fas/TRAIL シグナルを増強し、癌細胞をアポトーシスに導くことを証明した。
  - ② 抗癌剤無効の子宮癌肉腫細胞、子宮平滑筋肉腫細胞にも、DAPK ノックダウンがアポトーシスを誘発できることを証明した。
  - ③ DAPK ノックダウンは、子宮内膜癌細胞株の 5FU 感受性を亢進したが、VP16 感受性には影響せず、CDDP 感受性を部分的に改善した。しかし、5FU 耐性株の 5FU 感受性は回復しなかった。
- (2) 脱メチル化処理による DAPK 発現制御が、特定の抗癌剤感受性を回復することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

This study was performed to investigate a possibility of anticancer molecular targeting therapy of Death-associated Protein Kinase (DAPK).

(1) DAPK knockdown regulated anticancer drug-sensitivities of cancer cells. i) Targeted DAPK knockdown by DAPK-specific siRNA transfections enhanced the Fas/TRAIL-mediated apoptotic susceptibility in human endometrial adenocarcinoma cells. These results indicate that DAP kinase can be a powerful candidate of anticancer molecularly targeting therapy for human endometrial cancer patients. ii) Targeted DAPK knockdown induced apoptosis in human uterine carcinosarcoma cells and human uterine leiomyosarcoma cells. The results suggest that DAP kinase can be a candidate of anticancer molecularly targeting therapy for uterine carcinosarcoma and sarcoma patients in addition to endometrial adenocarcinoma patients. iii) Targeted DAPK knockdown enhanced 5FU-sensitivity but not VP16-sensitivity, and enhanced partially CDDP-sensitivity in human endometrial adenocarcinoma cells. However, it did not improve their 5FU-sensitivities in the 5FU-resistant cells. These results indicate that the molecular targeting therapy of DAPK can be applied to restricted anticancer chemotherapies.

(2) Regulation of DAPK expression by demethylation improved some of anticancer drug-sensitivities in anticancer drug-resistant cervical cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

抗癌剤治療法の進歩は、進行期癌患者の生存期間を確実に延長してきているが、完治率は必ずしも十分な改善をみていない。進行期癌患者の完治率が頭打ちとなる最大理由は、長期的および頻回の抗癌剤治療経過中に発生する抗癌剤耐性獲得現象である。抗癌剤に対する自然耐性および獲得耐性の分子機構を明らかにし、耐性癌に対する新しい抗癌剤耐性克服化学療法を開発することが現在の癌治療における最大課題のひとつである。我々は長年の抗癌剤耐性機序の研究の中で、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌の複数の細胞株から多数の抗癌剤耐性変異株を樹立し、それらの遺伝子発現プロファイリングを行ってきた。一方で抗癌剤感受性を回復ないし増感させる方法を探し続けてきた。その研究過程で、DAP kinase が直接的にある種の抗癌剤感受性を特異的に制御するという大発見をするに至った。同時に、抗癌剤多剤耐性癌細胞が DAP kinase および関連分子のプロモーター脱メチル化処理で一時的に回復できることも実証した。

### 2. 研究の目的

これまでの我々の研究成果を土台として、DAP kinase タンパク発現制御に伴う抗癌剤感受性の変化を臨床的に応用する方法を見つけること、および DAP kinase 遺伝子発現制御の中心的役割を担っているプロモーター領域メチル化現象による抗癌剤感受性の変化を臨床的に応用する方法を見つけること、を本研究の主たる目的としている。多剤耐性克服現象では、DAP kinase 以外の分子群の発現変動も抗癌剤多剤耐性化克服の原因であり、このメカニズムの解明は抗癌剤治療最大の難問である抗癌剤多剤耐性化現象に画期的治療法を導入できる可能性を示唆している。(1) DAP kinase による抗癌剤感受性制御の分子機序解析と、(2) 脱メチル化処理による抗癌剤多剤耐性克服関連分子群の同定と個々の作用機序の解明の2方向から解析を進めることで、確実な成果を得る戦略をとる。

### 3. 研究の方法

<1> DAP kinase による抗癌剤感受性制御の分子機序解析：

DAP kinase siRNA による一部の抗癌剤感受性回復現象、ある条件下での脱メチル化処理に伴う抗癌剤多剤耐性細胞の感受性回復現象

に関しては、さらに詳細な抗癌剤耐性克服メカニズムを遺伝子レベルおよび蛋白レベルで解析する。①DAP kinase ノックダウンによる抗癌剤感受性回復現象の特異性の解析：1) DAP kinase ノックダウンによる抗癌剤感受性回復現象の実験系における、既知の抗癌剤多剤耐性遺伝子の発現変動の関与を検証する。2) DAP kinase ノックダウンによる抗癌剤感受性回復現象の可能性の検証。②DAP kinase ノックアウトマウス由来細胞を用いた DAP kinase 関連の抗癌剤感受性制御機構の解析：DAP kinase ノックアウトマウスの子宮及び卵巣由来の細胞を実験に使用する。③DAP kinase ノックダウンによる特定の抗癌剤感受性回復機能と脱メチル化処理に伴う多剤耐性回復現象における分子発現の差異の解析を行う。

<2>脱メチル化処理による抗癌剤耐性克服関連分子群の同定と個々の作用機序の解明：ある条件下での脱メチル化処理は DAP kinase プロモーター以外の複数の遺伝子発現制御に影響し、多種類の抗癌剤感受性を一時的に回復できる。すなわち多剤耐性克服現象では、DAP kinase 以外の分子群の発現変動が抗癌剤多剤耐性化克服の原因であり、このメカニズムの解明は抗癌剤治療最大の難問である抗癌剤多剤耐性化現象に画期的治療法を導入できる可能性がある。

①抗癌剤多剤耐性化癌細胞の抗癌剤感受性回復現象において大きく発現変動する DAP kinase 以外の分子群の同定：エピジェネティクス制御による抗癌剤耐性克服現象で mRNA 発現が変動する遺伝子群をスクリーニングし、抗癌剤耐性克服分子候補を同定する我々は、多数の抗癌剤耐性変異癌細胞株を樹立しているため、複数の安定した抗癌剤耐性細胞株を用いて全細胞に共通して発現が変動する分子群の選別スクリーニングを行なうことで、偽陽性遺伝子の捕捉を避ける。

### 4. 研究成果

大学附属の動物実験施設の長期間のウイルス汚染による動物実験中止により、予定していた動物実験は十分には実施できなかった。

(1) DAP kinase (DAPK) による抗癌剤感受性制御の分子機序解析：

① 子宮内膜癌細胞の DAPK ノックダウンは癌細胞の Fas シグナルを増強し (Eur J Obst Gynecol 2011)、TRAIL mRNA 産生促進、TRAIL 分子分泌促進、TRAIL 受容体である DR4 およ

びDR5の発現促進、などから自分泌・傍分泌機序により、癌細胞をアポトーシスに導くことを証明した。これらの結果は、DAPKが癌免疫増強、アポトーシス増強による癌の分子標的治療の効率的分子標的の有力候補になることを証明した (Int J Oncol 2010)。

② これまで抗癌剤が全く無効で予後が極めて悪いと考えられてきた子宮癌肉腫細胞、子宮平滑筋肉腫細胞が、DAPK ノックダウンにより、アポトーシスが誘発されることを証明した (Int J Oncol 2010)。これはDAPKが広範囲な分子標的治療の対象になり得ることを実証した。

③ DAPK ノックダウンによる抗癌剤感受性回復現象の特異性の解析：子宮内膜癌細胞株を用いたDAPK ノックダウンにより、5FU感受性が亢進されたが、VP16感受性は全く変化せず、CDDP感受性は部分的に改善されることを証明した (Oncol Rep 2010)。しかし、独自に樹立した5FU耐性株 (Int J Oncol 2010) を用いたDAPK ノックダウンでは5FU感受性は回復しなかった (論文執筆中)。DAPKに対する分子標的治療に併用効果が期待される抗癌剤、有効な併用方法への知見を得た。

(2) 脱メチル化処理によるDAPK発現の調節と抗癌剤耐性度変化の解析：  
抗癌剤耐性子宮頸癌株を用いた実験系で、脱メチル化処理によりDAPK発現を制御することにより、特定の抗癌剤感受性が回復できることを証明した。さらに、随伴各種制御分子の発現変動を証明した (論文執筆中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Tanaka T, Bai T, Yukawa K: Specific downregulation of death-associated protein kinase enhances Fas-mediated apoptosis in the human differentiated endometrial adenocarcinoma cell line, HHUA. Eur J Gynaec Oncol, 2011, in press. (査読あり)

② 田中哲二、宇都宮智子、東嶋左緒里、松岡俊英、宇都宮洋才：拳児希望の子宮内膜癌または1C期以上卵巣癌患者に対する子宮卵巣温存療法. 日本受精着床学会雑誌 28: 135-138, 2011. (査読あり)

③ 宇都宮智子、田中哲二、宇都宮洋才：抗癌剤CPT-11誘発マウス卵巣機能障害に対するGnRH agonistの予防機序. 日本受精着床学会雑誌 28: 31-34, 2011. (査読あり)

④ Bai T, Tanaka T, Yukawa K: Targeted

knockdown of death-associated protein kinase expression induces TRAIL-mediated apoptosis in human endometrial adenocarcinoma cells. Int J Oncol 37: 203-210, 2010. (査読あり)

⑤ Tanaka T, Bai T, Yukawa K: Death-associated protein kinase is essential for the survival of various types of uterine cancer cells. Int J Oncol 37: 1017-1022, 2010. (査読あり)

⑥ Tanaka T, Bai T, Yukawa K: Suppressed protein expression of death-associated protein kinase enhances 5-fluorouracil-sensitivity but not etoposide-sensitivity in human endometrial adenocarcinoma cells. Oncol Rep 24: 1401-1405, 2010. (査読あり)

⑦ 田中哲二、李莉、宇都宮智子、池島美和、松岡俊英、湯川和典：アポトーシスシグナル伝達分子death-associated protein kinase (DAPK)は異常卵胞を排除することで正常な種の維持を担っている？日本受精着床学会雑誌 27: 37-41, 2010. (査読あり)

⑧ Utsunomiya T, Tanaka T, Utsunomiya H, Umesaki N: Direct effects of CPT-11 and SN38 on ovarian granulosa cells. Mol Med Rep 2: 189-192, 2009. (査読あり)

⑨ Li L, Tanaka T, Yukawa K, Akira S, Umesaki N: Irinotecan-induced ovarian follicular apoptosis is attenuated by deleting the kinase domain of death-associated protein kinase. Int J Oncol 34: 905-914, 2009. (査読あり)

[学会発表] (計11件)

① 田中哲二、梅咲直彦：婦人科悪性腫瘍に対して安全に外来がん化学療法を実施するためのBWTC療法. 第48回日本癌治療学会学術集会 2010年10月28日～10月30日 (国立京都国際会館・京都市)

② 田中哲二、福元隆浩、宇都宮智子、松岡俊英、宇都宮洋才、湯川和典：抗癌剤塩酸イリノテカンによる急性卵巣機能障害の発症機序 第19回日本Cell Death学会学術集会 2010年7月31日～8月1日 (愛知県産業労働センター・名古屋市)

③ 田中哲二：根治手術困難な高齢者の婦人科進行癌に対する外来がん化学療法の限界 第10回日本抗加齢医学会総会 2010年6月

11日～13日（京都国際会館・京都市）

④池島美和、松岡俊英、南佐和子、田中哲二：巨大卵巣腫瘍の一例。第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2010年4月23日～4月25日（東京国際フォーラム）

⑤田中哲二：分化型子宮内膜癌の分子標的治療における death-associated protein kinase (DAK) の意義。第62回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2010年4月23日～4月25日（東京国際フォーラム）

⑥田中哲二：高齢者の根治手術不能婦人科進行癌に対する外来がん化学療法のは非 第9回日本抗加齢医学会総会 2009年5月27日～29日（ホテル日航東京・東京）

⑦田中哲二：抗癌剤 CPT-11 による急激な卵巣加齢促進作用に関するインフォームドコンセントの必要性。第9回日本抗加齢医学会総会 2009年5月27日～29日（ホテル日航東京・東京）

⑧田中哲二：CPT-11 併用癌化学療法に頻発する卵巣機能不全の発生機序。第82回日本内分泌学会学術総会 2009年4月23日～25日（群馬県民会館・前橋市）

⑨田中哲二、梅咲直彦：子宮頸癌細胞の塩酸イリノテカン (CPT-11) 耐性獲得機序における death-associated protein kinase (DAK) の意義。第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2009年4月3日～4月5日（国立京都国際会館・京都市）

⑩田中哲二、宇都宮智子、梅咲直彦：塩酸イリノテカン (CPT-11) 治療にともなう卵巣機能不全の分子生物学的機序 第61回日本産科婦人科学会総会・学術講演会 2009年4月3日～4月5日（国立京都国際会館・京都市）

⑪田中哲二、梅咲直彦：仮説：CPT-11 由来の第2活性代謝産物が存在する。2008年7月17日～19日 第44回日本婦人科腫瘍学会（名古屋国際会議場、名古屋）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 哲二 (TANAKA TETSUJI)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80275255

### (2) 研究分担者

松岡 俊英 (MATSUOKA TOSHIHIDE)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：70464675

宇都宮 智子 (UTSUNOMIYA TOMOKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：60382355

池島 美和 (IKEJIMA MIWA)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：70433349  
(平成21年度まで)

### (3) 連携研究者

なし