

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05732

研究課題名(和文) 制がん剤耐性獲得過程におけるEMT誘導の分子機序解析

研究課題名(英文) The study of the mechanism by which anti-cancer drugs induce EMT

研究代表者

田代 悦 (Tashiro, Etsu)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：00365446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんLoVo細胞に白金制がん剤シスプラチンを長期暴露すると、EMTを誘導した間葉系の細胞になることを見出した。そこでケミカルゲノミクス的手法を用いてそのメカニズムを明らかにしようと試みた結果、TGF- β 受容体の阻害剤がシスプラチン耐性細胞の間葉系の形質を上皮の形質に戻すことがわかり、EMTを強力に誘導するTGF- β シグナルの活性化が薬剤耐性の獲得に重要であることがわかった。さらに、シスプラチンを処理するとTGF- β の分泌が促進することもわかった。以上、シスプラチンを処理するとTGF- β の分泌が促進されることでTGF- β シグナルが活性化し、これによってEMTが誘導されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制がん剤を暴露し続けると制がん剤耐性を獲得することは古くから知られており、解決すべき問題の一つである。近年、制がん剤耐性とEMTの関連が明らかになり、申請者らが独自で行った実験でも、制がん剤耐性細胞でEMTが誘導されていることが再現できた。そしてそのメカニズムの一つとして、EMTを強力に誘導するTGF- β の分泌促進という新しいモデルを提唱できたことが本研究の学術的意義である。TGF- β シグナルの阻害剤は幾つか開発されており、それらが制がん剤耐性を獲得した実際のがん患者に応用され、効果が発揮されることを期待する。

研究成果の概要(英文)：We found that long-term exposure of colorectal cancer LoVo cells to the platinum anticancer drug cisplatin changed the epithelial-like phenotype to the mesenchymal-like phenotype which is a typical feature of EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition). Therefore, we tried to examine the mechanism using a chemical genomics approach, and we found that TGF- β receptor inhibitors reversed the mesenchymal phenotype of cisplatin-resistant cells to epithelial phenotypes. These results suggested that the activation of TGF- β signaling plays a critical role in the acquisition of cisplatin-induced drug resistance. Moreover, we found that cisplatin enhanced the secretion of TGF- β into the culture medium. Taken together, it is suggested that cisplatin enhances the secretion of TGF- β , which resulted in the activation of TGF- β signaling and thereby inducing EMT and subsequent drug resistance.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：制がん剤耐性 EMT TGF- β

1. 研究開始当初の背景

EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) とは、上皮のがん細胞の形質が間葉細胞の形質へと転換する現象のことである。この EMT が誘導されたがん細胞は、高い運動能を獲得し、また幹細胞の性質の獲得、薬剤耐性を獲得するなど、がんの悪性度が亢進し、がん治療を困難にしている。しかし、がんが悪性化する過程でどのように EMT が誘導されるのか、そのメカニズムは不明なままである。

そのような背景の下、申請者らは抗がん剤耐性獲得過程における EMT 誘導のメカニズムに着目した。

2. 研究の目的

申請者らは、抗がん剤耐性を獲得する過程で、どのように EMT が誘導されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まずはじめに、抗がん剤耐性細胞を樹立し、EMT が誘導されていることを確認した。次に EMT が誘導された抗がん剤細胞の形質を元に戻す、すなわち MET を誘導する物質を探索した。

続いて、MET を誘導する物質の作用機序から EMT 誘導に関連する分子のヒントを得て、その分子の関与について検討した。

4. 研究成果

(1) シスプラチン耐性細胞の樹立

まずはじめに、抗がん剤耐性細胞の樹立を試みた。5 種のがん細胞、4 種の抗がん剤を準備し、1 ヶ月間持続暴露することで耐性細胞の獲得を目指した。その結果、大腸がん LoVo 細胞にシスプラチンを持続暴露させた結果、耐性細胞を得ることに成功した。54 のクローン細胞を得たが、そのほとんどで細胞間接着が消失した間葉細胞のような形態をしていた(図 1A)。そこで上皮マーカーと間葉マーカーの発現を検討した結果、上皮マーカー E-cadherin の発現減少、間葉マーカー N-cadherin の発現上昇が見られた(図 1B)。さらに EMT 関連転写因子として知られる Slug や ZEB2、Twist といった分子の発現も上昇していた(図 1C)。しかし、間葉マーカー Vimentin の発現上昇は極めて弱く、またシスプラチン耐性細胞の形態も完全な間葉系細胞のそれとは言えなかった。このように、上皮細胞と間葉細胞の中間の性質を示す状態を、近年では partial-EMT と定義されており、申請者らが樹立したシスプラチン耐性細胞は partial-EMT が誘導された細胞であると考えられる。

またシスプラチン耐性細胞は、シスプラチンに対してアポトーシス耐性を示すことも併せて明らかにした(図 1D)。

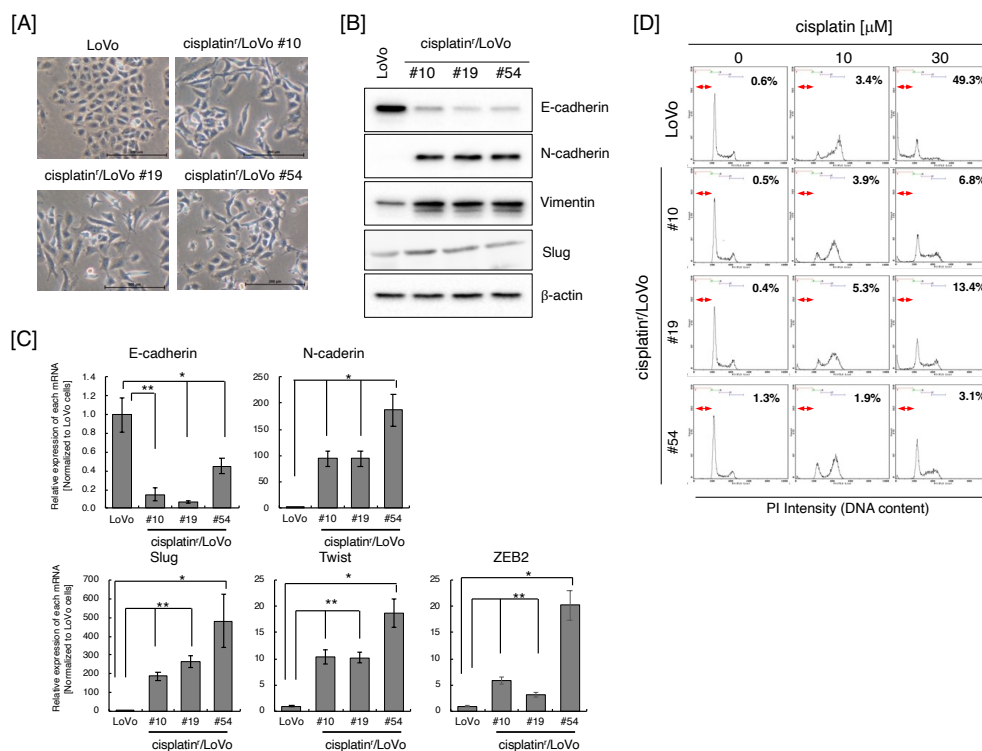


図1 シスプラチン耐性細胞の樹立

(2) シスプラチン耐性細胞に MET を誘導する物質の探索

シスプラチン耐性を獲得する過程の EMT 誘導メカニズムを探るため、シスプラチン耐性細胞の間葉系の形質を上皮の形質に戻す (MET 誘導) 物質の探索を行った。化合物は、文科省新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援活動から、標準阻害剤キット 400 化合物を頂いた。そして 400 化合物について、E-cadherin と N-cadherin の発現を指標にシスプラチン耐性細胞に MET を誘導する物質を探索した。その結果、TGF- β 受容体の阻害剤 (SB431542 と TK-II) がヒットした。TK-II は 1 μ M の濃度で、シスプラチン耐性細胞の形態を部分的に上皮細胞の形態に戻した。また、E-cadherin の発現を上昇させ、N-cadherin の発現を低下させた (図 2A, B)。さらに TK-II は Slug mRNA の発現も減少させた (図 2C)。また、TK-II を 72 時間処理してシスプラチン耐性細胞を上皮の形質に戻し、その細胞にシスプラチンを添加してアポトーシス誘導を検討した。その結果、シスプラチン耐性細胞はアポトーシス耐性であるのに対し、TK-II を前処理した細胞はシスプラチンによってアポトーシスを誘導した (図 2D)。その反対に、TGF- β で刺激した LoVo 細胞がシスプラチンに対するアポトーシス耐性を獲得するのかが検討した。LoVo 細胞を TGF- β で刺激すると 48 時間後には E-cadherin の発現減少と N-cadherin の発現上昇が誘導されることから、partial-EMT が誘導される。次にこの細胞に高濃度のシスプラチンを添加し、アポトーシス誘導を評価した。その結果、TGF- β 刺激した LoVo 細胞はシスプラチン耐性を獲得することがわかった (図 2E)。

以上の結果より、TGF- β シグナルの活性化がシスプラチン耐性細胞の間葉系形質の維持、およびアポトーシス耐性に大事であることが示唆された。

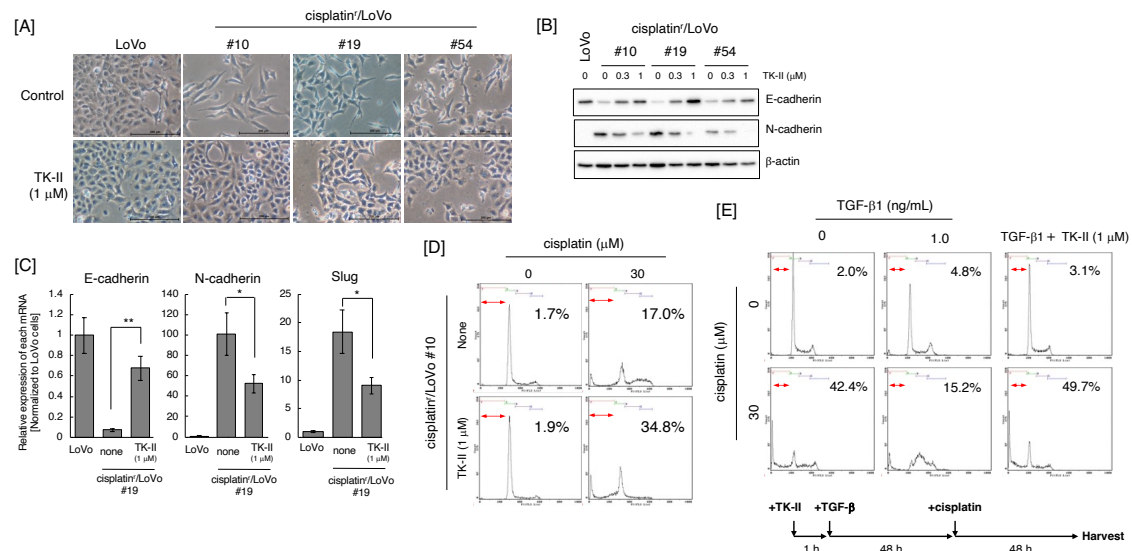


図 2 TGF- β 受容体阻害剤による MET 誘導

(3) シスプラチンによる partial-EMT 誘導のタイミング

続いて、シスプラチンの暴露後、何日目まで partial-EMT が誘導されるのか検討した。シスプラチンを 1 μ M という低濃度で LoVo 細胞に暴露すると、6 日ないし 9 日後から N-cadherin や Fibronectin の発現上昇が mRNA レベルとタンパク質レベルで観察された(図 3A, C)。また、Slug もシスプラチン添加 6 日後から発現上昇が観察された。一方で、E-cadherin タンパク質量は変化がなかったが、mRNA 量は 6 日後から減少していた(図 3A, C)。さらに、E-cadherin タンパク質の細胞内局在を観察すると、通常は細胞膜に局在しているのに対し、シスプラチンを添加すると細胞膜の局在が消失していた(図 3D)。以上の結果より、シスプラチンを暴露すると、わずか 6 日後には partial-EMT が誘導されることが明らかとなった。

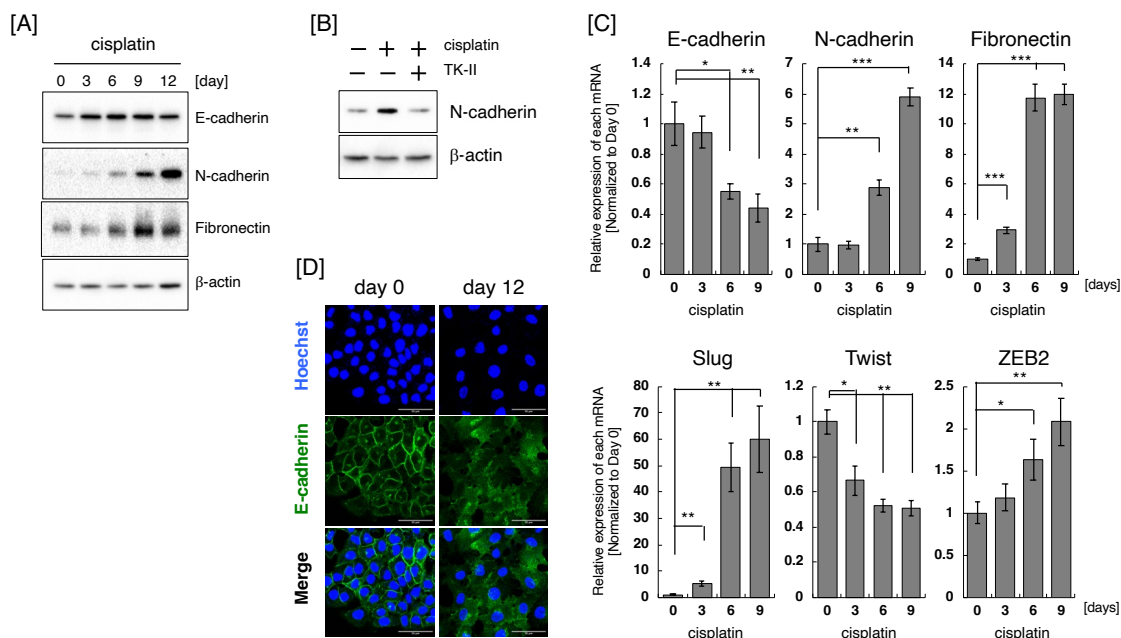


図 3 シスプラチンによる partial-EMT 誘導

(4) シスプラチンによる partial-EMT 誘導を引き起こすがん細胞

次に、シスプラチンによる partial-EMT 誘導が、LoVo 細胞だけで起こる現象なのか、その多様性について検討した。まずはじめに、研究室に存在していた 16 種のがん細胞について、その形態と E-cadherin および N-cadherin の発現を確認した。次に、その中から上皮系の細胞 6 種を選択してシスプラチンの影響を検討した。その結果、肺がん A549 細胞はシスプラチン暴露によって N-cadherin の発現が上昇したが、大腸がん DLD-1、HCT116、HT29、SW48 細胞、そして前立腺がん LNCaP 細胞はシスプラチンを暴露しても N-cadherin の発現上昇は見られなかった(図 4A, B)。ところで LoVo 細胞におけるシスプラチンによる partial-EMT には TGF- β シグナルの活性化が重要だった。そこで A549 細胞におけるシスプラチンによる N-cadherin の発現上昇も TGF- β シグナルを介しているのか確認するため、TGF- β 受容体阻害剤の影響を検討した。その結果、SB431452 はシスプラチンによる N-cadherin の発現上昇を抑制した(図 4C)。また、シスプラチンによる partial-EMT を誘導する LoVo 細胞と A549 細胞は TGF- β 刺激によって Smad3 のリン酸化が検出されたが、シスプラチンによる partial-EMT が誘導されなかった DLD-1、HCT116、HT29、SW48、そして LNCaP 細胞は TGF- β 刺激しても Smad3 のリン酸化は検出できなかった(図 4D)。この結果は、DLD-1、HCT116、HT29、SW48、そして LNCaP 細胞は TGF- β シグナルが不活性化していることを示している。

以上の結果より、TGF- β シグナルが活性化する細胞ではシスプラチンによる partial-EMT が誘導されるが、TGF- β シグナルが不活性化している細胞ではシスプラチンによる partial-EMT が誘導されないことがわかった。したがって、シスプラチンによる partial-EMT 誘導に TGF- β シグナルが重要であることがさらに支持された。

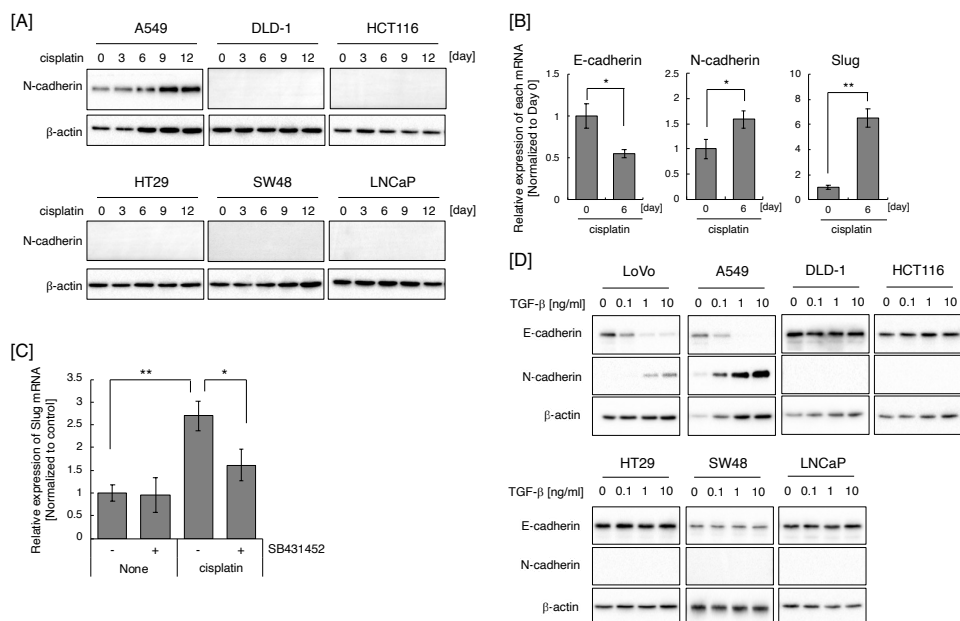


図 4 種々のがん細胞におけるシスプラチンによる partial-EMT 誘導

(5) シスプラチンによる TGF- β の分泌促進

シスプラチンがどのように TGF- β シグナルを活性化しているのか、検証した。まず培地中の TGF- β 量を ELISA を用いて定量化した。その結果、LoVo 細胞にシスプラチンを添加すると、培地中の TGF- β 量が増加していた(図 5A)。一方で、TGF- β mRNA 量には変化がなかった(図 5B)。したがって、シスプラチンによる培地中の TGF- β 量の増加は、分泌促進である可能性が示唆された。

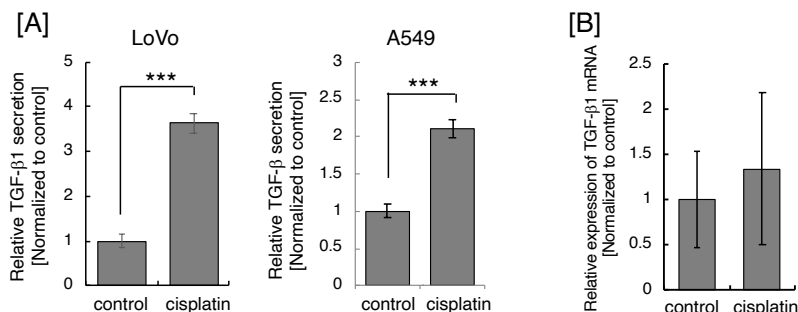


図 5 シスプラチンによる TGF- β 分泌促進

以上、本研究の遂行によって

- ①シスプラチンを暴露すると、TGF- β の分泌が促進される。
- ②シスプラチン暴露 6 日後から partial-EMT が誘導される。
- ③partial-EMT が誘導されたがん細胞は、シスプラチンによるアポトーシス耐性を獲得するのことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11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 Tashiro Etsu, Nagasawa Yumi, Itoh Susumu, Imoto Masaya	4. 巻 534
2. 論文標題 Involvement of miR-3180-3p and miR-4632-5p in palmitic acid-induced insulin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111371 ~ 111371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2021.111371	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 Imoto Masaya, Fujimaki Takahiro, Saito Shun, Tashiro Etsu	4. 巻 74
2. 論文標題 Androgen receptor antagonists produced by Streptomyces overcome resistance to enzalutamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 706 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00453-y	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 Kawamoto R, Nakano N, Ishikawa H, Tashiro E, Nagano W, Sano K, Irie M, Ikuta M, Kishi F, Nakane T, Naito M, Itoh S.	4. 巻 1
2. 論文標題 Narciclasine is a novel YAP inhibitor that disturbs interaction between YAP and TEAD4	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BBA Advances	6. 最初と最後の頁 100008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Zhou Tao, Katsuragawa Misaaki, Xing Tian, Fukaya Keisuke, Okuda Toru, Tokiwa Toshiyuki, Tashiro Etsu, Imoto Masaya, Oku Naoya, Urabe Daisuke, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 84
2. 論文標題 Cyclopeptides from the Mushroom Pathogen Fungus Cladobotryum varium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 327 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c00980	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 Kataura Tetsushi, Tashiro Etsu, Nishikawa Shota, Shibahara Kensuke, Muraoka Yoshihito, Miura Masahiro, Sakai Shun, Katoh Naohiro, Totsuka Misato, Onodera Masafumi, Shin-Ya Kazuo, Miyamoto Kengo, Sasazawa Yukiko, Hattori Nobutaka, Saiki Shinji, Imoto Masaya	4. 巻 Aug 7
2. 論文標題 A chemical genomics-aggrephagy integrated method studying functional analysis of autophagy inducers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1794590	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 Sophonnihiparasert T, Aruksakunwong O, Tashiro E, Kondoh Y, Muroi M, Osada H, Imoto M, Watanapokasin R	4. 巻 6
2. 論文標題 Interaction between goniothalamin and peroxisomal multifunctional enzyme type 2 triggering endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e05200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e05200	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

1. 著者名 Miyanaga A, Takaku R, Takaishi M, Tashiro E, Kudo F, Eguchi T	4. 巻 73
2. 論文標題 Generation of incednine derivatives by mutasynthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Th Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 794~797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-020-0329-y	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 Ohno Osamu, Iwasaki Arihiro, Same Kyouhei, Kudo Chihiro, Aida Erika, Sugiura Kazuya, Sumimoto Shimpei, Teruya Toshiaki, Tashiro Etsu, Simizu Siro, Matsuno Kenji, Imoto Masaya, Suenaga Kiyotake	4. 巻 24
2. 論文標題 Isolation of Caldorazole, a Thiazole-Containing Polyketide with Selective Cytotoxicity under Glucose-Restricted Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4547~4551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c01566	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 Harunari Enjuro, Mae Shunsuke, Fukaya Keisuke, Tashiro Etsu, Urabe Daisuke, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Bisprenyl naphthoquinone and chlorinated calcimycin congener bearing thiazole ring from an actinomycete of the genus Phytohabitans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 542 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00559-x	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 Saito Shun, Xiaohanyao Ye, Zhou Tao, Nakajima-Shimada Junko, Tashiro Etsu, Triningsih Desy Wulan, Harunari Enjuro, Oku Naoya, Igarashi Yasuhiro	4. 巻 85
2. 論文標題 Phytohabitols A?C, -Lactone-Terminated Polyketides from an Actinomycete of the Genus <i>Phytohabitans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1697 ~ 1703
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00137	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 Nakano Naoko, Fukuda Kazuo, Tashiro Etsu, Ishikawa Haruka, Nagano Waka, Kawamoto Rie, Mori Alice, Watanabe Misao, Yamazaki Ryu, Nakane Takahisa, Naito Mikihiko, Okamoto Iwao, Itoh Susumu	4. 巻 171
2. 論文標題 Hybrid molecule between platanic acid and LCL-161 as a yes-associated protein degrader	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 631 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac021	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 ETSU TASHIRO, Masaya Imoto, Susumu Itoh
2. 発表標題 Involvement of TGF-beta signal activation in anti-cancer drug resistance
3. 学会等名 FASEB SRC; The TGF-beta Superfamily Conference: Signaling in Development and Disease (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 先端モデル動物支援プラットフォーム (AdAMS)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 320
3. 書名 マウス・ラットモデル作製・解析プロフェッショナル	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------