

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19516

研究課題名（和文）消化器がんの抗がん剤耐性克服を目指したDGK エピゲノム制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on the epigenomic mechanism of DGK α to overcome drug resistance in gastrointestinal cancers

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：DGK は多種のがん細胞の増殖因子として機能することが知られている。我々は肝細胞がんをはじめとして、各種の消化器がん細胞株において、殺細胞性抗がん剤の刺激によってDGK 発現レベルが上昇することを見出した。その結果からDGK はがん細胞における抗がん剤耐性に関与する可能性を考え、そのメカニズム解明を目的とした。がん細胞株における脱メチル化処理はDGK 発現を上昇させることがわかり、DGK 発現にはエピゲノム変化における制御が一因する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器がん治療における問題点の一つである抗がん剤耐性を克服するための耐性化メカニズムの一端を解明する研究成果であり、新規治療法および治療薬開発を目指した基礎的なエビデンスを構築した。

研究成果の概要（英文）：DGK was known to function as a growth factor for various cancer cells. We found that DGK expression levels increased in various gastrointestinal cancer cell lines, including hepatocellular carcinoma, upon stimulation with cytotoxic anticancer drugs. Based on the results, we considered the possibility that DGK is involved in anticancer drug resistance in cancer cells. We aimed to elucidate the mechanism. We found that demethylation treatment in cancer cell lines increases DGK expression. The results indicated that DGK expression may be regulated in part by epigenomic changes.

研究分野：消化器外科

キーワード：DGK 抗がん剤耐性 エピゲノム制御 がん治療 肝がん 胃がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞シグナル伝達経路の重要な調整因子とされるジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)の一つのアイソザイムである DGK β は、肝細胞がん(HCC)において MAP キナーゼ経路を活性化することで HCC の増殖や生存を調整する上流因子であること(Takeishi K, et al. J Hepatol 2012)、また DGK β がメラノーマ細胞における抗アポトーシスに関連すること(Yanagisawa K, et al. Biochim Biophys Acta 2007)が知られている。さらに卵巣がんにおける白金製剤耐性の一因が DGK β による制御であること(Li J, et al. Clin Cancer Res 2020)が報告される。消化器がんのがん細胞株に対しても抗がん剤投与下で培養を行うことで DGK β 発現が上昇することが確認されており、消化器がんにおいても DGK β と抗がん剤耐性能獲得との関連が想起された。また、DGK β のエピゲノム制御が放射線照射に対する線維化を促進すること(Weigel C, et al. Nat Commun 2016)が報告されており、DGK β 発現制御の一因にエピゲノム変化の関与が示唆されている。

そこで、これまで未知の領域であった消化器がんにおける DGK β と抗がん剤治療抵抗性の関連メカニズムについて解明することにより、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異なる新しいアプローチとなるがん治療の開発につながる基礎的検討としての研究を構想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は下記の2点である。

- (1) DGK β の抗がん剤治療抵抗性における役割の解明
- (2) 消化器がんにおける DGK β のエピゲノム制御機構の解明

がん治療における抗がん剤抵抗性の分子メカニズムは解明できていない点が多い。本研究において、脂質関連メディエーターであるジアシルグリセロールをホスファチジン酸に変換する酵素である DGK の中で、がん細胞の増殖に関連する報告が多い DGK β とがん治療抵抗性の関連性について、その役割を明らかにするとともに、DGK β 発現制御メカニズムとしてエピゲノム変化に着目してその関連因子の DNA メチル化の変化を探索することで、消化器がんにおける DGK β のエピゲノム制御を標的とした既存の治療法と異なる視点での新規がん治療法の開発に貢献する科学的エビデンスを蓄積し、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の克服を目指す。

3. 研究の方法

(1) 野生型と抗がん剤耐性株を用いた DGK β 発現および DNA メチローム解析・トランスクリプトーム解析による比較検討

各種の消化器がん細胞株を用いて、抗がん剤刺激による DGK β 発現の変動について検討する。さらに、これまでに作成したシスプラチン耐性ヒト肝がん細胞株(HepG2, HLF)を用いて野生型細胞株と DGK β 発現および関連分子について比較する。それぞれの培養細胞株にて条件検討を行い DNA メチローム解析およびトランスクリプトーム解析を行い、既知のがん増殖関連シグナルと関連するシグナル分子とメチル化変異部位の関連性について解析し、トランスクリプトーム解析から mRNA 発現レベルの変動を解析し、抗がん剤耐性にかかわる候補遺伝子と DGK β の関連性を探索する。

(2) 抗がん剤耐性関連遺伝子のメチル化による制御と DGK β 阻害剤の併用

上記検討から推定される関連遺伝子についてノックダウンもしくはノックアウトによる発現抑制した細胞株を作成し、DGK β 発現変動や抗がん剤感受性の変化を確認する。また、in vivo における検証として、各種細胞株(耐性株、関連分子発現抑制株)のヌードマウス皮内移植担がんモデルを用いて抗がん剤や DGK β 阻害剤(DGKAI)の投与による抗腫瘍効果を検証することで、抗がん剤耐性メチル化制御機構における DGK β 阻害の関連性を証明し、DGKAI と抗がん剤の併用治療を含めた最適な治療プロトコルを検討する。

(3) 手術検体における DNA メチローム解析、DGK β 発現と抗がん剤治療抵抗性の検証

所属する教室で保持する組織バンクで保存する各消化器がんのヒト手術切除検体を用いて、化学療法前後の切除検体を用いて DNA メチローム解析および DGK β 免疫組織化学染色を施行し、DGK β 発現やその関連分子が化学療法への効果予測マーカーとなりうるか検討する。

(4) メチル化制御された DGK β 関連抗がん剤耐性遺伝子の他がん種における検討

ここまで確認された DGK β と関連する抗がん剤耐性に関する制御因子について、蓄積されている患者検体を用いて免疫染色で発現レベルを確認する。それらの候補因子の発現の程度や頻

度と、消化器がんの悪性度や転移、生命予後、治療抵抗性との関連を検証する。

以上の結果を総合的に分析し、メチル化制御された DGK 関連分子を基軸とした消化器がんの治療抵抗性関連バイオマーカーを同定し、DGK 関連因子の制御が新たな消化器がん治療法への応用に有用であることを証明する。

4. 研究成果

(1) 各種消化器がん細胞株を用いた抗がん剤投与による DGK 発現変動と DGKAI 併用投与による細胞増殖の変化

各種の消化器がん細胞株(肝がん:HepG2、胃がん:MKN45、膵がん:AsPC-1、大腸がん:HCT116)を用いて、それぞれ抗がん剤(CDDP、5-FU、GEM)を投与したところ、薬剤刺激により DGK 遺伝子発現が上昇した。また、HepG2、HCT116、MKN45 において CDDP および 5-FU を投与し、DGKAI を併用投与することで細胞増殖能の抑制効果が増強した。

(2) CDDP 耐性肝がん細胞株 HepG2 における DGK 発現の検討

これまでの研究(Fujiyoshi S, Taketomi A, et al. Hepatol Res 2020)で用いた手法により HepG2 を継続的に低濃度 CDDP 暴露条件で培養することで CDDP 耐性株を作製した。この細胞株において DGK 遺伝子発現レベルが野生型株と比較して上昇した。

(3) がん細胞株における脱メチル化処理による DGK 発現の変化

いくつかのがん細胞株(肝がん:HepG2、胃がん:MKN45、膵がん:AsPC-1)を用いて脱メチル化剤(2'-deoxy-5-azacytidine; DAC)処理を行ったところ、DAC 処理により DGK 遺伝子発現が上昇することがわかった。

(4) ノードマウス皮下移植担がんモデルにおける抗がん剤と DGKAI 併用投与による抗腫瘍効果の検証

HepG2 および MKN45 を用いてノードマウス担がんモデルを作成し、CDDP および 5-FU の投与と経口 DGKAI 併用投与の効果について検討したところ、いずれも抗がん剤+DGKAI において有意に腫瘍増殖抑制効果が認められた。

(5) ヒト HCC 切除検体における DGK 発現の検討

当教室で切除した HCC 切除検体において、術前に化学療法(経動脈カテーテル的化学塞栓療法)の治療歴を有する検体(n=17)を用いて DGK 免疫染色を施行した。同時期の化学療法治療歴のない症例群(n=25)と比較検討した。しかし、それぞれがん細胞に DGK 発現が確認されたものが治療歴にある群 2 例、未治療群 5 例と少なく、HCC 切除臨床検体における検討について今回は困難であった。染色条件や抗体の選定など条件検討含めてさらなる検討が必要であると考えられた。

本研究において、特に肝がんおよび胃がん由来のがん細胞株における抗がん剤耐性化に DGK が関連する可能性が示唆された。脱メチル化処理により DGK 発現が上昇することから何らかのメチル化の変化によって DGK 発現が制御されている可能性は見出された。

また、今回の検討では手術検体を用いたヒトがん組織における DGK 発現については化学療法による差異は見いだせなかった。過去の検体では時代背景としても術前治療歴を有する切除症例が限定的であったため、術前治療が普及しつつある現在において今後集積していく症例の解析を検討する価値はあると考える。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada Naoki, Sugiyama Ko, Shichi Shunsuke, Shirai Yasuhito, Goto Kaoru, Sakane Fumio, Kitamura Hidemitsu, Taketomi Akinobu	4. 巻 71
2. 論文標題 Combination therapy for hepatocellular carcinoma with diacylglycerol kinase alpha inhibition and anti-programmed cell death-1 ligand blockade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 889 ~ 903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-021-03041-z	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 0件）

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 消化器がんにおける新規治療標的Diacylglycerol kinase の阻害と抗がん剤との併用効果の検討
3. 学会等名 第54回制癌剤適応研究会
4. 発表年 2022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)	東洋大学・理工学部・教授 (32663)	

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