

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591132

研究課題名(和文) 核内転写因子 cJun 阻害を利用した非小細胞肺癌の癌幹細胞を標的にした治療法の検討

研究課題名(英文) Targeted therapy for cancer stem-like cells of non-small cell lung cancers with inhibition of the cJun transcription factor

研究代表者

木下 一郎 (Kinoshita, Ichiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40343008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：複数の非小細胞肺癌(NSCLC)細胞で癌幹細胞の指標である無血清培地下のsphere形成能がcJun阻害によって低下することを見出したが、sphere形成細胞はSCIDマウスでの腫瘍形成能の上昇を認めなかった。

一方、エピジェネティック制御を介し幹細胞の維持に関係するヒストンメチル化酵素EZH2の阻害薬が、NSCLC細胞の増殖を強く抑制した。共にエピジェネティック制御を担うヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬との併用により、相乗的な増殖抑制効果を認めた。幹細胞シグナルの一つであるEZH2とHDACとの同時阻害によるエピジェネティック治療が、肺癌の新しい治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Sphere forming capacity under serum-free culture, indicative of cancer stem cells, were decreased by cJun inhibition in non-small lung cancer (NSCLC) cells, while sphere forming cells did not show enhanced tumorigenicity in SCID mice.

Meanwhile, an inhibitor of histone methyltransferase EZH2 involved in stem cell maintenance via epigenetic regulation suppressed growth of NSCLC cells. An inhibitor of histone deacetylase (HDAC), another epigenetic regulator, showed a synergistic growth suppressive effect with the EZH2 inhibitor. Combined epigenetic therapy with an EZH2 inhibitor and an HDAC inhibitor may represent an effective approach for NSCLCs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺癌 癌幹細胞 cJun EZH2

1. 研究開始当初の背景

進行肺癌患者の5年生存率は10%台と低く、新しい分子標的治療に期待が寄せられている。非小細胞肺癌ではEGF受容体(EGFR)遺伝子変異陽性患者におけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib の高い抗腫瘍効果が我々を含めた施設より報告された。しかし、奏効症例も全例が後に抵抗性となる。更に、変異陰性患者の治療効果は低く、新たな治療戦略が必要である。

多くの増殖シグナルに關与する核内転写因子 cJun が肺癌において高頻度に過剰発現していることが報告された。申請者は、複数の肺癌細胞株において、cJun の阻害が足場依存性増殖、clonogenic な足場非依存性増殖、および in vivo 造腫瘍能を抑制することを報告し、その標的遺伝子を同定した。

一方、肺癌を含む多くの悪性腫瘍は、幹細胞の性質をもつ少数の細胞集団から形成されてくることが示され、癌幹細胞と名付けられた。癌幹細胞は、発癌の概念にパラダイムシフトを引き起こすとともに、強い薬剤抵抗性を持つことが明らかとなり、癌の根治のためには癌幹細胞を標的とした治療法の開発が必須と考えられる。最近、c-jun コンディショナルノックアウトマウスを用いた実験で、cJun が乳癌幹細胞の自己複製に必須であることが報告された。

2. 研究の目的

本研究は cJun 阻害を利用した非小細胞肺癌の癌幹細胞を標的にした治療法の開発を最終目標とし、その基盤となる研究を行う。研究期間内に以下のことを明らかにする。

(1) 種々の非小細胞肺癌細胞から癌幹細胞が濃縮していると考えられる sphere (球状細胞集塊) 形成細胞または ALDH 活性陽性細胞を分離し、他の癌幹細胞マーカーを発現しているか、また、in vivo で高い造腫瘍能を持つかを検討し、癌幹細胞としての性質を明らかにする。

(2) 同定された癌幹細胞が cJun 阻害によって増殖や生存が抑制されるか検討する。

(3) 癌幹細胞に関わることが報告されている他のシグナル (PI3K 系、ポリコム群蛋白質、Wnt 系、Notch 系、HedgeHog 系等) の阻害による効果、および cJun 阻害との併用効果を検討する。

(4) EGFR 遺伝子変異陽性細胞においては、gefitinib との併用効果を検討する。

(5) 優れた併用効果を認めた阻害剤を用いて、in vivo での治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 非小細胞肺癌細胞において癌幹細胞が濃縮する考えられる sphere 形成培養を行い、cJun 阻害による効果を検討した。

(2) spheroid 形成細胞が癌幹細胞の特徴である高い造腫瘍能を有しているか検討した。

(3) 癌幹細胞に関わることが報告されてい

る他のシグナルとして、申請者が非小細胞肺癌で高発現し予後不良因子であることを報告したポリコム遺伝子 EZH2 に着目し、その阻害剤 DZNep の効果を検討した。

(4) EZH2 阻害の抗腫瘍効果を高めるために、エピジェネティクス制御の中心を担うヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤 SAHA との併用効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 癌幹細胞が濃縮されると考えられている low attachment plate 上での EGF・bFGF 添加/無血清培地による sphere 形成培養を、種々の非小細胞肺癌細胞株 (PC-3、NCI-H1975、NCI-H1299、および A549) を用いて行った。いずれの細胞株においても sphere が形成された (図1)。また、通常培養時と比べて癌幹細胞マーカーの一つである ALDH 高活性細胞の増加を認めた。NCI-H1299 細胞においては、tet-on システムによる cJun dominant negative mutant の誘導によって、sphere 形成能が低下した。

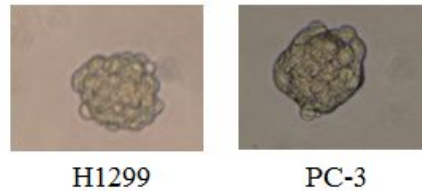


図1 非小細胞肺癌細胞における sphere 形成

(2) sphere 形成細胞の造腫瘍能を検討するために、sphere 形成培養した NCI-H1299 細胞と A549 細胞を NOD/SKID マウスへ移植したところ、コントロールの単層培養した細胞と比較し有意な腫瘍形成能の上昇を認めなかった (表1)。

	Cell number injected	Tumor incidence	Latency (days)
Sphere	2 × 10 ³	1/4	51
	2 × 10 ⁴	4/4	20
Monolayer	2 × 10 ³	2/4	58
	2 × 10 ⁴	4/4	23

表1 sphere 形成培養と単層培養した非小細胞肺癌細胞の造腫瘍能

(3) 一方、申請者は幹細胞の維持に關係するポリコム遺伝子 EZH2 が非小細胞肺癌で高発現し予後不良因子であることを報告していたが、siRNA による EZH2 のノックダウンや EZH2 阻害効果を有する小分子化合物 DZNep が上記4種類の非小細胞肺癌細胞の増殖を抑制し (表2)、G1 期停止とアポトーシスを誘導することを見出した (図2)。不死化正常気管支細胞や線維芽細胞ではこれらの効果は有意に小さかった (表2)。EGFR 遺伝子異常を有する H1975 と PC-3 において DZNep の効

果はより強くみられ、cyclin A の発現低下と p27 の発現亢進を認めた。DZNep は EZH2 の発現と EZH2 依存的なヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化を低下させることを確認した (図 3)。

Cell type	Cell line	IC50 of DZNep (μM) ^a
NSCLC cells	H1299	0.21 \pm 0.01
	H1975	0.08 \pm 0.02
	A549	0.24 \pm 0.01
	PC-3	0.19 \pm 0.01
Non-cancerous cells	HBEC3 KT	0.58 \pm 0.09*
	16HBE14o-	1.03 \pm 0.11*
	WI-38 VA-13 2RA	0.63 \pm 0.07*

表 2 EZH2 阻害薬 DZNep の非小細胞肺癌細胞と非癌細胞に対する増殖抑制

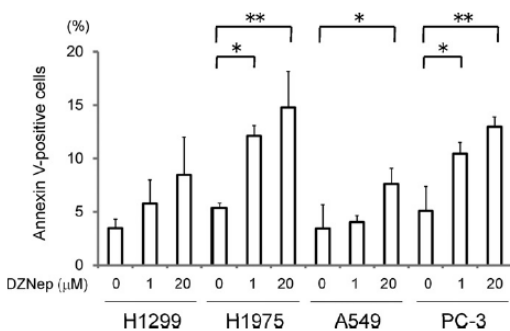


図 2 DZNep の非小細胞肺癌細胞に対するアポトーシス誘導

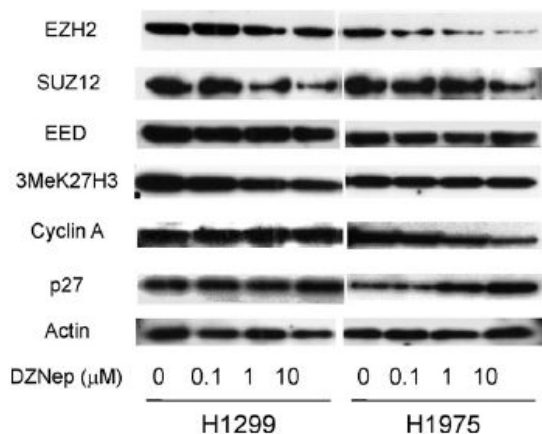
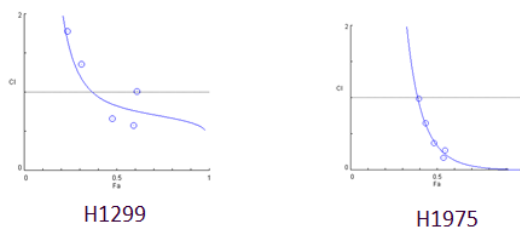


図 3 DZNep 処理後の非小細胞肺癌細胞の Western blot 解析

(4) EZH2 阻害の抗腫瘍効果を高めるために、エピジェネティクス制御の中心を担うヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害薬 SAHA との併用効果を検討した。DZNep と SAHA の併用は各細胞株の増殖を相乗的に抑制し、EZH2 の発現とヒストン H3K27 のトリメチル化を DZNep 単独よりも低下させた (図 4)。併用により p27 上昇と cyclin A 低下を強く認め、相加・相乗的にアポトーシスを誘導した。



DZNep (μM)	SAHA (μM)	CI H1299	CI H1975
0.05	0.5	1.78	0.99
0.1	1	1.36	0.649
0.2	2	0.66	0.376
0.4	4	0.60	0.172
0.8	8	1.01	0.273

図 4 DZNep と HDAC 阻害薬 SAHA の非小細胞肺癌に対する増殖抑制効果の Combination index (CI) 解析

以上より、幹細胞シグナルの一つである EZH2 の抑制が NSCLC 細胞の増殖に重要な役割を果たし、共にエピジェネティクスを制御する HDAC との同時阻害によって、相乗的な抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

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 6 件)

Mizugaki H, Sakakibara-Konishi J, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, (他 7 名、7 番目). CD133 expression: a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Int J Clin Oncol* 2014;19:254-259. (査読あり)

DOI:10.1007/s10147-013-0541-x

Kikuchi J, Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi E, Shimizu Y, (他 5 名、3 番目). Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2012;78:138-143. (査読あり)

DOI:10.1016/j.lungcan.2012.08.003

Chiba S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Jinushi M (他 11 名、5 番目). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* 2012;13:832-842. (査読あり)

DOI: 10.1038/ni.2376

[学会発表](計 8 件)

Kinoshita I. Pharmacologic disruption of polycomb group protein EZH2 via 3-Deazaneplanocin A inhibits growth

of non-small cell lung cancer cells. 5th Asia Pacific Lung Cancer Conference, Hilton Fukuoka Sea Hawk, Fukuoka, November 26, 2012.

Kinoshita I. Role of polycomb group protein EZH2 in lung cancer. 第71回日本癌学会学術総会(招待講演), 教育文化会館, 札幌市, 2012年9月19日.

Kinoshita I. Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by the histone methyltransferase ezh2 inhibitor 3-deazaneplanocin. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋国際会議場, 名古屋市, 2011年10月3日.

Kinoshita I. Growth inhibition of non-small cell lung cancer cells by the histone methyltransferase ezh2 inhibitor 3-deazaneplanocin. 9th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care, Hokkaido University, Sapporo, September 30, 2011.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://medicaloncology.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 一郎 (KINOSHITA Ichiro)
北海道大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40343008

(2) 研究分担者

清水 康 (SHIMIZU Yasushi)
北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10374513

(平成23年度より研究分担者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：