

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461998

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌に対する J a k - S T A T 阻害剤による治療開発

研究課題名(英文) JAK-STAT inhibitor as a new drug for treatment of anaplastic thyroid cancer

研究代表者

藤田 知之 (FUJITA, TOMOYUKI)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：00419392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パクリタキセル(PTX)感受性甲状腺未分化癌(ATC)細胞株と、PTX耐性ATC細胞株を用い、JAK阻害剤が新規治療薬となる可能性について検証した。JAK阻害剤により耐性株、感受性株とも細胞増殖抑制効果が見られた。特に、AT9283(JAK2/3阻害剤)で抑制効果が高かった。また、耐性株、感受性株にPTX、JAK阻害剤を添加したところPTX添加では感受性株のみ、JAK阻害剤添加時は両株でIL-6が低下し細胞増殖と関連した。JAK阻害剤はATC治療の新たな薬剤になる可能性があること、IL-6はATCの薬剤効果判定のバイオマーカーになる可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Differences in cDNA microarray gene expression profiles before and after treatment with paclitaxel were analyzed in two ATC cell lines: KTA-3 cells, which are sensitive to paclitaxel, and TTA-2 cells, which are resistant to paclitaxel. Genes in the JAK-STAT pathway (KEGG classification) were downregulated significantly in KTA-3 cells compared with TTA-2 cells after treatment with paclitaxel. PAGE showed that BRCA1-related genes including JAK1, JAK2 and STAT3 were downregulated most significantly in KTA-3 cells compared with TTA-2 cells after paclitaxel treatment. Several JAK inhibitors inhibited cell growth in paclitaxel-resistant ATC cells. Also IL-6 was reduced by paclitaxel in KTA-3 cells and JAK inhibitors in both cells. JAK inhibitors may be new drugs for treatment of paclitaxel resistant ATC. IL-6 may be a potential biomarker for treatment of JAK inhibitors.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：甲状腺未分化癌 JAK-STAT経路 パクリタキセル感受性・耐性 JAK阻害剤 新規治療 標的治療

1. 研究開始当初の背景

甲状腺未分化癌は悪性度がきわめて高く、長年にわたり治療改善がなく、新たな治療の確立もなかった。薬物療法については、臨床試験も行われていたが、成果に乏しく、要因のひとつは未分化癌の特性を標的とした薬剤を開発していない点にあり、新たな治療薬の開発が課題であった。世界でも信頼できる規模の前向き研究はなく、日本では、甲状腺未分化癌に対する weekly パクリタキセルによる化学療法の認容性、安全性に関する前向き研究が 2012 年より開始された。そのため、甲状腺未分化癌に対するパクリタキセルの感受性および耐性に関連するバイオマーカーの探索を始めた。パクリタキセル感受性甲状腺未分化癌細胞株 KTA-3 と、パクリタキセル耐性甲状腺未分化癌細胞株 TTA-2 を用い、パクリタキセルを KTA-3 に添加する前後およびコントロールとしてパクリタキセルを TTA-2 に添加する前後のシグナル伝達系遺伝子プロファイルの差異をマイクロアレイにより抽出し、そのデータを公共のデータベースを用い解析することにより、甲状腺未分化癌に対するパクリタキセルの感受性および耐性に関連する遺伝子・パスウェイの同定をした。その結果、甲状腺未分化癌細胞株で、パクリタキセルにより JAK-STAT 系がダウンレギュレーションされることで、細胞増殖が抑制され、これらの変化が甲状腺未分化癌におけるパクリタキセル感受性のバイオマーカーになる可能性があることと、JAK-STAT 阻害が未分化癌の新たな治療になる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

甲状腺未分化癌治療に有効な新規薬剤をバイオマーカーとともに開発し、甲状腺未分化癌で苦しむ患者の予後改善に繋げること

3. 研究の方法

(1) リアルタイム RT-PCR 用遺伝子発現アッセイ Primer Array®を用い、パクリタキセル感受性甲状腺未分化癌細胞株 KTA-3 と、パクリタキセル耐性甲状腺未分化癌細胞株 TTA-2 を用い、パクリタキセルを KTA-3 に添加する前後およびコントロールとしてパクリタキセルを TTA-2 に添加する前後のシグナル伝達系遺伝子の mRNA 発現の差異を網羅的に解析した。

(2) KTA-3, TTA-2 に、5 種類の JAK 阻害剤を、濃度依存性に添加し WST-8 アッセイを行い、JAK 阻害剤による甲状腺未分化癌細胞株の細胞増殖抑制効果を検討した。

(3) JAK2 または JAK3 に依存したシグナル伝達なのかみるために、JAK2 阻害剤 (AZ960, TG101348, CEP-33779) および JAK3 阻害剤 Tofacitinib を、添加し WST-8 アッセイを行い、JAK 阻害剤による甲状腺未分化癌細胞株の細胞増殖抑制効果を検討した。

(4) KTA-3, TTA-2 にパクリタキセル存在下および非存在下で JAK 阻害剤を、濃度依存性

に添加し WST-8 アッセイを行い、パクリタキセル存在の有無における JAK 阻害剤による甲状腺未分化癌細胞株の細胞増殖抑制効果を検討した。

(5) KTA-3, TTA-2 に、パクリタキセルおよび AT9283 を、添加し ELISA 法により IL-6 を測定した。

(6) ウェスタンブロット法によるシグナル伝達および遺伝子群発現変動の解析

研究成果の発信

4. 研究成果

(図 1)

Well	Symbol	Ct			
		KTA-3 cont.	KTA-3 Pacl.	TTA-2 Cont.	TTA-2 Pacl.
A1	IL2RG	32.0	30.5	29.4	29.4
A2	JAK3	26.3	26.4	32.1	31.3
A3	CSF2RB	Undetermined	37.9	38.0	Undetermined
A4	IFNGR1	21.7	21.5	23.0	22.7
A5	IL6RA	Undetermined	39.6	39.5	37.4
A6	IL6R	30.1	31.0	29.8	28.3
A7	IL10	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
A8	IL15	24.4	24.2	24.5	24.3
A9	IL2	30.2	31.1	32.4	31.3
A10	IL6	18.9	19.0	22.9	22.8
A11	CNTF	27.3	27.7	27.5	27.2
A12	IL6	22.8	22.7	22.0	22.9
B1	IFNG	Undetermined	Undetermined	39.9	Undetermined
B2	IL10RB	22.5	22.5	23.3	23.0
B3	CSF3	18.7	18.9	29.5	27.0
B4	CSF3R	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
B5	IL2RB	32.0	34.5	32.7	32.3
B6	IL5	31.9	32.5	Undetermined	28.6
B7	IL7	22.4	22.4	23.5	23.2
B8	IL12A	26.1	26.7	25.2	25.8
B9	PRLR	28.6	29.0	24.0	23.3
B10	LEPR	26.3	26.2	25.1	24.2
B11	CREBBP	19.0	18.9	18.8	18.4
B12	HPRT1	19.1	19.1	20.0	19.6
C1	IL12RB2	26.6	26.6	39.7	37.0
C2	IL13RA1	19.6	19.6	21.2	20.7
C3	CCLND3	21.7	21.8	22.4	21.8
C4	CNTFR	37.5	37.6	37.7	36.3
C5	GRB2	19.3	19.8	19.5	19.1
C6	IFNA8	25.4	25.6	25.4	24.2
C7	IFNA16	25.4	25.9	26.6	26.2
C8	IL3RA	30.7	30.4	33.2	31.8
C9	IL7R	26.2	26.4	18.2	18.1
C10	IL9R	31.8	34.3	36.6	33.4
C11	IL13	36.3	36.4	34.3	33.5
C12	PGK1	17.8	17.8	18.3	18.2
D1	JAK1	18.0	18.0	18.4	18.0
D2	LIF	21.1	21.5	21.5	21.2
D3	MYC	20.3	21.1	21.6	21.4
D4	PIM1	24.8	25.1	26.0	25.2
D5	PTPN6	26.6	26.1	36.9	39.4
D6	PTPN11	17.9	18.1	19.1	18.3
D7	STAT4	26.3	27.2	27.9	27.3
D8	STAT2A	24.1	24.2	22.8	22.6
D9	TYK2	24.1	24.5	24.4	24.0
D10	STAM	19.3	19.3	20.1	19.5
D11	PIK3R3	23.6	23.4	24.0	23.4
D12	ACTB	14.2	14.3	14.3	14.3
E1	SOCS2	28.3	28.8	28.1	27.8
E2	OSMR	21.6	22.0	20.8	20.6
E3	SOCS6	20.7	20.3	21.5	20.9
E4	PIAS2	20.0	19.8	20.7	20.2
E5	JAK2	20.7	20.7	20.5	20.0
E6	PIK3CD	19.8	20.1	20.4	20.0
E7	PIK3R2	21.8	21.7	22.0	21.2
E8	CBL	21.2	21.2	21.2	20.8
E9	MPL	30.5	31.1	33.3	33.8
E10	STAT2	22.1	21.9	21.3	20.6
E11	IL12RB1	31.0	31.0	28.1	27.0
E12	GAPDH	14.3	14.3	14.6	14.6
F1	SOS1	26.9	26.7	27.6	27.1
F2	SPRY3	28.4	28.2	28.8	28.1
F3	SPRY1	32.1	32.4	32.6	33.7
F4	SPRY2	24.1	23.7	23.6	23.2
F5	ISGF3G	22.5	22.4	20.3	20.0
F6	PIAS3	22.8	22.7	22.4	21.4
F7	PIK3CB	24.0	24.1	24.4	24.0
F8	IFNA13	26.8	26.5	25.5	25.5
F9	SOS2	20.6	20.4	21.0	20.5
F10	CBLC	39.5	35.4	37.9	Undetermined
F11	STAT5B	21.5	21.6	21.8	21.5
F12	TBP	22.0	21.9	24.4	23.7
G1	CLCF1	24.6	24.3	25.1	24.5
G2	SOCS5	21.0	21.1	21.6	21.1
G3	PIK3R5	36.0	34.4	35.4	35.0
G4	IL20RA	32.0	33.0	33.9	34.1
G5	PIAS4	22.0	22.4	22.9	21.8
G6	PIAS1	19.9	19.6	20.1	19.2
G7	IL22RA1	27.2	26.9	28.3	27.2
G8	IL21R	29.7	29.3	32.7	32.4
G9	CRLF2	Undetermined	Undetermined	33.8	30.3
G10	SPRY4	26.3	25.8	26.2	25.2
G11	CCND1	19.6	20.0	18.2	18.1
G12	B2M	16.4	16.3	15.5	15.2
H1	TSLP	23.5	23.4	25.7	25.5
H2	STAT1	20.6	20.5	19.1	18.5
H3	IL23R	Undetermined	37.0	Undetermined	Undetermined
H4	CISH	27.2	27.1	28.2	27.5
H5	SPRED1	23.3	23.2	22.6	22.2
H6	CBLB	23.2	23.2	22.7	21.4
H7	IL28RA	24.8	24.6	28.1	28.3
H8	IL6ST	21.2	21.1	21.5	21.3
H9	PIK3R1	23.6	23.8	23.1	22.7
H10	AKT3	22.8	22.7	22.1	21.5
H11	SPRED2	22.8	22.7	22.4	22.1
H12	PPIA	15.0	15.0	15.1	15.1

(1) Jak-STAT 経路の発現、特に JAK1, JAK2,

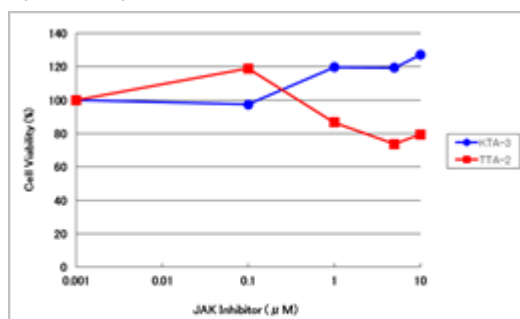
JAK3, STAT3, SOCS3 の発現変動が、パクリタキセルの感受性・耐性に重要であるというマイクロアレイによる解析の再現性が確認できた(図1)。また、薬剤耐性に関わる ABC-transporter や PTX の標的である B-tubulin や tau の発現に変動がないことも確認した。

(2) TTA-2, KTA-3 とともに JAK 阻害剤による細胞増殖抑制効果が見られ、特に、JAK2/3 阻害剤の AT9283 の細胞増殖抑制効果が高かった。

(3) JAK2 阻害剤である AZ960 による細胞増殖抑制効果が見られ、JAK2 を経由するシグナルに依存して活性化している可能性が示唆された。

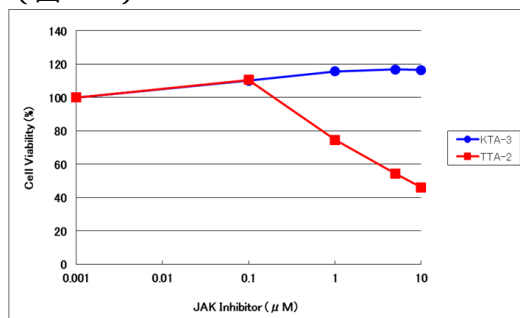
(4) パクリタキセル非存在下では JAK 阻害剤の効果は両細胞株とも認めなかった。KTA-3 の IC50 濃度のパクリタキセルを添加した場合、JAK 阻害剤により KTA-3 では変化がなかったが、耐性株 TTA-2 の細胞増殖阻害作用が認められた(図2A, 2B)。

(図2A)



w/o PTX

(図2B)



w/ PTX

(5) 細胞増殖阻害作用を認めた KTA-3 に対するパクリタキセルおよび AT9283 添加と TTA-2 に対する AT9283 添加では IL-6 がコントロールに比べ低下するのに対し、細胞増殖阻害を認めない TTA-2 に対するパクリタキセル添加では IL-6 の低下を認めなかった。

(6) PTX 感受性甲状腺未分化癌細胞株で JAK-STAT 経路の発現低下があり、パクリタキセル耐性株で JAK-STAT 経路が活性化したままであることを、ウェスタンブロット法により確認したが、予想される結果が得られな

かった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

藤田 知之、西村 基、藤森 実、甲状腺未分化癌細胞株において JAK 阻害剤は IL-6 を減少し細胞増殖を抑制する、第 48 回日本甲状腺外科学会学術集会、2015.10.29、青山ダイヤモンドホール(東京都・港区)

Fujita T, Sasaki T, Zheng Wang, Koshikawa K, Nishimura H, Sugitani I, Yoshida A, Fujimori M, JAK inhibitors as new drugs for treatment of paclitaxel-resistant anaplastic thyroid cancer, 106st American Associate for Cancer Research, 2015.4.20, Philadelphia, (U.S.A.)

藤田 知之、甲状腺未分化癌に対する JAK 阻害剤による新規治療開発研究、三大学セミナー、2015.02.16、東京医科大学茨城医療センター(茨城県・阿見町)

藤田 知之、越川 佳代子、西村 基、藤森 実、佐々木 貴之、甲状腺未分化癌に対する Jak 阻害剤による新規治療開発研究、第 174 回東京医科大学医学会総会、2014.11.01、東京医科大学病院(東京都・新宿区)

藤田 知之、越川 佳代子、西村 基、藤森 実、佐々木 貴之、甲状腺未分化癌に対する Jak 阻害剤による新規治療開発研究、第 173 回東京医科大学医学会総会、2014.06.07、東京医科大学病院(東京都・新宿区)

藤田 知之、西村 基、藤森 実、甲状腺未分化癌に対する Jak 阻害剤による新規治療開発研究、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014.04.03、国立京都国際会館(京都府・京都市)

藤田 知之、佐々木 貴之、藤森 実、甲状腺未分化癌に対する新規薬剤 JAK-STAT 阻害剤による効果の検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10.03、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

藤森 実、藤田 知之、西村 基、パクリタキセル耐性甲状腺未分化癌に対する JAK-STAT 阻害新規薬剤の開発、第 46 回日本甲状腺外科学会学術集会、2013.9.26、愛知県産業労働センター(愛知県・名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 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 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 知之(FUJITA, Tomoyuki)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：00419392

(2) 研究分担者

藤森 実(FUJIMORI, Minoru)
東京医科大学・医学部・兼任教授
研究者番号：00262725

(3) 連携研究者

()

研究者番号：