



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	JARID1阻害薬が、非小細胞肺癌の薬剤耐性に及ぼす効果の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	有賀, 伸
Description	配架番号 : 2571
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14168号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78907
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Shin_Ariga_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 有賀 伸

学 位 論 文 題 名

JARID1 阻害薬が、非小細胞肺癌の薬剤耐性に及ぼす効果の検討

(The effect of JARID1 family inhibitor on drug resistance against non-small lung cancer)

【背景と目的】肺癌は日本において最も死亡数が多い癌であり常に新しい治療薬が望まれている。

エピジェネティックな異常はがん細胞の遺伝子発現に変化をもたらし、抗がん薬に対する獲得耐性につながる可能性がある。また、抗がん薬に自然耐性であるがん細胞の存在も示唆されるが、そのようながん細胞にはがん幹細胞様細胞が含まれていると考えられる。エピジェネティクスは正常幹細胞の維持に重要な役割を担っているが、肺癌幹細胞様細胞においても同様かもしれない。今回我々はヒストン3の4番目のリジン(H3K4)のメチル化に注目した。H3K4 のトリメチル化(H3K4me3)は転写開始領域の周囲に存在している、遺伝子発現の活性化マーカーである。JARID1 ファミリーは、この H3K4me3 の脱メチル化酵素であり、特に JARID1a、JARID1b は肺癌を含む様々な癌腫との関連性が報告されている。しかし、JARID1 ファミリーの阻害薬の開発が難渋していたこともあり、JARID1 ファミリー阻害薬の肺癌細胞に対する効果の報告はほとんどなかった。また近年、標的治療を行った場合その薬剤に感受性の高い癌細胞が、複雑な分泌シグナル(セクレトーム)を産生し、それが薬剤耐性細胞の細胞増殖を促進するという報告がなされた。さらに、そのセクレトームの分泌は FRA1 という転写因子の発現の低下によって引き起こされることも報告された。FRA1 の活性化はエピジェネティックに制御されているという報告があり、JARID1 ファミリーもその制御に関与しているかもしれない。今回我々は、最近開発された JARID1 ファミリー阻害薬が肺癌細胞株に与える影響について検討した。

【材料と方法】細胞株は9つの肺癌細胞株と3つの正常肺上皮細胞株を用いた。薬剤はシスプラチン、パクリタキセル、ゲフィチニブ、オシメルチニブを使用した。また汎 JARID1 ファミリー阻害薬として PBIT (2-(4-methylphenyl)-1, 2-benzisothiazol-3 (2H)-one)を用いた。細胞増殖は MTT アッセイとコロニー形成アッセイで評価した。セクレトームの解析は ELISA で、蛋白発現はウェスタンブロット法で、ヒストンのメチル化の評価はクロマチン免疫沈降法を用いて評価した。

【結果】PBIT が非小細胞肺癌細胞株において用量依存性、時間依存性に H3K4me3 レベルを上昇させることを確認した。次に PBIT が非小細胞肺癌細胞株や正常肺上皮細胞株の増殖を抑制するか検討したところ、肺癌細胞株の IC50 は比較的高く、正常肺上皮細胞株との差はわずかだった。PBIT 単独で抗腫がん薬として用いるのは難しいと考え、PBIT が薬剤耐性細胞に与える効果について検討した。高濃度の抗がん薬に短期間曝露し生き残った細胞(persister 細胞)を薬剤耐性細胞として使用した。抗がん薬はそれぞれの細胞株に高い感受性を持つものを用いた(PC9、PC3、HCC827 はゲフィチニブ、H1975 はオシメルチニブ、H226 はシスプラチン、H460、A549、H1299 パクリタキセル)。Persister 細胞は曝露した抗がん薬に耐性であることを確認した。Persister 細胞は JARID1a、JARID1b のどちらか、または両方の発現が上昇していた。また H1975 の side population 細胞でも、JARID1a と OCT-4 の発現が上昇していた。次に、PBIT が persister 細胞に与える影響について検討した。コロニー形成アッセイで評価したところ、persister 細胞がコロニーを形成できたのは、PC9、HCC827、H1975、H226 の 4 つだった。それぞれ抗がん薬群、PBIT 群、抗がん薬と PBIT の併用群で 3 週間薬剤曝露を行ったところ、4 つの細胞株とも併用群で最もコロニー形成を抑制することができた。またこの 4 つの persister 細胞は H3K4me3 の発現の減少と OCT-4

の発現亢進を認めたが、PBIT を曝露することでその変化を打ち消された。PBIT が肺癌細胞株に与える別の機序として、転写因子 FRA1 の制御について検討した。EGFR-TKI 感受性細胞株(PC9、H1975)に EGFR-TKI 各々(ゲフィチニブ、オシメルチニブ)を曝露したものと、PBIT で前処置した(preP-)EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した細胞の FRA1 の発現を検討したところ、前者は FRA1 の発現が低下していたが、後者はその発現低下が打ち消されていた。また FRA1 のプロモーター領域における H3K4me3 のレベルをクロマチン免疫沈降法で検討したところ、前者は H3K4me3 レベルが低下していたが、後者はその低下が打ち消されていた。PBIT がセクレトームに変化をもたらすか検討するため、EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した後の馴化培養液(conditioned medium; CM)と、preP-EGFR-TKI 感受性細胞株に EGFR-TKI を曝露した後の CM を回収し、それぞれの培養液が EGFR-TKI 耐性の肺癌細胞株(EGFR 遺伝子野生型の肺癌細胞株または persister 細胞)の増殖を変化させるかを検討したところ、前者は細胞増殖を促進させたが、後者は細胞増殖を促進させなかった。IGF-1R 経路の活性化が EGFR-TKI 耐性に関与しているという報告が複数あるため、IGF-1 の濃度を測定したところ、細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中では濃度が上昇していたが、preP-細胞株に EGFR-TKI を曝露した CM 中ではその上昇が軽減されていた。PBIT が EGFR-TKI 耐性細胞の増殖を抑えるか検討するため、96 穴ウェルプレートを用いて少数の細胞からなる EGFR-TKI 感受性細胞グループを作り、EGFR-TKI±PBIT を 4 週間曝露したところ、PBIT 併用で耐性細胞出現数の減少を認めた。また PBIT 併用時の IGF-1R 経路の変化を検討したところ、その下流の活性化が PBIT 併用によって抑えられた。また、3D コロニー形成アッセイで PBIT 単剤を 4 週間曝露し、PBIT 単剤では(非足場依存性の)細胞増殖抑制効果を有さないことを確認した。

【考察】今回我々は、JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT が、薬剤耐性、特に EGFR-TKI 耐性の非小細胞肺癌に対して 2 つの機序で効果を及ぼすことを明らかにした。1 つ目は PBIT が癌幹細胞マーカーである OCT-4 を高発現している persister 細胞の薬剤感受性を回復させること、そして 2 つ目は PBIT が薬剤感受性細胞において FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を阻害し、FRA1 の発現の低下を抑えること、そして EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑え、耐性細胞の増殖を抑制することである。固形癌においては、がん幹細胞様細胞を標的とした治療の開発は非常に難航している。その理由の一つががん幹細胞様細胞の可塑性である。今回我々は、PBIT が persister 細胞における OCT-4 の発現上昇を抑え、また PBIT を抗腫瘍薬と併用することで persister 細胞の増殖を抑制することを示した。PBIT は肺癌のがん幹細胞様細胞の可塑性を克服できるかもしれない。標的治療の耐性機序は大きく 2 つに分類される。標的遺伝子の変化に代表されるオンターゲットによる耐性機序と、バイパスシグナル経路の活性化に代表されるオフターゲットによる耐性機序である。特に後者の克服は複雑である。今回我々が検討した IGF-1R 経路の活性化による耐性化の場合、IGF-1R 経路の阻害薬の併用によっても克服できる可能性がある。しかしバイパス経路にはさまざまなものが報告されており、単独経路の抑制では不十分である可能性が高い。理想は全ての活性化したバイパス経路を抑えることであるが、それを個別に行うことは困難である。今回我々は JARID1 阻害薬により抗がん薬感受性細胞において FRA1 がエピジェネティックに調整され、抗がん薬によるセクレトーム分泌が抑制されることを初めて報告した。この FRA1 発現低下の抑制と、それによるセクレトーム分泌の抑制はオフターゲットの耐性化を克服できる可能性を秘めていると考えられる。

【結論】JARID1 ファミリー阻害薬 PBIT は、薬剤耐性 persister 細胞の薬剤感受性を回復させる。また FRA1 のプロモーター領域の活性化マーカー H3K4me3 の脱メチル化を阻害し、薬剤感受性細胞において FRA1 の発現の低下を抑え、EGFR-TKI で誘導される IGF-1 を含むセクレトームを抑制することで、薬剤耐性細胞の増殖を抑制する。