

182. VRK1 阻害による卵巣癌治療戦略の新展開

玉内 学志

名古屋大学 医学部附属病院 産婦人科学講座

Key words : 卵巣癌, ルテオリン, 患者腫瘍由来モデル, VRK1

結 言

卵巣癌は婦人科領域において最も予後不良な癌種の一つであり、抗癌剤への容易な耐性獲得がその主因である。分子標的薬も次々に登場しているが、卵巣癌はこれら薬剤に対しても容易に耐性を獲得してしまうため、新規治療選択肢の構築は引き続きの課題である。VRK1 はセリン・トレオニンキナーゼの一種で、網羅的ノックダウンスクリーニングによって見いだされた卵巣癌の新規治療のターゲット遺伝子である [1, 2]。VRK1 は上皮間葉転換や腫瘍増殖、シスプラチン耐性に関連すると報告されているが、これまでには細胞株を用いた *in vitro* の検証しかなされておらず、今後ヒトへの臨床応用につなげるために、動物モデルを用いた検証が望まれていた。本研究では、筆者らが樹立した VRK1 を高発現する卵巣癌の患者腫瘍由来モデル (PDX) において、VRK1 を阻害するフラボノイドであるルテオリン [3, 4] の抗腫瘍効果やシスプラチン耐性解除効果を実証し、それらを引き起こす分子メカニズムを解明することを目的とした。

方 法

1. 卵巣癌細胞株に対するルテオリンの抗腫瘍効果

ルテオリンの卵巣癌に対する抗腫瘍効果を明らかとするため、卵巣癌細胞株である A2780 と ES2 に対して、IncuCyte® ZOOM を用いた細胞増殖アッセイと、Annexin V 染色を用いたアポトーシスアッセイを行った。

2. 卵巣癌患者腫瘍由来モデル (PDX) を用いたルテオリンの抗腫瘍効果

ルテオリンの *in vivo* における効能を明らかとするため、VRK1 を高発現する卵巣癌 PDX 腫瘍をヌードマウスに分割移植して擬似的担癌集団を作製し、ルテオリン投与による抗腫瘍効果と副作用の評価を行った。投与経路はルテオリン 50 ppm 混餌による経口投与とした。

3. ルテオリン抗腫瘍効果のメカニズム検証

ルテオリンの抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、A2780 と ES2 を用いてリン酸化アレイによる解析を行った。また、Western blot 法によってリン酸化アレイの結果を検証した。さらに、上記の動物実験で得られた腫瘍検体を用いて免疫組織学的な評価を行った。

結 果

1. 卵巣癌細胞株に対するルテオリンの抗腫瘍効果

卵巣癌細胞株にルテオリンを添加すると、用量依存性に細胞増殖が抑制された。フローサイトメトリーでは G2/M 期での細胞周期の停滞が認められた。タイムラプスを用いたアポトーシスアッセイでは、A2780 ではアポトーシス細胞が増加し、ES2 では増加しなかった。このことから、ルテオリンによる抗腫瘍効果メカニズムは、細胞分裂の阻害とアポトーシスの誘導であることが示唆されたが、アポトーシス誘導は細胞によって反応が異なることが示唆された (図 1)。

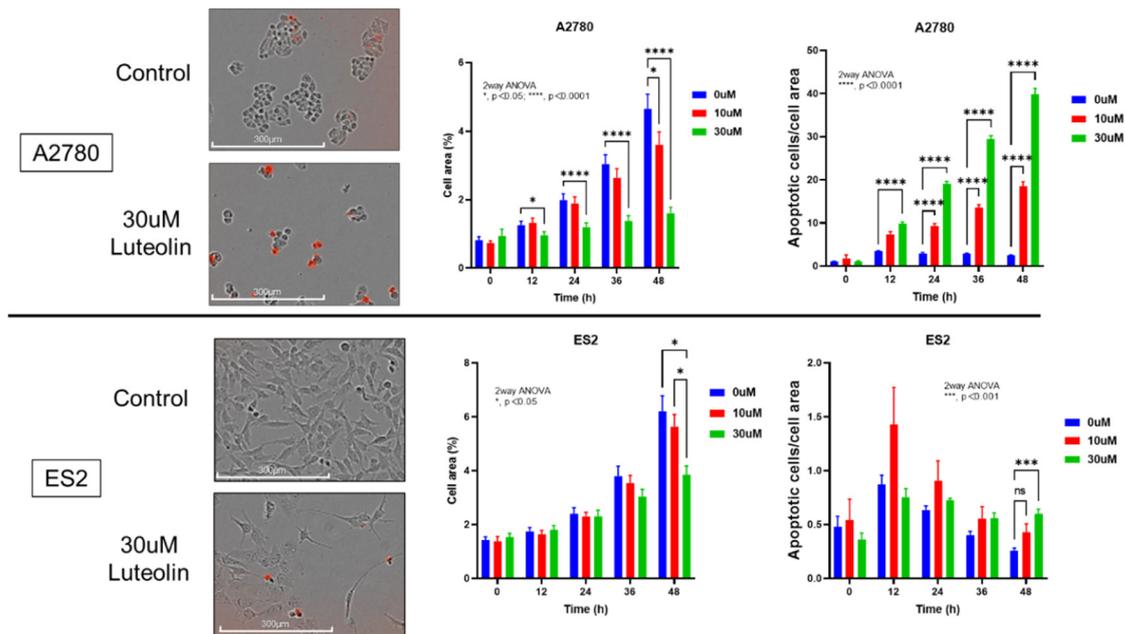


図1. 卵巣癌細胞株に対するルテオリンの抗腫瘍効果

卵巣癌細胞株にルテオリンを添加し、IncuCyte® ZOOMを用いた細胞増殖アッセイとアポトーシスアッセイを行った。

2. 卵巣癌患者腫瘍由来モデル (PDX) を用いたルテオリンの抗腫瘍効果

卵巣癌 PDX において 50 ppm ルテオリンを経口摂取することによって、コントロール群に比して腫瘍増殖が抑制された (図 2)。投与による体重減少などの副作用は認めなかった。

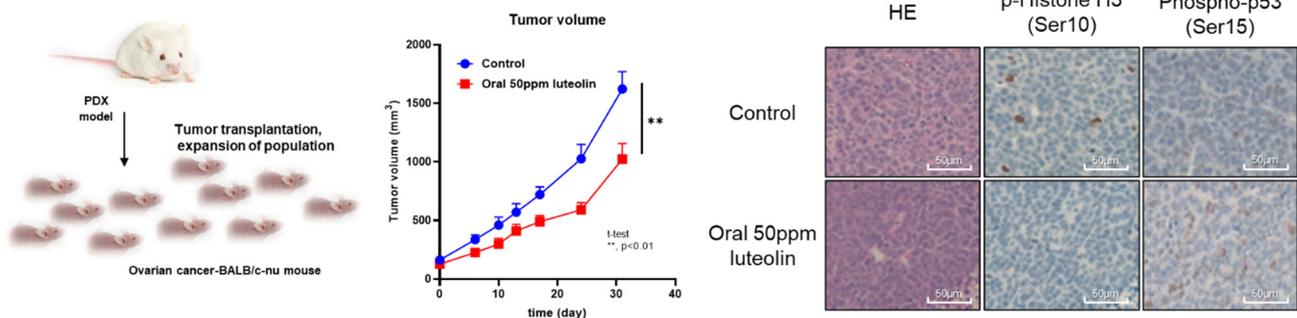


図2. 卵巣癌患者腫瘍由来モデル (PDX) を用いたルテオリンの抗腫瘍効果

当研究室で樹立・維持している卵巣癌PDX腫瘍を多数のヌードマウスに分割移植して、擬似的患者集団を作製した。2群に分け一方に50 ppmルテオリン混餌を、一方にコントロール飼料を摂取させ腫瘍径を経時的に測定した。

3. ルテオリン抗腫瘍効果のメカニズム検証

卵巣癌細胞株に対してルテオリンを添加することで、p53 のリン酸化の亢進が認められた。また、CREB のリン酸化の抑制が認められた。ウェスタンブロットにおいて、ルテオリン投与によって VRK1 の抑制と p53 のリン酸化の亢進が認められた。上記の PDX モデル腫瘍を免疫組織学的に評価すると、細胞分裂のマーカーであるヒストン H3 (Ser10) のリン酸化が抑制されていた。p53 のリン酸化も亢進しており、*in vitro* で確認された細胞増殖抑制効果が *in vivo* でも再現された (図 3)。

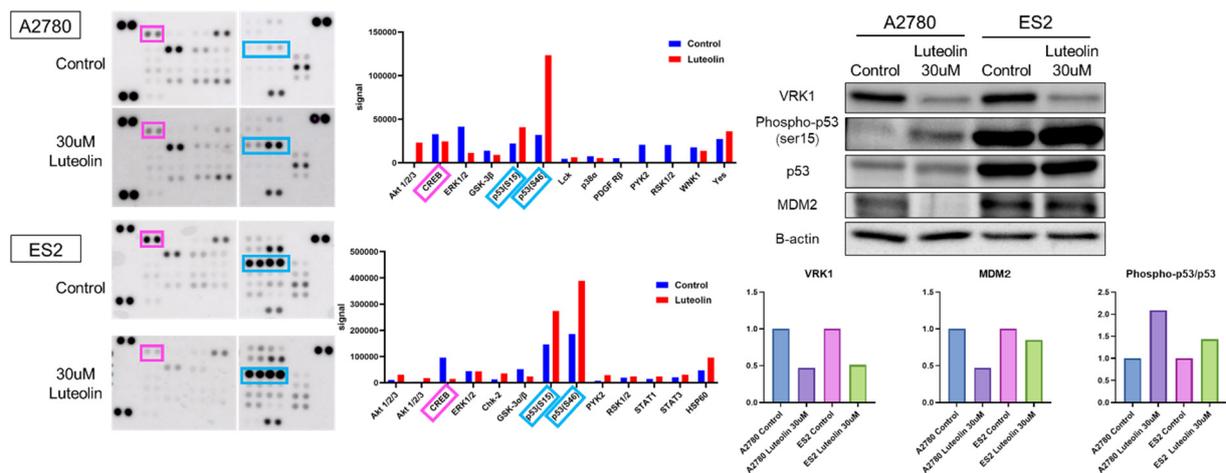


図3. ルテオリン抗腫瘍効果のメカニズム検証

卵巣癌細胞株にルテオリンを添加し、網羅的リン酸化アレイを行った。また、ウェスタンブロットングによってVRK1およびp53経路タンパクを評価した。

考 察

VRK1は、有糸分裂の開始に必須なセリン・トレオニンキナーゼの一つであり [5]、様々な癌種においてVRK1を標的とした新規治療の有望性が提唱されているが、特異的な阻害物質は未だ開発されていない。ルテオリンは緑黄色野菜に含まれるフラボノイドの一種であり、特異的ではないもののVRK1の発現を抑制する作用があることが報告されている [3, 4]。本研究は、卵巣癌において、VRK1抑制を介したルテオリンの抗腫瘍効果を示した初めての研究である。ルテオリンの抗腫瘍効果は他癌種ではいくつか報告されているが [6~8]、患者腫瘍由来モデルを用いて効果を示した点と、さらには50 ppm経口摂取という低用量で効果を示した点が、本研究が既報に優る点であると考えられる。本研究で用いたヌードマウスの体重は20~25 gで、餌を一日約3 g摂取するため、ルテオリン摂取量としては1日0.15 mgとなり、これを単純に50 kgの人間に換算するとルテオリン必要量は約400 mgとなる。ルテオリンはサプリメントとして30~100 mgが含有されるものが市販されているため、今後癌治療に応用するにあたっては実現可能範囲内の摂取量で効果が示されたと考えられる。

VRK1はDNAダメージに反応して活性化し、p53のリン酸化を介した細胞周期停止、DNA修復、アポトーシスを誘導することが知られている [9]。本研究ではリン酸化アレイによって、ルテオリンがp53のリン酸化を誘導することを初めて明らかにした。ルテオリンが誘導するp53のリン酸化は、VRK1を介したものであると考えられる。

DNA修復の観点から、VRK1の阻害は放射線や抗がん剤などのDNAダメージを誘導する治療との相乗効果が期待されている [9]。データの提示は割愛するが、卵巣癌PDXを用いた系においてシスプラチンとルテオリンを併用投与した群で治療効果の上乗せが認められた。また*in vitro*でも、シスプラチン耐性を有する卵巣癌細胞株において、シスプラチン耐性を解除する効果を確認している。既報ではVRK1の高発現がシスプラチン耐性化に関与することも報告されており [4]、ルテオリンは単独治療としてだけでなく、その他Conventional chemotherapyとの併用でも上乗せ効果を発揮する可能性が考えられる。また、本研究では担癌状態のマウスに対するルテオリンの効果を評価したが、初回治療終了後の維持療法にも活用できるかも知れない。進行卵巣癌の実臨床においては初回化学療法で寛解が得られた後も再発が必発であるが、再発までの期間を延長する目的で分子標的治療薬による維持療法が行われている。ルテオリンは殺細胞効果ではなくがん細胞の細胞分裂を制御する効果を有するため、このような維持療法のフェイズにおいても活用が可能と考えられる。現在PDXモデルを用いてシスプラチンで初回治療を行った後の維持療法として50 ppm混餌を摂取させ再発期間の延長効果を評価するアッセイを行っている。

謝 辞

本研究にご支援いただいた公益財団法人上原記念生命科学財団の皆様には厚く御礼申し上げます。実験をサポートしていただいた博士課程留学生の常統博雅さん、ご指導いただいた名古屋大学産婦人科腫瘍グループの皆様にも感謝申し上げます。

文 献

- 1) Baratta MG, Schinzel AC, Zwang Y, Bandopadhyay P, Bowman-Colin C, Kutt J, Curtis J, Piao H, Wong LC, Kung AL, Beroukhim R, Bradner JE, Drapkin R, Hahn WC, Liu JF, Livingston DM. An in-tumor genetic screen reveals that the BET bromodomain protein, BRD4, is a potential therapeutic target in ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015;112(1):232–237. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1422165112> PMID: 25535366
- 2) Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, Ansari R, Harper S, Jackson DA, McRae R, Pooley R, Wilkinson P, van der Meer D, Dow D, Buser-Doepner C, Bertotti A, Trusolino L, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, Yusa K, Garnett MJ. Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR–Cas9 screens. *Nature* [Internet]. Springer US; 2019;568(7753):511–516. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- 3) Kim YS, Kim SH, Shin J, Harikishore A, Lim JK, Jung Y, Lyu HN, Baek NI, Choi KY, Yoon HS, Kim KT. Luteolin suppresses cancer cell proliferation by targeting vaccinia-related kinase 1. *PLoS One*. 2014;9(10). PMID: 25310002
- 4) Liu ZC, Cao K, Xiao ZH, Qiao L, Wang XQ, Shang B, Jia Y, Wang Z. Vrk1 promotes cisplatin resistance by up-regulating c-MYC via c-Jun activation and serves as a therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(39):65642–65658. PMID: 29029460
- 5) Sun M, Heald R. A DNA Crosslinker Collects Mitotic Chromosomes. *Dev Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2017;42(5):440–442. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.010> PMID: 28898675
- 6) Zang M de, Hu L, Fan Z yuan, Wang H xiao, Zhu Z lun, Cao S, Wu X yan, Li J fang, Su L ping, Li C, Zhu Z gang, Yan M, Liu B ya. Luteolin suppresses gastric cancer progression by reversing epithelial-mesenchymal transition via suppression of the Notch signaling pathway. *J Transl Med* [Internet]. BioMed Central; 2017 Dec 27;15(1):52. Available from: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1151-6> PMID: 28241766
- 7) Iida K, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki S, Kato H, Nozaki S, Nagai T, Etani T, Nagayasu Y, Ando R, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. Luteolin suppresses bladder cancer growth via regulation of mechanistic target of rapamycin pathway. *Cancer Sci*. 2020;111(4):1165–1179. PMID: 31994822
- 8) Wu G, Li J, Yue J, Zhang S, Yunusi K. Liposome encapsulated luteolin showed enhanced antitumor efficacy to colorectal carcinoma. *Mol Med Rep*. 2018;17(2):2456–2464. PMID: 29207088
- 9) Campillo-Marcos I, García-González R, Navarro-Carrasco E, Lazo PA. The human Vrk1 chromatin kinase in cancer biology. *Cancer Lett* [Internet]. 2021 Apr;503:117–128. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383520307035> PMID: 33516791