

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10283

研究課題名(和文)細胞周期を標的としたCDK阻害剤による分子標的治療法の開発

研究課題名(英文)Antitumor effect of CDK inhibitor in mesothelioma

研究代表者

橋本 昌樹 (Masaki, Hashimoto)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：40461074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫細胞株に対するCDK 4/6 阻害剤 (PalbociclibとAbemaciclib) の抗腫瘍効果をWST-8 を用いて評価した。2剤ともに濃度依存性に細胞株の増殖抑制効果を認めた。Abemaciclib と放射線照射併用効果をBrdU Flow Kitを用いて細胞周期を測定した。コントロールと比較し、Abemaciclib投与、放射線照射は共にS期の減少を認め、Abemaciclib と放射線照射併用でさらにS期の減少を認めた。動物実験においてもAbemaciclib単独は放射線治療単独よりも抗腫瘍効果は弱かったが、Abemaciclib、放射線併用で腫瘍の増大は抑制された。

研究成果の概要(英文)：The WST-8 was used to evaluate the anti-tumor effects of CDK inhibitors (Palbociclib, Abemaciclib) in malignant pleural mesothelioma cell lines. Both agents inhibited the proliferation of cell lines in a concentration-dependent manner. The combined Abemaciclib and radiotherapy effects were assessed by measuring cell cycles, using the BrdU Flow Kit. Abemaciclib administration and radiotherapy application both resulted in more S phase reduction than in the control; the combined use of Abemaciclib and radiotherapy resulted in further S phase reduction. An animal experiment also revealed that although use of Abemaciclib alone resulted in weaker anti-tumor effects than radiotherapy alone, the combined use of Abemaciclib and radiotherapy completely suppressed subcutaneous tumor expansion.

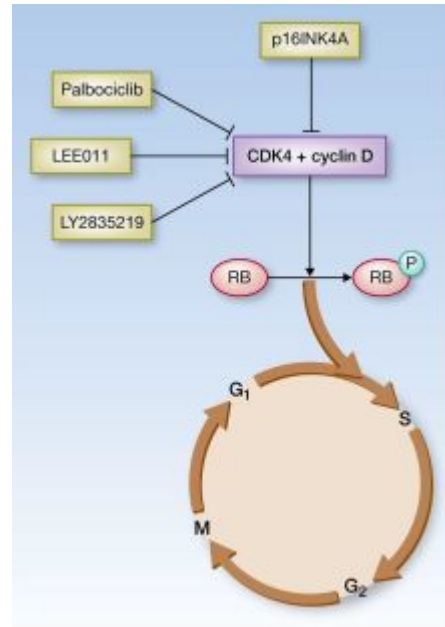
研究分野：呼吸器外科

キーワード：中皮腫

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫(MPM)はアスベストの暴露から 30 - 40 年後、壁側胸膜から発生する難治性の腫瘍である。現在、複数の施設で、MPM の検体を網羅的に検索し、BAP1, NF2 の遺伝子変異欠損が報告されるも明かな Oncogene 発見には至っていない。BAP1, NF2 とともに癌抑制に働き、それが失活することで MPM は発症すると考えられる。癌抑制遺伝子として P16 があげられるが、以前から MPM においては P16 が高頻度に欠損することが知られている。Cheng らは MPM 細胞株 40 株の DNA を PCR 増幅し、34 株(85%)に P16 ホモ欠損を認めた (Cancer Res 1994 54(21): 5547-5551)。Kratzke らは免疫染色で MPM12 検体すべて、15 細胞株すべてに P16 の異常を認めた(J Natl Cancer Inst 1995 87(24): 1870-1875)。Illei らの FISH による検討では上皮型 71 例中 49 例 69%、二相性 19 例中 16 例 89%、肉腫型 5 例中 5 例 100% で P16 ホモ欠損を認めた(Clin Cancer Res 2003 9(6): 2108-2113)。これらの報告にあるように MPM では高頻度に P16 が欠損している。細胞周期は M 期(分裂期) G₁ 期 S 期(DNA 合成期) G₂ 期から構成され、様々な因子で回転周期がコントロールされている。P16 遺伝子の INK4a の領域からは癌を抑制する蛋白 P16INK4a と P19ARF が産生される。P16INK4a は CyclinD- CDK4/6 を阻害し、RB のリン酸化(活性化)を抑制している。RB 蛋白は G₁ 期には転写因子 E2F と結合し自身の活性を抑えることで、細胞が DNA 合成を開始しないように抑制している。RB 蛋白がリン酸化すると E2F が解離し、自身が活性化し細胞は S 期(DNA 合成期)に移行し増殖を始める (Fig.1)。RB は細胞周期、細胞増殖においてブレーキをかけているが、MPM に高頻度で認められる P16 の欠損により CyclinD- CDK4/6 は活性化し、RB の活性化を招く。つまり、P16 欠損は RB のブレーキを失わせ、細胞周期が回り続け、細胞が増

殖する状態を引き起こす。



(Fig.1) 細胞周期における CyclinD- CDK4/6 と P16INK4a の関係 Dickson MA Clin Cancer Res 2014;20:3379-3383

2. 研究の目的

P16 欠損中皮腫、肺癌を標的とした治療効果を検証し、臨床試験への導入とすることが目的である。

1. 悪性胸膜中皮腫、肺癌細胞株に対する CDK4/6 阻害剤 (LY2835219, Palbociclib) の抗腫瘍効果確認
2. CDK4/6 阻害剤と放射線治療の併用効果の検討
3. P16, RB, pRB の発現と悪性胸膜中皮腫、肺癌手術患者の予後

3. 研究の方法

(a) WST-8 による薬剤抗腫瘍効果測定
悪性胸膜中皮腫細胞株で CDK 4/6 阻害剤の抗腫瘍効果を WST-8 にて評価した。CDK 4/6 阻害剤として Palbociclib と Abemaciclib を使用した。

(b) BrdU Cell Proliferation ELISA Kit
細胞増殖 ELISA/ BrdU 発色キットは増殖細

胞のゲノムDNA中に取込まれるBrdUを検出するため、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)によるDNA合成阻害を測定、評価した。

(c) 放射線照射との併用効果

悪性胸膜中皮腫細胞株に対するCDK4/6阻害剤(Abemaciclib)、放射線照射の併用効果をBrdU Flow Kitを用いて細胞周期を測定した。中皮腫細胞株をコントロール、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与、放射線照射、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与放射線照射併用に分け、BrdUを2時間作用させ、フローサイトメトリーにて細胞周期を測定した。

(d) 動物実験

皮下腫瘍にてCDK4/6阻害剤、放射線治療、CDK4/6阻害剤/放射線治療併用の比較試験を行った。

(e) RB, pRBの発現と悪性胸膜中皮腫の予後の検討

当科で施行した46例の悪性胸膜中皮腫に対する外科切除(胸膜肺全摘)検体を用いて免疫染色(Rb, phosphorylated Rb)を行い予後との相関を検討した。

4. 研究成果

(a) WST-8による薬剤抗腫瘍効果測定

PalbociclibとAbemaciclibの2剤ともに濃度依存性に細胞株の増殖抑制効果を認めたが、PalbociclibではIC50が15-30 μMであるのに対し、AbemaciclibではIC50 8-12 μMであり、以後の実験はAbemaciclibを使用した。

(b) BrdU Cell Proliferation ELISA Kit

1 μM投与にてH2052, H2452では、コントロールと比較し、1/5に減少。H211では、60%減少した。

(c) 放射線照射との併用効果

コントロールのG0/G1期、S期、G2+M期がそれぞれ49.3%, 17.7%, 18.4%であるのに対し、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与では61.1%, 0.6%, 21.1%放射線照射では42.8%, 3.6%, 36.8% CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与放射

線照射併用では54.4%, 0.3%, 32.7%であった。コントロールと比較し、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与、放射線照射でS期の減少を認め、CDK4/6阻害剤(Abemaciclib)投与放射線照射併用でさらにS期の減少を認めた。動物実験(皮下腫瘍)にてCDK4/6阻害剤、放射線治療、CDK4/6阻害剤/放射線治療併用の比較試験を行った。CDK4/6阻害剤単独は放射線治療単独よりも抗腫瘍効果は弱かったが、CDK4/6阻害剤/放射線治療併用で皮下腫瘍の増大は完全に抑制された。

(d) 動物実験

CDK4/6阻害剤単独は放射線治療単独よりも抗腫瘍効果は弱かったが、CDK4/6阻害剤/放射線治療併用で皮下腫瘍の増大は完全に抑制された。

(e) RB, pRBの発現と悪性胸膜中皮腫の予後の検討

Rb強発現とそれ以外の2群に分けるとMedian Survival timeはそれぞれ36.3ヶ月と5.0ヶ月(95% CI:9.4-63.2, 0.65-9.34 p=0.003)であった。リン酸化RBは予後との相関を認めず、RB蛋白強発現が予後不良であった。

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2件)

CDK4/6 inhibitor with radiation therapy in malignant pleural mesothelioma

Seiji Matsumoto, Hiroshi Doi, Toru Nakamichi, Ayumi Kuroda, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Seiki Hasegawa

American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2018

(Chicago, Illinois, USA)

平成 30 年 6 月 1 日 ~ 平成 30 年 6 月 5 日

The Significance of RB Expression in Malignant Pleural Mesothelioma in Multidisciplinary Treatment Including Extrapleural Pneumonectomy

Seiji Matsumoto, Toru Nakamichi, Ayumi Kuroda, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Seiki Hasegawa

American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2016 (Chicago, Illinois, USA)

平成 28 年 6 月 3 日 ~ 平成 28 年 6 月 7 日

〔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

橋本 昌樹 (HASHIMOTO, Masaki)
兵庫医科大学・医学部・助教
研究者番号：40461074

(2) 研究分担者

長谷川 誠紀 (HASEGAWA, Seiki)

兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：10252438

近藤 展行 (KONDOU, Nobuyuki)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：50402889

松本 成司 (MATSUMOTO, Seiji)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：60412011

多久和 輝尚 (TAKUWA, Teruhisa)
兵庫医科大学・医学部・講師
研究者番号：00412049

土井 啓至 (Doi, Hiroshi)
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：50529047