

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19701

研究課題名(和文) 悪性黒色腫に対する人血清アルブミン結合型微小管阻害薬の作用増強に係る基礎研究

研究課題名(英文) Synergic effect of paclitaxel protein-bound particles in malignant melanomas.

研究代表者

渡辺 彩乃 (Watanabe, Ayano)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：30740617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：進行期悪性黒色腫に対しては、化学療法、生物化学療法、放射線療法など複数のモダリティが試みられているものの、極めて予後不良である。本研究は、大部分の悪性黒色腫が有する抗チューブリン薬自然耐性に関して、詳細な分子機構を解明すると共に、BCL2 family 阻害薬との併用療法を悪性黒色腫の新規分子標的治療と位置づけ、前臨床試験を展開した。人血清アルブミン結合型微小管阻害薬はBCL2阻害薬との相乗効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma is refractory to antitubulin agents. Treatment of the paclitaxel-resistant cell lines combined paclitaxel protein-bound particles for injectable suspension with ABT-737, an inhibitor of BCL2 and BCLxL, or simultaneous knock-down of BCL2 and BCLxL dramatically increased the cells' sensitivity, while knock-down of MCL1, another member of the BCL2 family, had only a minimal effect. Our results demonstrated the new combination therapy for malignant melanomas.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 BCL2 paclitaxel 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

進行期悪性黒色腫に対しては、化学療法、生物化学療法、放射線療法など複数のモダリティが試みられているものの、極めて予後不良である。悪性黒色腫で高頻度に生じる活性型BRAF 変異 (V600E) はがん化の責任変異 (ドライバー変異) とされ、その阻害薬 (vemurafenib) は、新規分子標的治療薬として期待されている。しかし、日本人で多い末端黒子型黒色腫ではBRAF-V600E の変異が低いことに加えて、vemurafenib には扁平上皮癌の誘発リスクや血液脳関門での不透過性のため脳転移例での治療効果が望めない事などの欠点もあり、別経路による新規分子標的治療薬の開発が望まれている。

また、近年その有効性が注目されている免疫チェックポイント阻害薬も副作用の観点から休薬に追い込まれることも少なくない。

我々は以前から、悪性黒色腫の治療薬として抗チューブリン薬に着目してきた。大部分の悪性黒色腫は、脱重合阻害薬であるタキサン系抗がん薬 (paclitaxel) に自然耐性を示す。その原因は、paclitaxel の標的分子である微小管 (β -tubulin) のサブタイプが、paclitaxel と結合できない type III β -tubulin (TUBB3) で構成される事に起因していると考えられた (Akasaka K, et al. J Invest Dermatol, 2009)。しかし、この研究中に「抗チューブリン薬投与で、耐性の有無に関わらず、分裂中期での細胞周期の停止が一過的に誘導される黒色腫細胞株が複数存在する」ことに気づいた。

一般的に抗チューブリン薬は、紡錘体チェックポイント (SAC) を活性化することにより、細胞周期を分裂中期で停止させ (M 期停止)、その後アポトーシスを誘導する。従って抗チューブリン薬に対する耐性機構は、以下の2つに大別される。

阻害薬が微小管に作用せず、SAC が活性化

されないためM 期停止を生じない。

SAC の活性化 / M 期停止は誘導されるが、その後のアポトーシスを回避する異常が存在する。

TUBB3 の過剰発現は の経路による薬剤耐性であり、上記の一過的に細胞周期の停止が誘導される細胞では、 の「SAC 活性化後のアポトーシス回避機構が存在する」ことが示唆される。

さらに、悪性黒色腫を中心にMCL1 関連分子と抗チューブリン薬への感受性を予備的に検討し悪性黒色腫培養細胞株では卵巣癌などの他の腫瘍と異なり、FBXW7 の変異に基づくMCL1 の過剰発現や、arrest 後の分解異常は確認されない。BCL2 family (BCL2, BCLxL, MCL1) のうち、悪性黒色腫の持つ耐性と相関したのは、MCL1 ではなくBCL2 の過剰発現であった。

これらの結果は、悪性黒色腫の抗チューブリン薬耐性には、BCL2 の生存維持機構が重要な役割を担い、その阻害薬は抗チューブリン薬との併用で悪性黒色腫の新規分子標的治療法となる可能性がある事を示すものであった。

そこで、本研究課題では抗微小管薬 paclitaxel と組織停留性を向上させその効果を最大限に発揮させる目的で開発された人血清アルブミン結合型微小管阻害薬 (アブラキサン) を用いて、BCL2 阻害薬との相乗効果を検討した。

2. 研究の目的

本研究は、大部分の悪性黒色腫が有する抗チューブリン薬自然耐性に関して、詳細な分子機構を解明すると共に、BCL2 family 阻害薬との併用療法を悪性黒色腫の新規分子標的治療と位置づけ、前臨床試験を展開する。

3. 研究の方法

本研究では、悪性黒色腫細胞株における抗チューブリン薬誘導アポトーシスとその耐性に関わるpro-およびanti-apoptotic factorの同定を行い、抗チューブリン薬 + BCL2 family 阻害薬の併用効果に関するin vivoでの検証ならびに上記併用療法の個別化医療展開を目的としたバイオマーカーの探索研究へと展開する。

(1) 悪性黒色腫細胞株における抗チューブリン薬誘導アポトーシスとその耐性に関わる anti-apoptotic factor の同定

悪性黒色腫8株を用いた。このうち4株は、paclitaxel に抵抗性の株であった。これらの細胞株の BCL2 family の発現について western blot/real-time PCR で確認した。里細胞効果は ATP assay で検証し、細胞周期、apoptosis に関しては、flow cytometer, cleaved PARP ならびに casepase の出現で評価した。遺伝子の発現抑制は siRNA を用い、過剰発現系は CMV プロモーターによる過剰発現系のクローンを採取した。

BCL2 の阻害薬は、ABT737-263 を用いた。

(2) アブラキサンと ABT-263 を用いた、ヌードマウス xenograft での腫瘍縮小効果の検討。

Paclitaxel 抵抗性株を用いて xenograft を作成した。ABT-263 経口投与群と非投与群に分けて、paclitaxel を投与し腫瘍体積を計測した。

4. 研究成果

(1) 悪性黒色腫における BCL2 family の発現

Paclitaxel を投与し、その反応性を 24-72 時間で PI 染色による flow cytometer での細胞周期観察で評価した。Paclitaxel に抵抗性を示した細胞株では主に BCL2 の発現が亢進

していた(図1)。BCLxL に関しては、抵抗性と感受性の株間での違いは認められなかった。

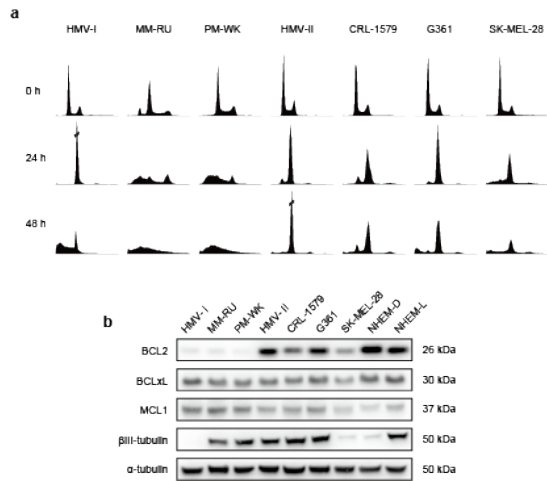


図1 BCL2 family 蛋白発現と paclitaxel 投与時の細胞腫期の変化。

肝銃声細胞では、96 時間でほぼ 90%以上の細胞が subG1 領域にあり。Apoptosis が誘導されているのがわかる。一方抵抗性を示す細胞は G2M 期での arrest が起こり、スリッページを示すものもある。

悪性黒色腫の mater 転写因子である MITF の下流で BCL2 の転写制御を受ける事が報告されていたので、この阻害薬ならびに発現抑制実験を展開した。

ABT-737/-263 とも薬剤抵抗性を示した細胞株で G2M arrest 後速やかに apoptosis を誘導した(図2)。

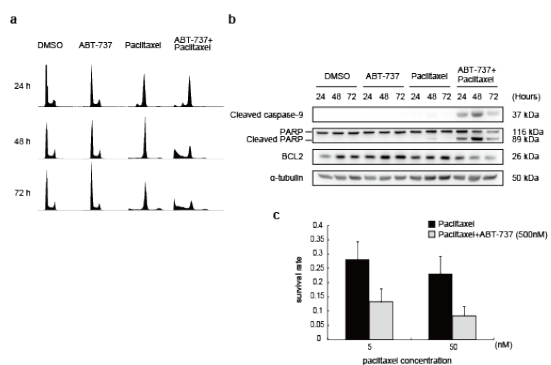


図2 paclitaxel 抵抗性株での ABT-737 の添加による合成致死効果。

BCL2 阻害薬は単独では殺細胞効果を示さないが、微小管阻害薬と併用すると apoptosis が誘導される。

抵抗性を示す細胞株では、ABT-737/-263 単独では細胞周期にいずれの効果も与えなかったが、paclitaxel との併用で約 4 割程度の殺細胞効果の上昇を確認できた。

今回使用した、ABT-737/-263 は BCL2 だけでなく、BCLxL についても阻害効果を有する事が報告されていたので、BCL2 ならびに BCLxL -siRNA 処理により同様の検討を行った。いずれの遺伝子発現抑制でも相乗効果が見られた (図 3)。

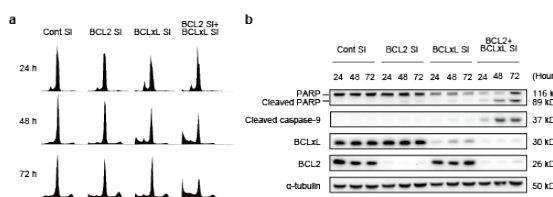


図 3 BCL2-, BCLxL-siRNA による paclitaxel の佐藤細胞効果の変動。

BCL2-, BCLxL-siRNA 処理により合成致死効果が誘導された。

脱重合阻害薬である vincristine についても同様の解析を行い。相乗効果を確認した (図 4)。

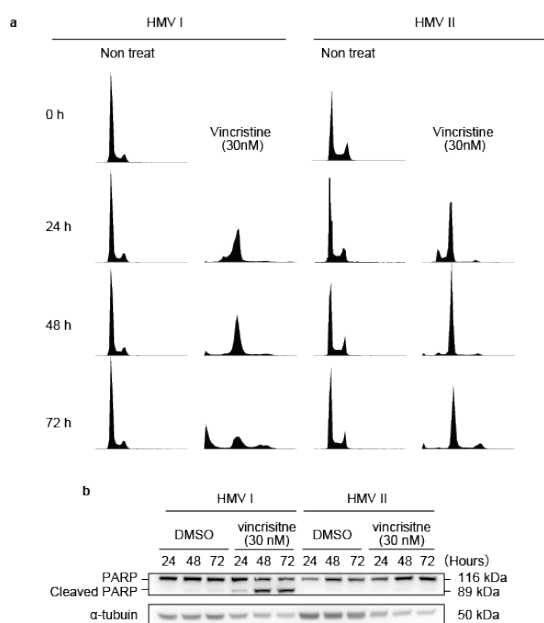


Figure S1

図 4 微小管重合阻害薬に殺細胞効果。

ヒト悪性黒色腫での BCL2 の免疫染色を行った約 42%の症例で BCL2 過剰発現を認めた (図 5)。

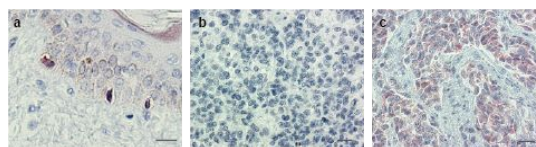


図 5 ヒト悪性黒色腫における BCL2 の発現。

臨床応用を目途に経口薬の市販されている ABT-263 (Nabiotoclax) についても同様の検討をおこなった。ABT-263 でも合成致死効果を認めた (図 6)。

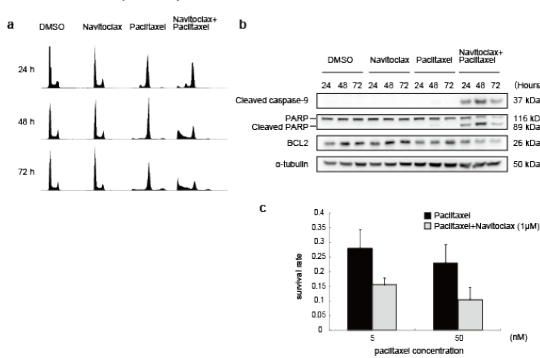


Figure S2

図 6 ABT-263 と paclitaxel との合成致死効果

感受性株から BCL2 過剰発現株を単離し同様の実験を行った。BCL2 overexpression 株では明らかに抵抗性が亢進していた (図 7)。

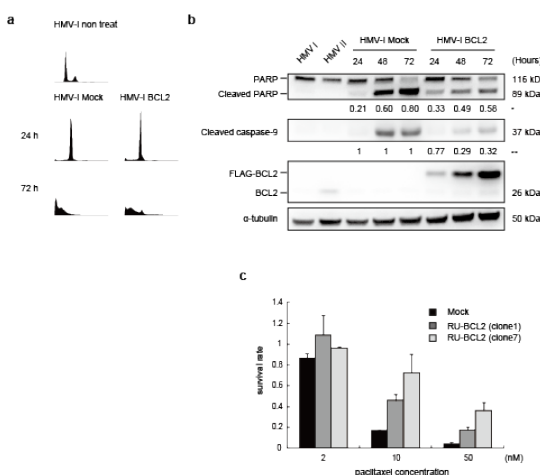


Fig 5

図 7 BCL2 過剰発現株による paclitaxel の感受性の検証

(3) Xenograft を用いた検討

ABT-263 とアブラキサンを併用した検討を BCL2 過剰発現株を用いて xenograft を作成し

検討したが有意の結果は得られなかった。

まとめ

BCL2 family 阻害薬は微小管阻害薬との併用により合成致死効果をもたらす可能性が示唆されたが、in vivo での有意な解析結果が得られなかった。今後投与経路、血中・組織中の有効濃度などの検証を行い、あらたな悪性黒色腫の治療への道筋を開きたい。

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 2 件)

Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. J Invest Dermatol. 2014 Feb;134(2):553-6. doi: 10.1038/jid.2013.343. (査読有り)

Kasai S, Sasaki T, Watanabe A, Nishiya M, Yasuhira S, Shibazaki M, Maesawa C. Bcl-2/Bcl-x_L inhibitor ABT-737 sensitizes pancreatic ductal adenocarcinoma to paclitaxel-induced cell death. Oncol Letter, in press. DOI: 10.3892/ol.2017.6211 (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 彩乃 (Watanabe Ayano)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：30740617

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()