

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：85306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21185

研究課題名(和文) PARP阻害剤併用による小細胞肺癌薬剤耐性の克服

研究課題名(英文) Combination therapy of parp inhibitor for overcoming small cell lung cancer drug-resistance

研究代表者

南 大輔 (Minami, Daisuke)

独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部)・呼吸器内科・医師

研究者番号：80727470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞肺癌細胞株であるSBC-3、およびそのシスプラチン耐性株であるSBC-3/CDDPを用いて、シスプラチン、PARP阻害剤(オラパリブ)の併用効果を検討した。SBC-3/CDDPではオラパリブとシスプラチンの併用療法は相乗効果、SBC-3では拮抗効果が認められた。次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析により、BRACA、BCL2L11、AKT、FGFR、NRG1、CCDC6、ATM、NF1、CHECK2などの遺伝子に変異が見つかった。小細胞肺癌患者における追加解析により、MAPK4、MYCNを含む多数の遺伝子に変異が見つかり、薬剤耐性機構に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effect of a combination of olaparib with cisplatin on small cell lung cancer, cisplatin-resistant cell line, SBC-3/CDDP (Cancer Sci.2013;104:78-84), was used. The combination showed a synergistic effect in vitro according to the combination index in SBC-3/CDDP cells, whereas SBC-3 cells exhibited an antagonistic effect. Immunoblotting assay did not reveal that SBC-3/CDDP cells exhibited higher levels of PARP1 than SBC-3 cells. Next-generation DNA sequencer showed several mutations such as BRACA, BCL2L11, AKT, FGFR, NRG1, CCDC6, ATM, NF1, and CHECK2 in SBC-3/CDDP. In a patient with small cell lung cancer, mutations such as MAPK4 and MYCN in recurrent tumor after chemotherapy including cisplatin were found.

研究分野：肺癌

キーワード：小細胞肺癌 PARP阻害剤

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：85306
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：平成 27 年度～平成 29 年度
 課題番号：15K21185
 研究課題名（和文） PARP 阻害剤併用による小細胞肺癌薬剤耐性の克服
 研究課題名（英文） Overcoming drug-resistance by combination with PARP inhibitor in small cell lung cancer
 研究代表者
 南 大輔（MINAMI DAISUKE）
 独立行政法人国立病院機構岡山医療センター（臨床研究部）
 研究者番号：8072747

研究成果の概要（和文）：

小細胞肺癌細胞株である SBC-3、およびそのシスプラチン耐性株である SBC-3/CDDP を用いて、シスプラチン、PARP 阻害剤（オラパリブ）の併用効果を検討した。SBC-3/CDDP ではオラパリブとシスプラチンの併用療法は相乗効果、SBC-3 では拮抗効果が認められた。次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析により、BRACA、BCL2L11、AKT、FGFR、NRG1、CCDC6、ATM、NF1、CHECK2 などの遺伝子に変異が見つかった。小細胞癌患者における追加解析により、MAPK4、MYCN を含む多数の遺伝子に変異が見つかり、薬剤耐性機構に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the effect of a combination of olaparib with cisplatin on small cell lung cancer, cisplatin-resistant cell line, SBC-3/CDDP (Cancer Sci.2013;104:78-84), was used. The combination showed a synergistic effect *in vitro* according to the combination index in SBC-3/CDDP cells, whereas SBC-3 cells exhibited an antagonistic effect. Immunoblotting assay did not reveal that SBC-3/CDDP cells exhibited higher levels of PARP1 than SBC-3 cells. Next-generation DNA sequencer showed several mutations such as BRACA, BCL2L11, AKT, FGFR, NRG1, CCDC6, ATM, NF1, and CHECK2 in SBC-3/CDDP. In a patient with small cell lung cancer, mutations such as MAPK4 and MYCN in recurrent tumor after chemotherapy including cisplatin were found.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌，シスプラチン耐性，PARP 阻害剤，オラパリブ

1. 研究開始当初の背景

肺癌の約 15-20%を占めるとされる肺小細胞癌（SCLC）は神経内分泌系の分化と小型の細胞形態を特徴とする。臨床的には増殖、転移能が高く、抗癌剤に対しては高感受性ではあるものの再発しやすいため増悪後の獲得耐

性現象が実臨床で大きな問題となっている。PARP 阻害剤は DNA 損傷応答基礎研究の臨床応用において大きなインパクトをもたらした薬剤であり、PARP 阻害薬の 1 つであるオラパリブは生殖細胞系 BRCA 遺伝子変異陽性の進行卵巣がんの治療薬として FDA から 2014 年に承認を得た。

2. 研究の目的

申請者等は、癌抑制遺伝子の1つである PTEN 遺伝子を導入およびノックダウンした肺癌細胞株 (H1650、H1650/PTEN 遺伝子導入:H1650 PTEN+, PC-9、PC-9/PTEN 遺伝子ノックダウン: PC-9PTEN-) のマウス皮下腫瘍モデルを作製し、DNA 障害性抗癌剤であるシスプラチンと PARP 阻害剤であるオラパリブの併用が有用であることを確認した。

(Mol Cancer Res 2013;11(2):140-8)。これまで申請者等の教室では、SCLC 細胞株である SBC-3 のシスプラチン、イリノテカンの活性代謝体 (SN-38)、エトポシドおよびアドリアマイシンなどの殺細胞性抗癌剤における耐性株 (SBC-3/CDDP、SBC-3/SN-38、SBC-3/ETP、SBC-3/ADM) を樹立し (Cancer Sci. 2013;104(1):78-84) 耐性打破の検討をしてきたが、臨床的には困難なことを実感してきた。SCLC 治療の大幅な進歩を目指すには、これまでの抗癌剤に加えて分子標的薬の導入は必須であり、SCLC の耐性打破の可能性を追求するために DNA 損傷応答に関連する PARP 阻害剤に注目して本研究を考案した。

3. 研究の方法

岡山大学で樹立された小細胞肺癌細胞株である SBC-3 とそのシスプラチン耐性株である SBC-3/CDDP を用いて (Cancer Sci. 2013;104:78-84)、シスプラチンと PARP 阻害薬 (オラパリブ) の単剤および併用効果を検討する。各薬剤における細胞増殖抑制効果を MTT アッセイ法により算出し、併用効果を combination index で評価する。親株と耐性株の PARP1 発現を免疫プロット法で検討し、また SBC-3 および SBC-3/CDDP より DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてゲノム塩基配列を比較する。さらに小細胞癌患者における手術検体 (治療前) および同一患者の CT ガイド下針生検検体 (シスプラチンを含む治療後の再発骨転移病巣) より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム塩基配列情報を取得する。

4. 研究成果

SBC-3 の 50% 増殖抑制濃度 (IC50) 値は、シスプラチン $0.97 \pm 0.68 \mu\text{M}$ 、オラパリブ $22.27 \pm 5.30 \mu\text{M}$ であり、SBC-3/CDDP の IC50 値はシスプラチン $5.20 \pm 0.79 \mu\text{M}$ 、オラパリブ $9.80 \pm 4.20 \mu\text{M}$ であった (表 1)。

<i>in vitro</i> における cisplatin, olaparib の効果		
Drug sensitivity (IC ₅₀)		
Cell line	Cisplatin (μM)	Olaparib (μM)
SBC-3	0.97 ± 0.68	22.27 ± 5.30
SBC-3/CDDP	5.20 ± 0.79	9.80 ± 4.20

IC₅₀, 50% inhibitory concentration; SD, standard deviation
P < 0.05 (Student's t-test)

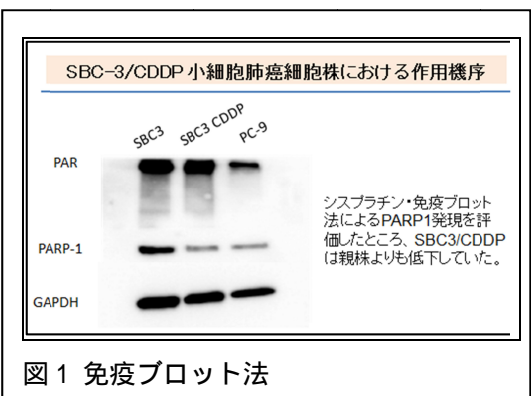
表 1 MTT アッセイ法

Combination index により、SBC-3/CDDP ではオラパリブとシスプラチンの併用療法は相乗効果、SBC-3 では拮抗効果が認められた (表 2)。既報 (Cancer Res 2013;73(7):2271-80) のシスプラチン耐性非小細胞肺癌細胞株の PARP1 は親株と比べて高発現であったが、SBC-3/CDDP ではむしろ低下していた (図 1)。

<i>in vitro</i> における cisplatin, olaparib の併用効果			
SBC-3 cells		SBC-3/CDDP cells	
Concentration ratio (molar) of cisplatin to olaparib	1:2	Concentration ratio (molar) of cisplatin to olaparib	1:2
CI	1.85	CI	0.20

CI: Combination index

表 2 Combination index



また、SBC-3 および SBC-3/CDDP より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム塩基配列情報を取得した。網羅的遺伝子解析により、BRACA、BCL2L11、AKT、FGFR、NRG1、CCDC6、ATM、NF1、CHECK2 などを含む多数の遺伝子に変異が見つかった。臨床検体においても同様の検討を行った。小細胞癌患者における手術検体 (治療前) および同一患者の CT ガイド下針生検検体 (シスプラチンを含む治療後の再発骨転移病巣) より DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム塩基配列情報を取得した。網羅的遺伝子解析により、MAPK4、MYCN を含む多数の遺伝子に変異が見つかり、薬剤耐性機構に関連していることが

考えられた(表3)

次世代シーケンサーによるゲノム塩基配列情報	
SBC-3小細胞肺癌細胞株	
SBC-3/CDDP小細胞肺癌細胞株 CDDP耐性株	
CHEK2	
AXIN1	
EGFRQ	
NRG1	
SMARCA4	
小細胞肺癌 治療前 入検体	MAPK4
小細胞肺癌 治療後(CDDP含む) 再発検体	MYCN

表3 ゲノム塩基配列情報

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Minami D, Takigawa N, Morichika D, Kubo T, Ohashi K, Sato A, Hotta K, Tabata M, Tanimoto M, Kiura K. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial biopsy with or without a guide sheath for diagnosis of lung cancer. *Respir Investig.* (査読有) 53 (2015)93-97.

Minami D, Nakasuka T, Ando C, Iwamoto Md Y, Sato K, Fujiwara K, Shibayama T, Yonei T, Sato T. Bronchoscopic diagnosis of peripheral pulmonary lung cancer employing sedation with fentanyl and midazolam. *Respir Investig.* (査読有)55(2017)314-317.

Kudo K, Ohashi K, Makimoto G, Higo H, Kato Y, Kayatani H, Kurata Y, Takami Y, Minami D, Ninomiya T, Kubo T, Ichihara E, Sato A, Hotta K, Yoshino T, Tanimoto M, Kiura K. Triplet therapy with afatinib, cetuximab, and bevacizumab induces deep remission in lung cancer cells harboring EGFR T790M in vivo. *Mol*

Oncol. (査読有) 11(2017)670-681.

〔学会発表〕(計1件)
第15回日本臨床腫瘍学会学術集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)
取得状況(計0件)
〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

南 大輔(MINAMI DAISUKE)
独立行政法人国立病院機構岡山医療センター(臨床研究部)
研究者番号:80727470

(2)研究分担者

木浦 勝行(KIURA KATSUYUKI)
岡山大学・岡山大学病院・教授
研究者番号:10243502

(3)連携研究者

瀧川 奈義夫(TAKIGAWA NAGIO)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号:60325107