

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09540

研究課題名(和文) がん化学療法に伴う好中球減少とNAMPT活性およびSIRT1遺伝子に関する検討

研究課題名(英文) A Clinical study on activity of NAMPT and SIRT1 gene expression in neutropenia with cancer chemotherapy

研究代表者

津端 由佳里 (Tsubata, Yukari)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・講師

研究者番号：50643417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：基礎研究として、ヒト肺癌のcell lineであるA549、ヒト乳癌のcell lineであるMCF7がvitamin B3の大量投与に対し、忍容性を有するか検討した。VB3存在下で各細胞をインキュベートし、WST-8 assay法を実施した。結果は、学会発表および論文上で明らかにする予定である。

臨床研究として、肺癌患者におけるがん化学療法に伴う好中球減少とNAD+-SIRT1経路の関連に関する検討を実施した。肺がん患者を症例登録し、検体を採取した。東京理科大でのSIRT1遺伝子発現、テロメラーゼ活性測定の再現性・精度管理は問題なく行われ、現在検体を送付し測定を進めていただいている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん化学療法に伴う好中球減少は、抗癌剤治療を遅延なく、かつ用量を減量することなく実施するうえで最大のハードルとなる。したがって、臨床医は、常に患者の好中球減少に注意を払うことが必要であるが、現時点で治療開始前の好中球減少の患者側リスク因子は明らかでない。本研究は化学療法前のNAMPT活性測定が好中球減少の予測因子となり得るか否かを検討する重要な意義を持つ。がん化学療法実施前のNAMPT活性測定が好中球減少のpredictive markerとなることが証明できれば、将来的には治療開始前のNAMPT活性によって、リスク別に予防を行うpersonalized medicineの実施が可能である。

研究成果の概要(英文)：As a basic study, we examined whether A549, a human lung cancer cell line, and MCF7, a human breast cancer cell line, are tolerant to high doses of vitamin B3. Each of these cells was subjected to the WST-8 assay in the presence of VB3. The results will be disclosed in conference presentations and papers.

As a clinical study, we investigated the association between neutropenia and NAD+-SIRT1 pathway associated with cancer chemotherapy in lung cancer patients. The patients were registered, and samples were collected. The reproducibility and accuracy control of SIRT1 gene expression and telomerase activity measurement at Tokyo University of Science have been carried out without any problems, and we are currently sending samples for measurement.

研究分野：oncology

キーワード：chemotherapy neutropenia

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法に伴う好中球減少は、抗癌剤治療を遅延なく、かつ用量を減量することなく実施するうえで最大のハードルとなる。治療を受ける患者にとって高度の好中球減少やその遷延は予定していた治療の遅延を意味し、さらに、発熱性好中球減少症 (Febrile neutropenia; FN) は患者の生命の危機に関わる臨床上重要な問題である。したがって、がん化学療法を担当する臨床医は、常に患者の好中球減少に注意を払うことが必要となる。しかしながら、現時点で治療開始前の好中球減少の患者側リスク因子は明らかでなく、その危険性を予測することは困難である。

一方で、近年、“長寿遺伝子”と名付けられた SIRT 遺伝子は、2 型糖尿病において肝臓での糖新生などの代謝を調節し、コレステロールの代謝にも関わっていることが知られている。さらにサーカディアンリズムにも影響を与え、生体の恒常性維持に深く関わるとの報告が多数見受けられる。SIRT 遺伝子のプロモーターとして最も知られている経路は NAMPT が媒介する、NAD<sup>+</sup>-SIRT1 経路である。2009 年の Nature Medicine で Skokowa らは NAMPT 活性が G-CSF による好中球分化に必須であり、実際に NAMPT と NAD<sup>+</sup> および SIRT1 遺伝子の活性化が骨髄分化に関わることも *in vitro* で証明した。また、健常人にその基質である vitamin B3 (nicotinamide; VB3) を大量に投与すると好中球数が増加することを報告 (Skokowa J et al, Nature Med, 15;151-158, 2009) した。

これらのことから、化学療法後に高度の好中球減少を認める症例では、何らかの原因で NAD<sup>+</sup>-SIRT1 経路が抑制されている、もしくは基質となる VB3 が欠乏している可能性があるとの仮説を立て、我々はまず、初回化学療法を受ける肺癌患者 21 例および健常ボランティアを対象に化学療法前後の血中 NAMPT 活性、VB3 濃度、単核球の SIRT1 遺伝子発現を測定し、患者背景および好中球減少の重症度との関連を世界で初めて検討した。その結果、CTCAE v4.0 による Grade 4 好中球減少を認めた患者では、減少を認めなかった患者と比較して有意に治療開始前の血漿中 NAMPT 活性が低く、nadir での SIRT1 遺伝子発現の上昇が認められなかった。また、がん患者は健常者と比較し血漿中の NAMPT 活性が有意に高いという結果であった。この結果は、治療前の NAMPT 活性測定は好中球減少の予測因子となり得ることを示唆しており、2015 年 7 月に第 13 回日本臨床腫瘍学会学術集会以て報告し、現在投稿準備中である。さらに、非小細胞肺癌を含むいくつかのがん腫では、細胞内 NAMPT 活性と SIRT1 遺伝子発現が予後や化学療法抵抗性に関連するとの報告 (Shackelford RE Genes & Cancer 2013, Folgueira MA Clin Cancer Res 2005, Zhang T PLOS ONE 2013) がある。我々の上記の研究結果はこれらの報告と一致するものであり、がん患者における NAD<sup>+</sup>-SIRT1 経路の役割を解明することは、好中球減少の予測のみならず抗癌剤耐性化機構の解明にもつながる可能性がある。

以上のことより、今回の研究をさらに発展させるためには、患者背景を均一にした大規模な臨床研究の実施が必須と考え、乳癌術後補助化学療法を受ける患者および手術不能局所進行・転移性肺癌の患者を対象に、化学療法に伴う好中球減少と NAMPT 活性および SIRT1 遺伝子発現との関連について検討する。また、NAMPT 活性の低下ががん化学療法における好中球減少のリスクと考えられるため、NAMPT の基質である VB3 の大量投与が好中球減少の予防に有効な可能性がある。よってヒト肺癌・乳癌細胞株に VB3 を投与し、その影響を検討することで好中球減少の予防方法の提案を目指す。

### 2. 研究の目的

Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) 活性は G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) による好中球分化に必須であることが知られている。がん化学療法後の好中球減少における NAD<sup>+</sup>-SIRT1 (SIRT) 1 pathway の役割を解明し、NAMPT 活性と SIRT1 遺伝子発現が、がん化学療法後の好中球減少の予測因子となり得ることを検証する。また、NAMPT の基質である vitamin B3 の大量投与が、好中球減少の予防に有効か否か肺癌・乳癌の細胞株を用いて探索する。

### 3. 研究の方法

#### 【臨床研究】

<乳癌・肺癌患者におけるがん化学療法に伴う好中球減少と NAMPT-SIRT1 経路の関連に関する検討>

乳癌・肺癌患者を対象とした多施設共同・大規模臨床研究を実施する。

対象 A: 乳癌術後化学療法で AC, EC, FEC の投与を受ける患者

対象 B: 切除不能局所進行・転移性肺癌に対し化学療法を受ける患者

試験方法: 登録患者から化学療法開始前、nadir および 2 コース開始前に採血を行い、NAMPT 活性、VB3 濃度、SIRT1 遺伝子発現、テロメラゼ活性を測定するとともに骨髄抑制の強度および FN 発症の有無を記録する。

予定登録数: 乳癌 200 例 (順天堂大学、岩手医科大学)、肺癌 100 例 (島根大学)

研究期間: 症例登録は倫理委員会承認後から 2018 年 3 月まで、測定解析にその後 1 年間で予定

する。

測定方法:採血は血清分離用試験管および単核球分画用試験管にそれぞれ 2ml 採取する。単核球分画用試験管に採血した血液は速やかに遠心分離し、血漿成分と単核球分画に分離し、RNA 安定化剤を添付したのち-80℃ に保存する。保存された試料は匿名化して研究協力施設(東京理科大学薬学部)に送付する。血漿中の NAMPT 活性、テロメラーゼ活性は ELISA で、SIRT1 はデジタル PCR を用いて測定を行う。血清分離用試験管は、できるだけ速やかに血漿と血球成分に分離する。血漿中の VB3 濃度測定および CBC 計測を株式会社エスアールエルに委託する。

本臨床研究は、島根大学を中心に順天堂大学、岩手医科大学、東京理科大学で行う多施設共同研究である。研究事務局を島根大学内科学講座医呼吸器・臨床腫瘍学内へ置き、登録患者のデータ管理を 1 名の技能補佐員が、採血した患者血液の処理と保管を島根大学・順天堂大学・岩手医科大学の大学院生それぞれ 1 名が分担する。

東京理科大学では ELISA を用いた血漿中の NAMPT 活性、テロメラーゼ活性の測定およびデジタル PCR を用いた SIRT1 遺伝子発現の測定方法確立を 2 名の大学院生が分担する。

#### 【基礎研究】

VB3 内服が好中球減少の予防方法となり得るか否かに関し、基礎的な検討を行う。具体的には VB3 大量投与ががん細胞の増殖に及ぼす影響を、ヒト肺癌の cell line である A549、ヒト乳癌の cell line である MCF7 を用い検討する。

## 4. 研究成果

#### 【基礎研究】

ヒト肺癌の cell line である A549、ヒト乳癌の cell line である MCF7 に対し、VB3 存在下でインキュベートし、WST-8 assay 法を実施した。結果は、学会発表および論文上で明らかにする予定である。

#### 【臨床研究】

<乳癌・肺癌患者におけるがん化学療法に伴う好中球減少と NAMPT-SIRT1 経路の関連に関する検討>

1) 乳癌・肺癌患者におけるがん化学療法に伴う好中球減少と NAD<sup>+</sup>-SIRT1 経路の関連に関する検討: 肺がん患者を対象とした多施設共同臨床研究実施のため、「肺癌に対する化学療法に伴う好中球減少と NAMPT 活性および SIRT1 遺伝子発現に関する検討」は、平成 28 年度に当院倫理委員会で承認を得た(島根大学医の倫理委員会 第 2574 号)。

2) 乳がんを対象とした臨床試験については、共同研究先である順天堂大学との連携ががんプロフェッショナル養成プランの終了とともに困難となり、実施できなかった。

3) 肺癌を対象とした臨床試験: 1) に記載した臨床試験に関して、登録を推進したが、肺がん化学療法の主体が細胞障害性抗がん剤から免疫チェックポイント阻害剤へシフトし、適格基準を満たす対象症例がほとんどなく、症例の集積は 17 症例にとどまった。

4) 共同研究先である、東京理科大での SIRT1 遺伝子発現、テロメラーゼ活性測定の再現性・精度管理は問題なく行われ、現在検体を送付し測定を進めていただいている。

データ解析終了後、学会発表・論文報告を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯部 威  (Isobe Takeshi)  (70284198)	島根大学・医学部・教授    (15201)	
研究分担者	堀口 道子  (Horiguchi Michiko)  (70632470)	横浜市立大学・医学研究科・客員研究員    (22701)	
研究分担者	斉藤 光江  (Saito Mitsue)  (30205679)	順天堂大学・医学部・教授    (32620)	
研究分担者	山下 親正  (Yamashita Chikamasa)  (30622188)	東京理科大学・薬学部・教授    (32660)	