

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10707

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫の癌幹細胞を標的としたStat3阻害治療(START)に関する研究

研究課題名(英文) Stat3 inhibitory treatment (START) targeting cancer stem cells for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

松本 成司 (Matsumoto, Seiji)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：60412011

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)：BBI-608単剤(10 $\mu$ M)では、放射線照射5Gy照射やアリムタ単剤(10 $\mu$ M)以上に中皮腫細胞内のROS増加を認めた。また、BBI-608(10 $\mu$ M)に放射線照射(2Gy)併用した場合、放射線照射(2Gy)やBBI-608単剤以上のROSが測定された。放射線照射(5Gy)では放射線照射(2Gy)よりもROS産生は増加したが、BBI-608単剤(10 $\mu$ M)には及ばず、BBI-608(10 $\mu$ M)に放射線照射(5Gy)併用した場合のROS産生の増加は2Gyと同等であった。BBI-608と放射線治療の相乗効果はこのROS産生が一因と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Stat3阻害剤であるBBI-608は癌幹細胞に対する抑制効果が期待されている。本研究はBBI-608と放射線治療の併用時の抗腫瘍効果増大の確認と、そのメカニズムを明らかにすると同時に、動物モデルを用いて同時併用時の安全性が確認出来た。

研究成果の概要(英文)：10 $\mu$ M BBI-608 alone increased ROS in mesothelioma cells than irradiation with 5 Gy or 10 $\mu$ M Alimta alone. When 10 $\mu$ M BBI-608 was used in combination with 2 Gy irradiation, ROS production increased more than 2 Gy irradiation or BBI-608 alone. Irradiation (5Gy) increased ROS production more than irradiation (2Gy), but it was not as high as that of BBI-608 single agent (10 $\mu$ M). When BBI-608 (10 $\mu$ M) was used in combination with 5 Gy irradiation, the increase in ROS production was equivalent to combination with 2 Gy irradiation. It is considered that the synergistic effect of BBI-608 and radiotherapy is due to this ROS production.

研究分野：中皮腫、肺癌

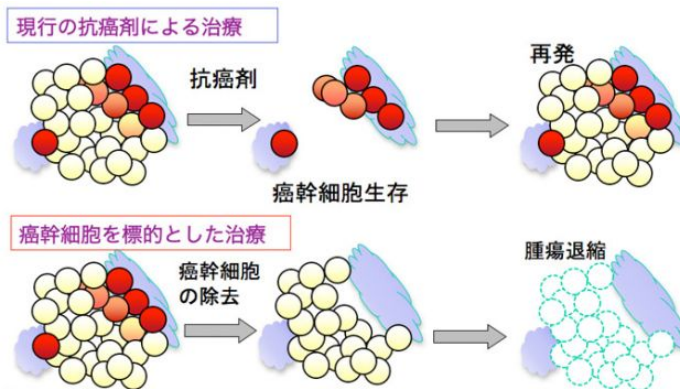
キーワード：中皮腫 癌幹細胞 Stat3 放射線治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

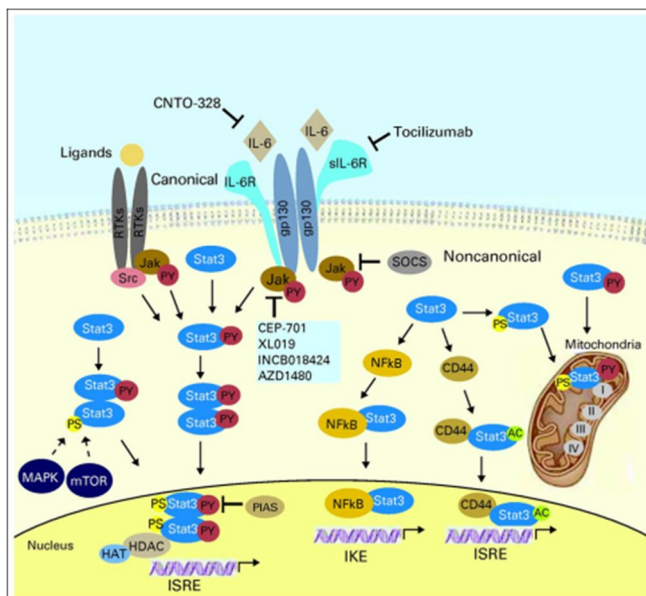
1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は壁側胸膜から発生し、発見時には高濃度のヒアルロン酸(数十万 ng/ml)、IL-6(3800pg/ml (血中正常濃度の約 100 倍))を含んだ胸水貯留を認める。ヒアルロン酸はCD44のリガンドの一つであり、高濃度のヒアルロン酸、IL-6を含む胸水に接した悪性胸膜中皮腫はCD44が高発現であり、その下流にあるMEK、ERK、Stat3が活性化した状態にある。ヒアルロン酸/CD44/MEK経路遮断による悪性胸膜中皮腫治療の開発(基盤研究(C) H25-27)において、CD44およびMEK阻害剤投与により中皮腫細胞株の増殖抑制効果を確認出来たが、最終段階にあるStat3の完全な抑制には至っていない。

CD44を高率に発現する癌細胞は癌幹細胞(Cancer Stem Cell; CSC)として様々な癌腫で研究されている。抗癌剤による治療では、腫瘍の縮小が治療効果判定とされるが、腫瘍の大部分を占める癌幹細胞の機能を持たない分化した癌細胞だけに作用して、癌幹細胞には作用していない可能性がある。また一部の癌幹細胞には、薬剤耐性を獲得していることも指摘されている。治療によって大部分の癌細胞を除いても、ごく少数の癌幹細胞が残っていれば再発する可能性がある。そのため、癌幹細胞を標的として除去することができれば、癌の転移や再発の防止にも有用な治療法となることが期待されている(Fig.1)。CD44からのシグナルはMAPKを経てStat3へと伝わる(Fig.2)。最近、Stat3に関しては癌化促進、癌幹細胞との関係について研究報告がなされており、Stat3活性阻害をもたらす癌幹細胞抑制が期待されている。



(Fig.1) 癌幹細胞を標的とした治療(概念図)



(Fig.2) IL-6/Stat3 経路(JC02012 1005)

## 2. 研究の目的

この研究は悪性胸膜中皮腫における癌幹細胞(Cancer Stem Cell; CSC) を標的とした Stat3 阻害剤と放射線治療併用療法の有効安全性を検証する。現在、悪性胸膜中皮腫に対する集学的治療の5年生存率は約40%であるが、Stat3 阻害剤、放射線治療、EPP/PD を組み合わせ、5年生存率の倍増(84%以上)を目標とした START (Stat3 inhibitor with Radiation Therapy) の基礎研究である。

## 3. 研究の方法

### Stat3 阻害剤(BBI-608)による癌幹細胞抑制効果の確認

Stat3 阻害剤である BBI-608 は癌幹細胞抑制効果が期待されている。BBI-608 と中皮腫に用いられる抗癌剤であるアリムタ(Pemetrexed)を中皮腫細胞株に作用させ、癌幹細胞 (CSC) 癌抑制効果を FACS で評価した。

### Stat3 阻害剤(BBI-608)と放射線治療との併用効果の確認

生体における Stat3 阻害剤(BBI-608)と放射線治療との併用効果を動物モデルを用いて評価した。マウス皮下に中皮腫細胞株を接種し、皮下腫瘍を形成させる。未治療群、Stat3 阻害剤(BBI-608)単独投与群、放射線治療群(3Gy×5回)、BBI-608/放射線治療(3Gy×5回)群に分け、各群における皮下腫瘍の経時的増大を比較した。

### 放射線照射、アリムタ(Pemetrexed)、BBI-608 による中皮腫細胞内の ROS 産生

放射線照射による細胞死は直接 DNA が損傷するか、細胞内の水と反応し、ROS (Reactive Oxygen Species) が発生し、それが細胞を損傷する場合のいずれかである。細胞内で産生される ROS を FACS で測定した。放射線照射(2 Gy、5Gy)、アリムタ(Pemetrexed) (10 μM)、BBI-608(10 μM)それぞれ単独の場合と、放射線照射(2 Gy,5Gy)と BBI-608(10 μM)を併用した場合での細胞内の ROS 産生量を比較した。

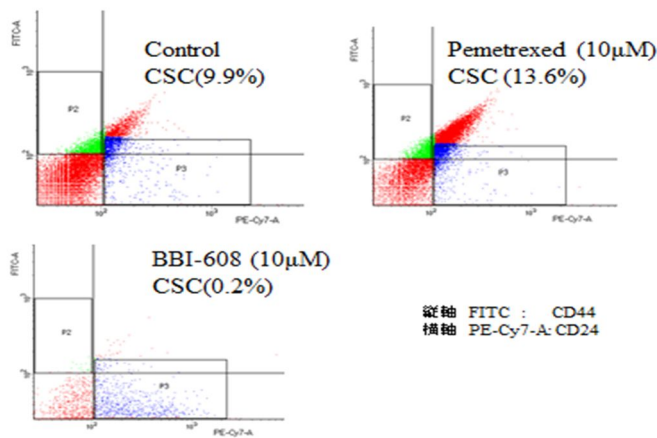
### 安全性試験(放射線障害)

BBI-608 のヒトへの投与において、重篤な間質性肺炎の報告は無いものの、実際の放射線との併用においての安全性を確認するために当院放射線科が確立している実験を行った。放射線照射、BBI608 放射線同時照射による臓器障害については、C57BL/6J マウスを用いた。各群 5 匹とし、放射線照射は 12 Gy, 15 Gy の全身照射。放射線照射後 3.5 日目に安楽死させ、腸管を摘出。10%ホルマリンで固定後、組織学的に検討する。腸管を用いるのは肺よりも腸管が放射線感受性が高いためである。

## 4. 研究成果

### Stat3 阻害剤(BBI-608)による癌幹細胞抑制効果の確認

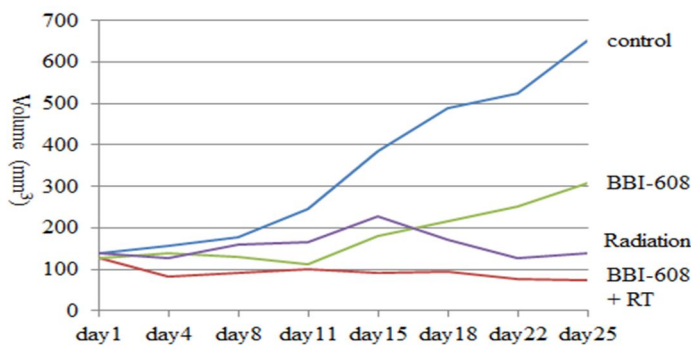
BBI-608 は未治療細胞株と比較し癌幹細胞(CSC)の比率を低下させた(9.9% vs0.2%)。一方、アリムタ(Pemetrexed)では CSC の比率は上昇した(9.9% vs 13.6%) (Fig.3)。



(Fig.3) BBI-608、アリムタ(Pemetrexed)投与後の CSC の比率

### Stat3 阻害剤(BBI-608)と放射線治療との併用効果の確認

マウス皮下腫瘍において BBI-608/放射線治療 (3Gy  $\times$  5 回)併用療法は腫瘍増大を抑制出来た (Fig.4)。



(Fig.4)マウス皮下腫瘍に対する BBI-608 単独投与、放射線治療 (3Gy  $\times$  5 回)、BBI-608/放射線治療 (3Gy  $\times$  5 回併用治療における経時的変化

### ROS 産生

細胞内で産生される ROS を FACS で測定した。BBI-608 単剤(10 $\mu$ M) では、放射線照射 5Gy 照射やアリムタ (Pemetrexed)単剤(10 $\mu$ M)以上に中皮腫細胞内の ROS 増加を認めた。また、BBI-608(10 $\mu$ M) に放射線照射 (2Gy) 併用した場合、放射線照射 (2Gy) や BBI-608 単剤以上の ROS が測定された。放射線照射 (5Gy) では放射線照射 (2Gy) よりも ROS 産生は増加したが、BBI-608 単剤(10 $\mu$ M)には及ばず、BBI-608(10 $\mu$ M) に放射線照射 (5Gy) 併用した場合の ROS 産生の増加は 2Gy と同等であった。BBI-608 と放射線治療の相乗効果はこの ROS 産生が一因と考えられる。

### 安全性試験 (放射線障害)

BBI-608 のヒトへの投与において、重篤な間質性肺炎の報告は無いものの、実際の放射線との併用における安全性を確認するために当院放射線科が確立している実験を行った。

マウス(C57BL/6J) に対し 15 Gy の全身照射を施行した。BBI608 投与群では 20mg/kg を 1 日内

服させた。放射線照射後 3.5 日目に安楽死させた。安楽死後は、腸管を摘出し、10%ホルマリ  
ンで固定後、大腸陰窩細胞を顕微鏡でカウントした。放射線照射なしの状況下では、BBI608 あ  
り、無しは大腸陰窩細胞の数に有意な差を認めなかった。放射線照射下、BBI608 あり、無しは  
大腸陰窩細胞の数に有意な差を認めなかった事から、放射線照射と Stat3 阻害剤(BBI608)併用  
による大腸の障害は認めず、併用による安全性を確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Doi Seiji Matsumoto Soichi Odawara Toshiyuki Shikata Kazuhiro Kitajima Masao Tanooka Yasuhiro Takada Tooru Tsujimura Norihiko Kamikonya Shozo Hirota	4. 巻 13
2. 論文標題 Pravastatin reduces radiation-induced damage in normal tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1765-1772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seiji Matsumoto, Hiroshi Doi, Tohoru Nakamichi, Ayumi Kuroda, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Nobuyuki Kondo, Seiki Hasegawa
2. 発表標題 The combination of Stat3 inhibitor and radiation with malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔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	長谷川 誠紀 (Hasegawa Seiki) (10252438)	兵庫医科大学・医学部・教授  (34519)	
研究分担者	近藤 展行 (Kondo Nobuyuki) (50402889)	兵庫医科大学・医学部・講師  (34519)	
研究分担者	多久和 輝尚 (Takuwa teruhisa) (00412049)	兵庫医科大学・医学部・講師  (34519)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	土井 啓至  (Doi Keiji)  (50529047)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師       (34519)	