

令和元年6月13日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18464

研究課題名(和文) 肺癌におけるヌクレオチド逆転写酵素阻害剤のドラッグリポジショニングの検討

研究課題名(英文) Drug repositioning of nucleoside reverse transcriptase inhibitor in lung cancer

研究代表者

越智 宣昭(Ochi, Nobuaki)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：80611615

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)：TDP-1発現量と非小細胞肺癌細胞におけるドライバー遺伝子変異の有無との関連はみいだせなかったが、TDP-1発現が肺癌においてもabacavir感受性に関わる可能性が示された。またTDP-1低発現細胞株ではabacavirとSN-38の併用による相乗効果を多くの細胞で認めた。一部の細胞株ではabacavirとSN-38の感受性にTDP-2発現が関与している可能性も示唆された。TDP-1低発現細胞株に対するTDP-1遺伝子の導入によりそれぞれの薬剤に対する感受性低下を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌を初め多くのがん腫で盛んな分子標的治療薬や、抗PD-1抗体を初めとした免疫チェックポイント阻害剤でもがんの“根治”が困難な現状では、がんのドライバー遺伝子(Oncogene driver)を持たない肺癌に対する治療のみならず、分子標的治療に耐性化した肺癌に対する有効な治療法として既存の化学療法の有効性を、いかに副作用を増強すること無く高めるかが重要であり、副作用プロファイルのまったく異なる薬剤の肺癌治療へのドラッグリポジショニングを検討することは重要である。

研究成果の概要(英文)：We found the relationship between the sensitivity of abacavir and TDP-1 expression in lung cancer. We also revealed the combination of abacavir with SN-38, the active metabolite of irinotecan, showed synergistic effects on the lung cancer cell lines with low TDP-1 expression. Furthermore, TDP-2 expression might affect the sensitivity of those two drugs in some cell lines. The cells intrinsically low TDP-1 expression forcibly introduced TDP-1 gene showed reduced sensitivity to those drugs. Thus, a treatment strategy targeting TDP-1 expression and the combination of abacavir with SN-38 might be a promising treatment approach in lung cancer.

研究分野：肺癌

キーワード：Drug repositioning 化学療法 NRTI TDP-1 SN-38

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌において上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) の遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子が Oncogene driver であることが報告 (Lynch TJ, et al. N Engl J Med. 2004, Soda M, et al. Nature. 2007) されている。それら Oncogene driver に対する分子標的治療薬の治療効果は、既存の殺細胞性抗癌剤と比べて非常に高く期待できるものであるが、残念ながらその効果は持続せず、いずれ耐性化を招く (Pao W, et al. PLoS Med. 2005, Engelman JA, et al. Science. 2007)。またその耐性化メカニズムも一定では無く、分子標的治療に耐性化した癌細胞に対してどのようにアプローチしていくか、また耐性化をいかに遅らせるかは今も多くの研究者の研究対象となっている。

一方でそれら Oncogene driver の存在しない、または未知である肺癌も依然として多数存在する。そのような肺癌に対する標準治療は化学療法であり、前述のような分子標的治療薬に耐性となった肺癌に対しての二次治療としては化学療法が行われており、今後も殺細胞性抗癌剤による化学療法の有用性は高い。またそのような背景の中で毒性を高めることなく、既存の化学療法の有効性をいかに向上させるかについての研究は重要である。

2. 研究の目的

1) トポイソメラーゼ I 阻害剤と Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP-1)

トポイソメラーゼ I (Topoisomerase I: TopI) は、DNA 二重鎖に生じた超らせん構造 (ねじれ) を解くために活性化し、DNA の 3' 末端との複合体 (TopI cleave complex: TopI cc) を形成する。修復完了後、TopI cc は速やかに取り除かれる必要があるが、この TopI cc を除去する役割を果たすのが Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP-1) である。TDP-1 はホスホリパーゼ D スーパーファミリータンパク質であり、TopI のチロシン部位と DNA の 3' 末端リン酸基の間のホスホジエステル結合を加水分解する。TopIcc が取り除かれない場合、さらなる DNA 損傷を招くとされる。TopI 阻害剤である塩酸イリノテカン (CPT-11: Camptothecin (CPT) の誘導体) の活性代謝産物 SN-38 は TopIcc を形成した TopI に結合し、その安定性を高めることでその後の反応を停止させ、DNA の合成を阻害する。TDP-1 の高発現は CPT による DNA 傷害作用に拮抗し、耐性化因子であることが報告されている (Murai J, et al. J Biol Chem. 2012)。

一方で、大腸癌において TDP-1 蛋白発現は mRNA レベルでの発現や、TDP-1 の活性と良く相関し、TDP-1 の発現低下は TopI 阻害剤への感受性が高まることが報告された (Meisenberg C, et al. Mol. Cancer Ther. 2015)。さらに Gao らは、TDP-1 の発現が低いほぼ発現のない肺癌細胞株 (NCI_H522, HOP_62) では CPT による DNA 傷害を強く誘導し得ることを報告している (Gao R, et al. DNA Repair. 2014)。以上より、TDP-1 は CPT の効果予測因子の一つと考えられる。

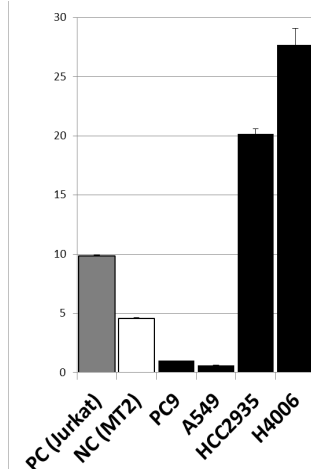
これまでも TDP-1 発現が TopI 阻害剤の効果規定因子となり得ることはいくつか報告されているが、未だ実臨床での有用性は示されていない。本研究の成果は、EGFR 阻害剤や ALK 阻害剤といった分子標的薬の有効性が望めない多くの固形がんに応用出来る可能性があると考え、本研究を立案した。

2) Tdp1 低発現と Abacavir、CPT-11 の併用療法による相乗効果

Tada らの最近の報告によると、抗 HIV 薬として用いられるヌクレオチド逆転写酵素阻害剤 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor: NRTI) である abacavir が成人 T 細胞性リンパ腫 (Adult T-cell Lymphoma) 細胞において Double-strand breaks (DSBs) を誘導し、細胞死をもたらすことを報告した (Tada K, et al. Science Advances. 2015)。その効果規定因子が ATL 細胞での Tdp1 の発現低下にあり、また CPT-11 と abacavir の併用が ATL 細胞において強い相乗効果をもたらすことを報告している。

我々はこれまでの基礎的な研究において肺癌細胞株 (PC-9、A549) において TDP-1 の発現が極めて低いことに着目し、肺癌を初めとした多くの癌腫の治療薬として用いられている SN-38 (CPT-11 の活性代謝産物) と abacavir を併用することで高い相乗効果を認めることを確認した。今後、他の肺癌細胞株において TDP-1 発現レベルと SN-38 と abacavir の併用効果について引き続き検討を行うことを計画している。

さらに、TDP-1 knock-out chicken DT40 細胞において、TDP-1 ^{-/-} 細胞では、CPT だけで無く、TopII 阻害剤である etoposide に対しても感受性が高まることが報告されており (Murai J, et al. J Biol Chem. 2012.)、TDP-1 はトポイソメラーゼ II (Topoisomerase II: TopII) が DNA と結合し形成する複合体 (Top2 cc) に対しても一定の作用を示す可能性が示唆されている (Barthelme HU, et al. J Biol Chem. 2004, Murai J, et al. J Biol Chem. 2012)。よって、新規の TopII 阻害剤であり、近年の肺がん治療における有用性が注目されているアムルピシン



(Amrubicin: AMR)を用いて、同様に TDP-1 の発現レベルと抗腫瘍効果の関連性を検討したい。

Abacavir はすでに実臨床で使用可能な薬剤であり、CPT-11 や AMR などとは副作用プロファイルが異なることから併用による相乗効果が示された場合、早期に臨床への応用が期待できるものと考えられる。

分子標的治療薬や抗 PD-1 抗体を初めとした免疫チェックポイント阻害剤でも治療の困難な現状では、Oncogene driver を持たない肺癌に対する治療のみならず、分子標的治療に耐性化した肺癌に対する有効な治療法として既存の化学療法の効果、副作用を増強すること無く高めることを可能とすることが本研究の意義と考える。

非小細胞肺癌における CPT-11 や AMR といった Top 阻害剤は一定の効果を確認するもののその有効性は絶対的なバイオマーカーの存在が確立していないことから新規薬剤に後れを取っている。しかしながら、これまで TopI 阻害剤の効果規定因子として着目されていた TDP-1 発現がさらに abacavir との相乗効果のバイオマーカーともなり得ることが示されれば新たな repositioning を果たすことが出来、臨床研究に発展しうる可能性がある。

また abacavir はこれまでごく一部を除いて固形腫瘍に対する治療効果の検討は為されておらず、殺細胞性抗癌剤との併用の報告は検索した限りで存在しない。そのような点で本研究は独創的であり、また CPT-11 や AMR は多くの癌腫で有効性を示し、適応を有する薬剤であることから今後、他の癌腫にも幅広く応用可能な可能性を秘めている。

3. 研究の方法

➤ 細胞株

非小細胞肺癌細胞株 27 種(細胞種については研究成果の i) 図 1 参照)、肺小細胞癌細胞株 (SBC-3)とその SN-38 耐性株(SBC-3/SN-38)

➤ 薬剤感受性

MTT assay法を用いて各薬剤感受性を検討した。薬剤併用効果はmedian-effect plot analysis (Chou and Talalay. Adv Enzyme Regul. 1984) に基づく CompuSyn software(ComboSyn, Inc.)を用いて Combination index (CI)を算出し、CI が1以下であれば相乗的、1以上であれば拮抗的であると判定した。

➤ 遺伝子・タンパク発現

各細胞株における TDP-1, TDP-2 発現は mRNA を RT-PCR により解析し、タンパク発現はウェスタンブロットにより検討した。

➤ 遺伝子導入

Lentivirus vector (CSII-CMV-IRES-hrGFP vector)および retrovirus vector (pMXs-EF1-Bsd Retroviral Expression Vector)を用いて TDP-1 低発現細胞株へヒト TDP-1 遺伝子導入を試みた。

4. 研究成果

i) 非小細胞肺癌における TDP-1 発現

はじめに非小細胞肺癌細胞における TDP-1 発現を明らかとするため、27 種の非小細胞肺癌細胞株において定量 PCR にて測定し、各種ドライバー遺伝子変異との関係をまとめた。

図 1 に示す如く、TDP-1 発現と各種ドライバー遺伝子変異発現との間に明らかな関連を見いだせなかった。

しかしながら、既報のごとく TDP-1 発現が極端に低い細胞株群 (A549, PC-9, PC9/ER3) では abacavir への感受性は高く、極端に発現の高い細胞株群 (H4006, HCC2935) では abacavir への感受性は低い傾向にあった。また、同様に SN-38 への感受性についても同様に TDP-1 高発現細胞株 H4006, HCC2935 では大きく低下していた。

以上の結果から、非小細胞肺癌細胞株においても TDP-1 発現が abacavir の感受性に関わっている可能性が示唆された。

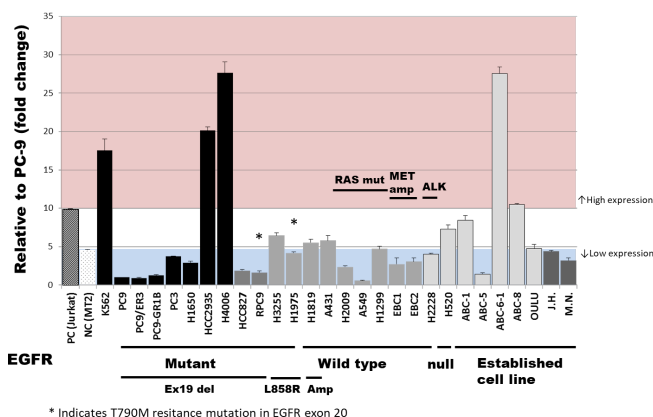


図 1. 非小細胞肺癌細胞株における TDP1 発現

ii) TDP-1 発現量と Abacavir と SN-38 の併用効果

前述の TDP-1 低発現細胞株群 (A549, PC-9, PC9/ER3) および高発現細胞株群 (H4006, HCC2935) において abacavir および SN-38 の併用効果を Combination index にて検討した。

低発現細胞株群では3細胞株すべてでいくつかの濃度比で相乗効果を認めた。一方で、高発現細胞株のうち、H4006細胞株では相乗効果を認めなかったが、HCC2935細胞株では相乗効果を認めた。さらに検討を加えるため、TDP-1低発現細胞株6種(H2122, H1395, H1563, H1793, RERF-LC-AI, RERF-LC-Ad1)にて同様に併用効果を検討したところ、5種の細胞株で相乗効果が確認された。

図2. TDP-1発現量と薬剤感受性

Cell line	A549	PC-9	PC9/ER3	H4006	HCC2935	H3255
TDP1 expression	Very low	Very low	Very low	Very high	Very high	normal
EGFR mutation	WT	19 DEL	19DEL	19 DEL	19 DEL	L858R
IC50 of abacavir(μM)	375.3	183.7	159.5	522.1	>1000	421.3
IC50 of SN-38(nM)	16	4	5	41.7	232	2.4
Combination index (Data for Fa = 0.5)						
400:1	1.58	0.62	1.282	3.032	1.148	1.4
2000:1	1.13	0.93	0.680	1.060	0.852	0.79
20000:1	0.68	0.87	0.865	1.589	0.578	0.27

TDP-1発現が低い細胞株では比較的2薬剤による相乗効果を認めたが、一方で高発現細胞株でも相乗効果を認めるものがあり、TDP-1以外の効果規定因子が示唆された。

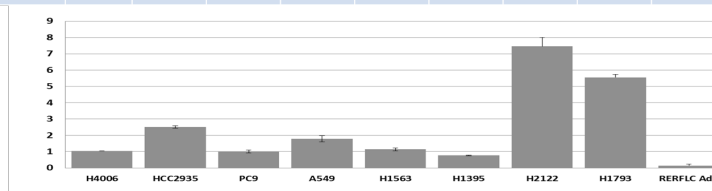
iii) TDP-2発現が薬剤感受性に及ぼす影響

TDP-1低発現株におけるabacavir、SN-38耐性機序の一つとしてTDP-2発現が関与しているという仮説のもと、非小細胞肺癌細胞株のうちTDP-1高発現株2種、低発現株7種を選択し、TDP-2発現量をRT-PCRにて検討した。図3に各細胞株におけるTDP-2発現量とTDP-1発現レベル、abacavir、SN-38感受性を示す。今回の検討では、TDP-1低発現にも拘わらず、abacavirやSN-38に耐性を示した4種の細胞株(H1563, H1395, H1793, RERF-LC-Ad1)のうち、H1793のみでTDP-2の発現が著明に高値であった。その他の3種ではTDP-2の高発現を認めず、それら細胞株における薬剤耐性へのTDP-2の関与は否定的と考えられた。

図3. TDP-2発現と薬剤感受性

Cell line	H4006	HCC2935	PC-9	A549	H1563	H1395	H2122	H1793	RERF-LC-Ad1
TDP1 expression	high	high	low	low	low	low	low	low	low
IC50 of abacavir (μM)	522.1	>1000	183.7	375.3	751.4	777.7	180	427.5	842
IC50 of SN-38 (nM)	41.7	232	4	16	>50	34	2	>50	23

H1793細胞では今回の仮説の如くTDP-2の高発現を認めており、今後TDP-2の発現をタンパクレベルで検証し、TDP-2をノックダウンすることによりそれぞれの薬剤感受性が回復するかどうかなど、今後の研究の方向性を示唆するものとなった。



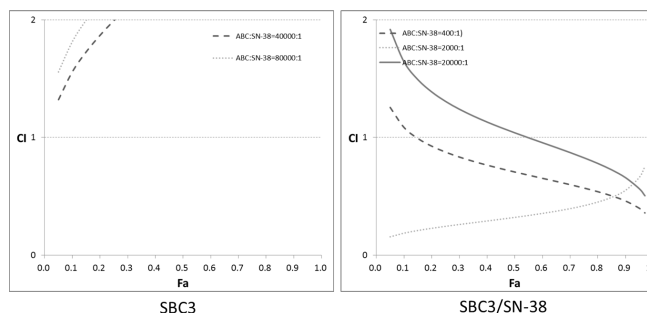
iv) 肺小細胞癌におけるTDP-1発現と併用効果

次にCPT-11(SN-38)がキードラッグである肺小細胞癌における検討を行った結果を示す。肺小細胞癌細胞株(SBC-3)にCPT-11(SN-38)を持続的に暴露し耐性化したSBC-3/SN-38細胞では、親株(SBC-3)に対し約60倍のSN-38耐性を示していた。SBC-3/SN-38細胞株では親株であるSBC-3細胞株に比べTDP-1が有意に高発現しており、その耐性機序の一つと考えられた(Data not shown)。

一方でSBC-3/SN-38細胞株ではabacavirの感受性も1/3程度に低下していた。

SN38とabacavirの併用効果をCombination indexにて検討したところ、SBC-3細胞株では相乗効果は認めなかったが、SBC-3/SN-38細胞株ではいくつかの濃度比(abacavir:

SN-38=400:1, abacavir:SN-38=2000:1)で高い相乗効果を認めた。



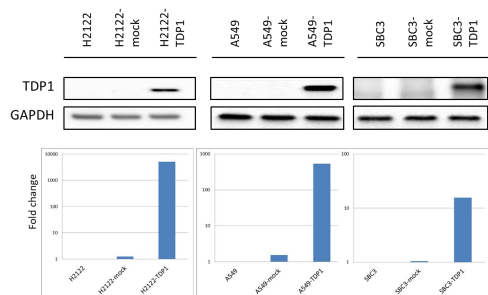
v) TDP-1低発現細胞株への遺伝子導入

TDP-1低発現非小細胞肺癌細胞株(H2122, A549)及び肺小細胞癌細胞株(SBC-3)にlentivirus vector(CSII-CMV-IRES-hrGFP vector)を用いてTDP-1遺伝子を導入し、TDP-1を強制発現させ、それぞれの細胞株でのabacavirおよびSN-38への感受性、また併用効果の検討を行った。しかしながら、mRNAレベル、タンパクレベルではTDP-1の高発現を確認し、SN-38に対する感受性低下を確認しえたものの、3種ともmock導入クローンにおいてもabacavirへの感受性低

下を認めた。

ベクターや配列の問題を除外するため、新たに retrovirus vector (pMXs-EF1-Bsd Retroviral Expression Vector) を用いて同様にトランスフェクションを試みており、現在シングルクローニング中である。

引き続きいくつかのクローンを選択し感受性検査を予定している。



Cell line	H2122	H2122 -mock	H2122 -TDP1	A549	A549 -mock	A549 -TDP1	SBC3	SBC3 -mock	SBC3 -TDP1
TDP1 expression	Low	Low	High	Low	Low	High	Int	Int	High
abacavir (μM)	180	322.1	316.7	375.5	605.2	608.1	100.7	189.9	203.2
SN-38 (nM)	2	2.5	5.6	16	12.5	12.2	0.4	0.4	0.7

vi) Abacavir 耐性機序の解明

TDP-1 発現が欠失している肺癌細胞株 2 種 (HOP_62, NCI_H522) に対し、abacavir を低濃度から長期持続暴露することにより abacavir 耐性を誘導した。途中経過ではあるが、abacavir に対し HOP_62 においては 5 倍以上、NCI_H522 においては 2 倍程度の耐性を獲得している。引き続き薬剤曝露を継続し、限界希釈法によるシングルセルクローニングを予定している。その耐性機序についても未解明であるが、それぞれの abacavir 耐性株は SN-38 にたいしても 5-20 倍程度の耐性を示しており、TDP-1 の関与が推定され、引き続き解析を進めている。

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〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://kawasaki-gim4.main.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。