

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06743

研究課題名(和文) 抗腫瘍分子標的薬に対する抵抗性の要因解明および抵抗性解除に関する基礎検討

研究課題名(英文) Mechanism of development of resistance to antitumor molecule-targeted drugs

研究代表者

荒木 拓也 (Araki, Takuya)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00568248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、分子標的薬に対する抵抗性発現に関与すると考えられる複数のタンパク質ならびにシグナル経路を検出した。これらの候補の一部を主要ターゲットとして解析した結果、当該タンパク質の制御により、薬剤抵抗性を解除できる可能性が示された。さらに、これらの候補の一部は他の疾患に対する治療に用いられている既存薬によって制御することが可能であり、既存薬を併用することで一部薬剤抵抗性が解除できることを確認した。これらのことから、本研究で用いた研究手法を拡大することにより、分子標的薬に対する抵抗性の要因解明が可能であり、薬剤抵抗性解除方法の構築につながると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によってがん治療に用いる分子標的薬に対する抵抗性獲得機構の一部が明らかになり、同手法を用いることによって薬剤抵抗性を解除するための方法を構築できる可能性があることが示された。本研究手法は様々な薬剤に対する抵抗性獲得機構の解明に応用できることから、本研究で得られた知見はがん治療の大きな発展に寄与するものである。効果が高い既存薬を適切に扱うことにより、現在のがん化学療法の効果を大幅に改善できる可能性を示したものであり、その社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we detected multiple proteins and signaling pathways that are thought to be involved in developing the resistance to molecular-targeted drugs. As a result of analyzing some candidates as the primary targets, it was shown that drug resistance could be released by regulating some of those proteins. Furthermore, some of these candidates can be regulated by the drugs used to treat other diseases. These results indicated that there is a possibility that drug resistance can be released by using existing drugs well. By expanding the research method used in this study, it is possible to elucidate the factors of resistance to molecular-targeted drugs, and it is expected that it will lead to the construction of a method for releasing drug resistance.

研究分野：医療薬学

キーワード：薬剤抵抗性 分子標的薬 抗体医薬品 がん 化学療法

1. 研究開始当初の背景

近年、数多くの分子標的薬が開発されており、がん化学療法における治療成績は飛躍的に向上している。しかし、それらの薬剤が無効な症例や、治療開始時には有効であったにもかかわらず、後にその薬剤に対して抵抗性を示す症例も数多く存在する。抗腫瘍薬に対する抵抗性が認められた場合には別の薬剤への変更が行われるが、一つの薬剤に対して抵抗性を示したのちは別の抗腫瘍薬に対する抵抗性を獲得しやすい傾向にある。そこで、高い抗腫瘍効果を有する既存の薬剤に対する抵抗性を解除するための方法論を構築することで、がん化学療法による治療成績をさらに飛躍的に伸ばせるのではないかと考えた。

抗腫瘍薬に対する抵抗性に関連する因子として、数多くの遺伝子多型が報告されており、臨床現場においても治療法選択の基準の一つとして遺伝子情報が利用されている。しかし、遺伝子多型のみでは薬剤抵抗性や薬剤感受性を十分に予測するには至っていない。大腸がんの領域においては、KRAS 変異が抗 EGFR 抗体薬の効果規定因子であると報告されており、抗 EGFR 抗体薬の使用は KRAS 野生型大腸がん患者に限定することが推奨されている。しかし、KRAS を含む遺伝子情報等を総合的に判断しても、抗 EGFR 抗体薬に対する抵抗性の原因の約 40% は不明である。そこで、近年では治療効果予測バイオマーカーの探索としてプロテオームアプローチが注目され、新たな治療戦略が検討されている。しかし、治療後に耐性を獲得したがん細胞に対する治療戦略は十分に検討されておらず、また、抗腫瘍薬に対する抵抗性の要因及びその解除方法については十分に検討されていない。特に、抗体医薬をはじめとする分子標的薬に対する抵抗性についての要因は不明な点が多く、抵抗性の要因解明および新たな治療戦略としての薬剤抵抗性解除法の構築に向けたアプローチは行われていない。

既に多くの患者に対して高い抗腫瘍効果が確認されている薬剤に対する抵抗性を解除する方法の構築が治療成績の飛躍的な向上につながると考えられ、抗腫瘍分子標的薬に対する抵抗性の要因を解明し、その解除方法を構築することが、がん化学療法の飛躍的発展に大きく貢献すると期待される。

2. 研究の目的

抗腫瘍効果の高い薬剤が多く開発され、がん化学療法における治療効果は飛躍的に向上したが、抗腫瘍薬に対する抵抗性の発現により治療が難渋する症例も多い。既に多くの患者に対する高い抗腫瘍効果が確認されている薬剤に対する抵抗性を解除する方法の構築が治療成績の飛躍的な向上につながると考え、本研究では抗体医薬を中心とした抗腫瘍分子標的薬に対する抵抗性の要因を解明し、その解除方法を構築するとともに、新たな治療戦略としての薬剤抵抗性解除法に関する研究基盤を構築することを目的とする。なお、薬剤抵抗性に関する要因の検討としては遺伝子解析が広く行われてきたが、本研究では抗腫瘍薬に対する感受性が異なる複数の培養細胞株を用いたプロテオーム解析を行い、抗腫瘍活性に影響を及ぼす要因を決定するとともに、その要因を制御することによる薬剤抵抗性の解除について詳細に検討することで、薬剤抵抗性解除によるがん化学療法における新たな治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

抗体型分子標的薬として抗 EGFR 抗体薬、小分子型分子標的薬としてマルチ受容体チロシンキナーゼ阻害薬を主対象とし、それらの薬剤に対する抵抗性発現機構の解明を試みた。具体的には、次の手順で検討を実施した。

1. 各薬剤に対して感受性を有するがん細胞株を複数培養し、それらの培養細胞に対する IC50 の半分の濃度で各薬剤を曝露した。その後、曝露濃度を上昇させ、曝露濃度を上昇させる前の増殖速度と同程度の増殖速度に回復した後に 5 回程度継代し、再度曝露濃度を上昇させることで、各薬剤に対する抵抗性株を構築した。
2. 薬剤感受性株及び薬剤抵抗性株からそれぞれ細胞質画分タンパク質および細胞膜画分タンパク質を抽出し、還元アルキル化処理後にトリプシンでペプチド断片化した。
3. 得られたペプチドサンプルに対して界面活性剤の除去および脱塩濃縮処理を行い、分析用サンプルとして濃度を調整した。
4. 質量分析系を用いた解析として、1. LC-QTOF を用いた分析を行い、既存データベースを用いたライブラリに基づく解析を行う手法と、2. LC-single TOF を用いた分析を行い、得られたシグナルに対してライブラリを当てはめず、シグナルを直接比較し、変化を生じたシグナルを構成するアミノ酸配列を探索する方法の 2 種類を用いた。
- 4-1. EksigentNanoLC 425 と Triple TOF 6600 (ABSciex) で構成された LC/MS/MS でサンプルを分析した。装置の設定は一般的な範囲内で実施し、Sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra (SWATH) 分析を行なった。全ての分析対象サンプルを等量混合してライブラリーサンプルを作成し、data dependent acquisition (DDA)法

により各サンプル 3 回ずつ分析した。ライブラリーデータの作成のためには Uniprot (uniprot_sprot.fasta)を用い、peptide confidence thresholdは99%、false discovery rateは1%未満と設定した。次に感受性株と耐性株から検出されたタンパク質発現量の差を検定し、Benjamini-Hochberg 法による補正を行った。統計的に有意かつ耐性化に伴い発現量が2倍以上に増加もしくは1/2以下に低下したタンパク質を対象に、Uniprotコード、発現量の比、p値、q値を用いてcore分析によるパスウェイ解析を行った。なお、解析にはIPA software (Qiagen)を用いた。

- 4-2. ACQUITY UPLC と LCT-Premier XE (Waters) で構成された LC/MS を用い、サンプルを分析した。装置の設定は一般的な範囲内で実施し、測定範囲はm/z 100-2000とした。得られたピークのうち、保持時間0.1-55 min, Mass Tolerance 0.05 Daのピークを解析対象とし、MarkerLynx software (waters) を用い、Principal Component Analysis (PCA) および Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis (OPLS-DA) を行った。ピークピッキングは Peak Width at 5% Height 3.00 seconds、Peak-to-Peak Baseline Noise 50.0 とし、PCA によるマーカー抽出は Intensity threshold 10 counts、Mass window 0.05、Retention time window 0.10 とした。次に、感受性株もしくは体制株に特異的なシグナルを抽出し、MS fit (ProteinProspector) を用いて、当該ピークを生成する可能性のあるタンパク質を検索した。
5. 得られた感受性獲得関連タンパク質について、エレクトロポレーションを用いた当該タンパク質を制御する siRNA、shRNA、プラスミドの導入、もしくは当該タンパク質をターゲットとする薬剤を曝露し、薬剤抵抗性に与える影響を評価した。

4. 研究成果

抗 EGFR 抗体薬に対する抵抗性発現要因として、L-lactate dehydrogenase B chain (LDHB) の他、deoxycytidine kinase (DCK) や zinc finger and BTB domain-containing protein 41 (ZBTB41)、fructose-bisphosphate aldolase A (ALDOA)、Alcohol dehydrogenase 1C (ADH1G)、Carbonic anhydrase 1 (CAH1)、Coiled-coil domain-containing protein 6 (CCDC6) 等の大幅な上昇が検出された。また、パスウェイ解析の結果、EIF2 signaling、BAG2 signaling pathway、FAT10 signaling pathway、protein ubiquitination pathway、regulation of eIF4 and p70S6K signaling、inhibition of ARE-mediated mRNA degradation pathway、mTOR signaling などの上昇が確認された。さらに、これらに比べてシグナルの変動量は小さいものの、glycolysis I、gluconeogenesis I、pentose phosphate pathway、glycogen degradation II、glycogen degradation III、sucrose degradation V、pentose phosphate pathway など、糖質に関する因子の変動が大きく見られた。これらは LDHB 活性とも関与するものであり、抗体医薬品に対する抵抗性発現要因の一つに、細胞内における糖代謝の変動が大きく関与している可能性が考えられた。現在、LDHB、DCK、ZBTB41、ALDOA、HDGR2 の他、糖質代謝の制御による薬剤抵抗性解除の可否について、詳細に検討している。なお、既に LDHB 等のコントロールにより、抗 EGFR 抗体薬に対する抵抗性解除の可能性を見出しており、LDHB の変動要因についても併せて詳細に検討を進めている。DCK については、過剰発現しているがん細胞ではゲムシタピンやシタラビンなどの核酸アナログ製剤による抗腫瘍効果がより強く得られることが報告されていることから、核酸アナログ製剤の効果の変動について調査を進めている。関連タンパク質の制御が薬剤抵抗性に与える影響について、詳細が判明し次第、論文等で詳報する。

抗マルチチロシンキナーゼ阻害薬を用い、上記同様の検討を行ったところ、fibroblast growth factor receptor (FGFR) に対する阻害作用を有する lenvatinib に対する抵抗性獲得機構の一つとして、c-SRC の発現上昇が確認された。c-SRC については、近年 FGF1 を介するシグナルに関係することが報告されており、lenvatinib が制御する FGFR の変化によって c-SRC の活性が変動し、側副経路の活性化による細胞増殖が生じている可能性が考えられた。併せて複数の細胞接着因子や、c-SRC の上流タンパク質の発現変動も確認されたことから、現在 c-SRC の発現量制御に基づく lenvatinib の抵抗性解除について検討を進めている。現在までに、c-SRC に対する阻害活性を有する dasatinib を lenvatinib と併用した場合、lenvatinib に対する抵抗性が一部解除されることを確認している。また、c-SRC に対する shRNA を導入することで c-SRC 発現量を制御した条件下で同様の検討を実施することで、c-SRC が関与しない薬剤抵抗性機構について検討を進めている。これにより、c-SRC が関与する薬剤抵抗性発現機構について、c-SRC の上流における原因タンパク質を決定できるとともに、それらの制御のみではコントロールできない、別の側副経路の存在が明らかになると期待できる。その他、cadherin-2 や phosphoserine phosphatase などの上昇、purine nucleotides de novo biosynthesis、remodeling of epithelial adherens junctions、EIF2 signaling などの活性化が確認されており、これらのタンパク質やシグナル活性変動と薬剤抵抗性発現の関係性について検討を進めている。

他医薬品に対する抵抗性発現機構の解明ならびに解除方法の検討として、抗体医薬及び小分子型分子標的薬に対する抵抗性獲得細胞株の構築を進めるとともに、薬剤抵抗性関連タンパク質の解析ならびに当該タンパク質の発現制御による薬剤抵抗性解除の可能性について検討を進めている。薬剤抵抗性の可否について詳細がまとめ次第論文等で詳報する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayumu Nagamine, Takuya Araki, Daisuke Nagano, Mitsue Miyazaki, Koujiro Yamamoto	4. 巻 17
2. 論文標題 L-Lactate dehydrogenase B may be a predictive marker for sensitivity to anti-EGFR monoclonal antibodies in colorectal cancer cell lines	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology letters	6. 最初と最後の頁 4710-4716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hironori Nakamura, Ayumu Nagamine, Hideaki Yashima, Takuya Araki, Koujiro Yamamoto	4. 巻 1
2. 論文標題 Exploration of proteins involved in acquisition of resistance to cetuximab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Indonesian Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24198/idjp.v1i1.19582.g9322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木拓也, 中村浩規, 長嶺歩, 八島秀明, 山本康次郎
2. 発表標題 セツキシマブに対する後天的耐性を獲得した大腸癌に対する治療法の探索
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長嶺歩, 荒木拓也, 永野大輔, 山本康次郎
2. 発表標題 ヒト大腸癌細胞株に対するセツキシマブの効果と LDH 発現量の関係
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2018・第26回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2018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	八島 秀明 (Yashima Hideaki) (60773512)	群馬大学・医学部附属病院・助教 (12301)	
研究分担者	山本 康次郎 (Yamamoto Koujirou) (70174787)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究分担者	永野 大輔 (Nagano Daisuke) (90738387)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------