

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08683

研究課題名(和文) 消化器癌における効果的なイリノテカン療法を目指したバイオマーカーおよび新薬の開発

研究課題名(英文) Exploring an effective irinotecan treatment by way of biomarker and a new remedy

研究代表者

安藤 幸滋 (ANDO, Koji)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20608864

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)：消化器がん治療に用いられる抗癌剤であるイリノテカンのより効果的な治療法を開発を目指した。我々はがん細胞がどのようなメカニズムでイリノテカンに強くなるのかを解明した。これにはイリノテカンの標的タンパク質であるトポイソメラーゼIの分解が関わっていた。この分解過程を詳細に検討し、がん細胞へのイリノテカンの効果がより強くなるようにバイオマーカーの開発や、新たな治療法の開発を行った。バイオマーカーとしてはリン酸化topoIを開発した。また新たな治療法としてはトポイソメラーゼIの分解を止める薬剤を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々の研究は日本において開発された抗癌剤であるイリノテカンの効果を高めることを目的とした。内容としては感受性バイオマーカーの開発及び新規治療法の開発である。これまでイリノテカンに対する感受性バイオマーカーは存在しなかったが、我々の開発したバイオマーカーは感度、特異度ともに80%以上であり、今後多くの消化器癌患者に恩恵をもたらすと考える。また、新規治療法としてはproteasome阻害剤とイリノテカンを併用する方法であり、proteasome阻害剤はすでにあるため、今後この新規治療法の開発は容易と考える。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop a more effective treatment for irinotecan, which is an anticancer drug used for the treatment of gastrointestinal cancer. We elucidated the mechanism by which cancer cells become resistant to irinotecan. This involved the degradation of topoisomerase I, the target protein of irinotecan. This degradation process was investigated in detail, and biomarkers and new therapeutic methods were developed so that the effect of irinotecan on cancer cells would be stronger. Phosphorylated topoI was developed as a biomarker. As a new treatment method, we discovered a drug that stops the degradation of topoisomerase I.

研究分野：消化器がん

キーワード：イリノテカン バイオマーカー proteasome阻害剤 リン酸化topoI 消化器がん

1. 研究開始当初の背景

近年、抗癌剤の発展により、消化器癌分野においても化学療法が進歩してきた。なかでも大腸癌においては、stageIIIa/IIIbにおける術後補助化学療法や切除不能進行大腸癌、再発大腸癌に対する化学療法など、多くの場面で抗癌剤が用いられている。大腸癌ではさまざまな化学療法の方法があるが、オキサリプラチンを用いる方法(FOLFOX, XELOX, SOX など)とイリノテカンを用いる方法(FOLFIRI, IRIS など)に大別できる。また、胃癌においてはS-1を用いる治療が中心となるが、二次治療以降でラムシルマブ、パクリタキセルやイリノテカンを用いる治療法となっている。このように消化器癌分野においては現在、多種多様の抗癌剤を用いている。しかしながら、抗癌剤に不応となる患者も多く、なぜ不応となるか詳細なメカニズム(抗癌剤への耐性メカニズム)ははっきりわかっていない。また、抗癌剤には副作用も多く、期待した治療が行えない患者もいる。

生命活動に不可欠であるDNAは二重らせん構造を形成し、自然なねじれを持っている。この二重らせん構造がねじれたり、ほどかれたりするとさらに全体としてねじれることになり、これを超らせん構造と呼んでいる。DNAは非常に長い分子であり、局所的に超らせん構造をとり、複雑な染色体の構造を作っている。生命活動の根源であるDNAの転写、複製、修復などの際には二重らせん構造をほどく必要がある。この転写、複製、修復の際にも超らせん構造が発生する。この場合、**DNAトポイソメラーゼI型(topoI)**が働き、DNAの立体構造を調節している。超らせん構造のDNAを切断し、回転させ、さらには再結合させることにより、DNA超らせん構造をもとに戻していると報告されている。(Nature Reviews Cancer,2006, Mol. Cell Biol.,2002)。

イリノテカンはカンレンボク由来の抗腫瘍性アルカロイドであるカンプトテシンから合成され、日本で開発された抗癌剤である。イリノテカンは**topoI**を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する(Clin. Cancer Res.,1995)。また、イリノテカンは投与後に**topoI**が分解される場合では**抗腫瘍効果が低い**ことが報告されている(Cancer Res. 2001, Oncotarget, 2017)。我々はこのtopoI分解の分子メカニズムを詳細に検討し、報告した(Oncotarget, 2017)。このメカニズムとしてはイリノテカン投与後のDNA-PKによる**topoI-S10残基のリン酸化**、**BRCA1-BARD1によるリン酸化topoIのユビキチン化**および分解である(図1)。イリノテカン投与後にtopoIが分解される細胞株ではイリノテカン耐性となっている(Oncotarget, 2017)。

我々はこのtopoI-S10残基のリン酸化を表す抗体を作成した(topoI-pS10)。この抗体を用いた免疫組織化学染色はイリノテカン感受性とよく相関した。**topoI-pS10陰性症例はイリノテカンに感受性があり、陽性症例は感受性がない**。本抗体を用いることによりイリノテカンの効果および使い方の予測ができると思う。

また、イリノテカン投与後のtopoI分解を抑制することができれば、イリノテカン耐性の癌細胞はイリノテカン感受性となることが予測される。topoI分解を抑制する小分子化合物としてはtopoIの分解自体を抑制するproteasome inhibitorおよびBRCA1によるtopoIのユビキチン化を抑制するE3 ligase inhibitorが候補となる。

本研究では我々が開発したtopoI-pS10抗体及び発見した新たな小分子化合物を用いて、イリノテカンを用いた新たなそして効果的な治療戦略を開発する。

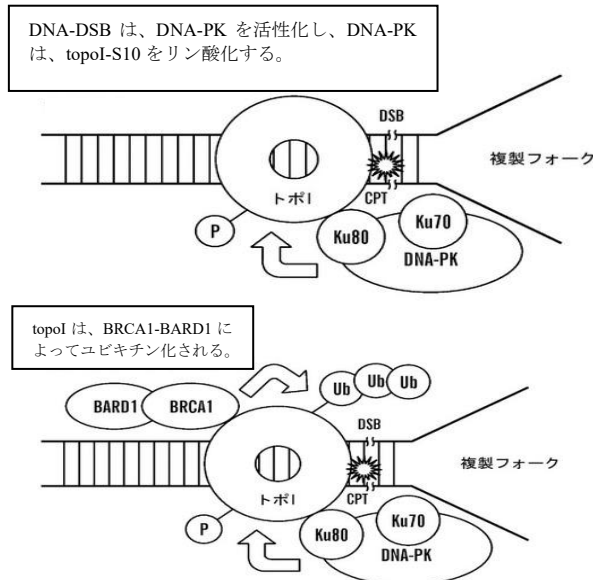


図1. topoI分解過程

②本研究の目的及び学術的独創性と創造性

**本研究ではイリノテカン感受性を我々が開発したtopoI-pS10抗体を用いて検討する。topoI-pS10陰性群はイリノテカン感受性があるため、イリノテカンの濃度をどこまで下げ、効果が出るのかを考察する。これにより効果はあるが、副作用をできるだけ減らすことができる。また、topoI-pS10陽性群ではイリノテカン感受性がないため、新たな小分子化合物を用いてイリノテカンの効果を上げる戦略を行う。**

本研究は「**イリノテカン耐性はtopoI分解がその原因となる**」という我々が発見したメカニズムに基づくものである。また、topoI-pS10抗体も新規小分子化

化合物も我々が開発しているため、世界中どこにもない全く新しいものとなる。本研究により日本で開発されたイリノテカン治療がさらにレベルの高いものとなり、効果が認められる患者には低用量で副作用のない治療を、効果が認められない患者には新たな小分子化合物とイリノテカンとの相乗効果で、よりよい効果を上げることが期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず細胞株およびマウスを用いて我々の研究戦略が正しいか検討を行う。topoI-pS10抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、topoI-pS10陰性群と陽性群に細胞株を分ける。陰性群ではイリノテカン濃度の調整を行い、イリノテカン濃度を減らしても効果が得られるのか検討を行う。topoI-pS10陽性群では proteasome inhibitor や E3 ubiquitin ligase inhibitor を用いることによりイリノテカンの効果を上げることができるのか検討する。E3 ubiquitin ligase inhibitor はまだこの世になく、この新規小分子化合物については現在スクリーニングを行っている。スクリーニングされた小分子化合物は数種類あるため、これらの化合物を本研究では用いることとする。つづいて、PDX マウスモデルに応用し、同様の検討を行うこととする。

## 3. 研究の方法

1. topoI-pS10 抗体を用いた免疫組織化学染色法によるイリノテカン感受性の予測検討
2. イリノテカン感受性群におけるイリノテカン濃度の調整検討
3. イリノテカン耐性群における新規小分子化合物および proteasomes 阻害剤とイリノテカンの相乗効果の検討

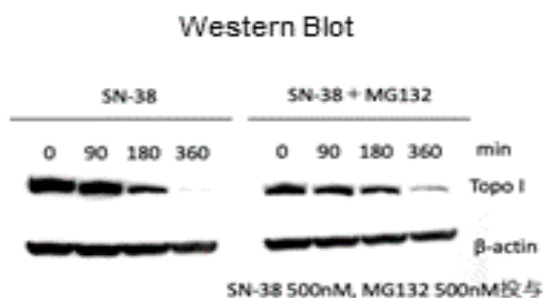
## 4. 研究成果

1. topoI-pS10 抗体を用いた免疫組織化学染色を胃癌検体、大腸癌検体を用いて行った。胃癌ではイリノテカンを用いた症例 27 例について検討を行った。胃癌では感度 82.4%、特異度 70%、陽性反応的中率が 82.4%であった。大腸癌は 176 例のイリノテカンを用いた症例について染色した。感度 87.5%、特異度 70%、陰性反応的中率が 87%であった。すなわち、本バイオマーカーはイリノテカン感受性を予測できることが分かった。本研究成果は Clinical Colorectal Cancer 誌に報告した(Ando K et al. Multicohort retrospective validation of a predictive biomarker for topoisomerase I inhibitors. Clin Colorectal Cancer. 2020 Dec 10;S1533-0028(20)30157-5)。

2. 本研究については未施行である。

3. proteasome 阻害剤とイリノテカンの併用効果を検討した。

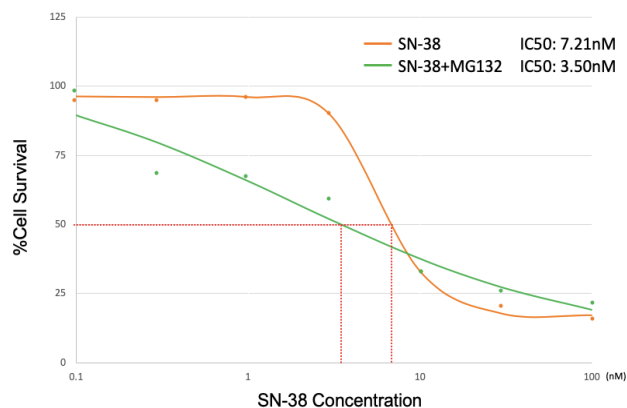
まず基礎実験として proteasome 阻害剤の代表である MG132 をもちいた。



耐性株では SN-38 単剤投与により経時的な topoI の分解を認めた(左図)。一方で、プロテアソーム阻害剤である MG132 を加えることで topoI の分解が抑制された(右図)。プロテアソーム阻害剤は topoI の分解を抑制していることがわかった。

また、耐性株に SN-38 単剤を加えたもの(オレンジ線)と MG132 と併用したもの(緑線)を比較した。

SN-38 単剤の IC<sub>50</sub> は 7.2nM であるのに対して、MG132 併用では IC<sub>50</sub> が 3.5nM となっていた。MG132 併用により耐性株が SN-38 に感受性を持つことが分かった。プロテアソーム阻害剤併用療法の可能性が示唆された。



現在、proteasome 阻害剤として臨床応用されている bortezomib、carfilzomib、ixazomib を用いて検討を行っている。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ando K, Tohme YH, Srinivasiah A, Taylor-Parker J, Harrington Y, Shah AK, Oki E, Brahmandam M, Bharti AK	4. 巻 66
2. 論文標題 Developing a Phosphospecific IHC Assay as a Predictive Biomarker for Topoisomerase I Inhibitors.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry and Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 549-561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/0022155418766503	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 該当する

1. 著者名 Koji Ando, et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Multicohort Retrospective Validation of a Predictive Biomarker for Topoisomerase I Inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Colorectal Cancer	6. 最初と最後の頁 30167-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clcc.2020.11.005.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koji Ando <sup>1</sup> , Hu Qingjiang <sup>1</sup> , Yasuo Tsuda <sup>1</sup> , Yoko Zaitsumi <sup>1</sup> , Yuichi Hisamatsu <sup>1</sup> , Yuichiro Nakashima <sup>1</sup> , Yasue Kimura <sup>1</sup> , Eiji Oki <sup>1</sup> , Ajit Bharti <sup>2</sup> and Masaki Mori <sup>1</sup>
2. 発表標題 TopoI-pS10 as a new sensitive predictive biomarker for topoisomerase I inhibitor response to gastric cancer
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koji Ando, Eiji Oki, Kensuke Kudo, Ryota Nakanishi, Yuichiro Nakashima, Akira Kabashima, Hiroshi Saeki, Ajit Bharti, Yoshihiko Maehara
2. 発表標題 Developing a phosphospecific Immunohistochemistry Assay as a Predictive Biomarker for Topoisomerase I Inhibitors
3. 学会等名 第55回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koji Ando, Ajit Bharti, Eiji Oki, Hiroshi Saeki and Yoshihiko Maehara
2. 発表標題 Discovering the mechanism of cellular resistance to topoisomerase I inhibitors and finding a predictive biomarker
3. 学会等名 第9回 国際消化器癌発生学会（招待講演）（国際学会）
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	沖 英次 (OKI Eiji)  (70380392)	九州大学・大学病院・講師  (17102)	
研究分担者	佐伯 浩司 (SAEKI Hiroshi)  (80325448)	群馬大学・大学病院・教授  (12301)	
研究分担者	中西 良太 (NAKANISHI Ryota)  (90771254)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	

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		
米国	Boston University	Department of Hematology and Oncology	