

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22828

研究課題名(和文) シスプラチン耐性肺癌における免疫プロテアソーム阻害剤治療の開発

研究課題名(英文) The immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin resistant small cell and non small cell lung cancer

研究代表者

庄司 哲明 (Shoji, Tetsuaki)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10881021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：まず非小細胞肺癌細胞株と小細胞肺癌細胞株からシスプラチン耐性細胞を作成した。すべてのシスプラチン耐性細胞は、免疫プロテアソームサブユニットであるPSMB8とPSMB9の遺伝子およびタンパク質を高発現していた。さらにH1299とSBC3のシスプラチン耐性細胞は、免疫プロテアソーム阻害剤に対してより感受性が高く、プロテアソーム蛋白分解活性が親細胞に比べて有意に高いことが示された。一部のシスプラチン耐性肺癌では免疫プロテアソームが有効な治療標的である可能性がある。プロテアソーム蛋白分解活性は、シスプラチン耐性肺癌における免疫プロテアソーム阻害剤の有効性を予測するマーカーとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、作成したシスプラチン耐性肺癌細胞5株中2株において免疫プロテアソーム阻害剤が有効な治療となることが観察された。またプロテアソームによるタンパク分解活性が有効な症例を同定するためのバイオマーカーとして利用できる可能性が示された。シスプラチンをはじめとするプラチナ製剤は肺癌治療に頻用されるが数ヶ月で耐性化するため、プラチナ製剤耐性肺癌患者の数は相当数に上ると考えられるため、本研究は多くの患者の利益に資すると予想される。

研究成果の概要(英文)：We established cisplatin-resistant variants from non-small cell lung cancer cell lines and small cell lung cancer cell lines. All cisplatin-resistant cells highly expressed one or both of the immunoproteasome subunit genes, PSMB8 and PSMB9, while no clear trend was observed in the expression of constitutive proteasome subunits. The cisplatin-resistant cells expressed significantly higher levels of PSMB8 and PSMB9 proteins, as well. In addition, the cisplatin-resistant variants of the H1299 and SBC3 cell lines were more sensitive to immunoproteasome inhibitors, and had significantly more proteasomal proteolytic activity than their parental counterparts. The immunoproteasome may be an effective therapeutic target in a subset of cisplatin-resistant lung cancers. Proteasomal proteolytic activity may be a predictive marker for the efficacy of immunoproteasome inhibitors in cisplatin-resistant lung cancer.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 シスプラチン 薬物耐性 プロテアソーム阻害剤 免疫プロテアソーム阻害剤 臨床腫瘍学 分子生物学

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、肺癌治療においては分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤など新規薬剤が臨床応用されているが、有効である症例は限られるため依然として殺細胞性抗癌剤の使用頻度は高い。シスプラチンを含むプラチナ製剤は代表的な殺細胞性抗癌剤であり、その耐性化後の治療法は重要な課題として研究されてきた。しかし前臨床や I 相試験においては有効性を示唆されているものもあるが臨床応用に至っている治療法は存在せず、重要な研究課題でありつづけている。

プロテアソーム阻害剤および免疫プロテアソーム (IP) 阻害剤は多発性骨髄腫治療において臨床応用され予後の改善に貢献してきたが、固形癌での臨床応用は進んでこなかった。肺癌においても I 相および II 相試験での奏功割合が低く有効性を証明するには至っていないが、プラチナ製剤既治療の患者において少数ながら著効例が報告されている。カルフィルゾミブ (CFZ) の I/II 相試験において、すでに 6 次治療まで受けている小細胞肺癌患者 1 例が CFZ により 2 年以上にわたり部分奏効 (PR) が維持され、非小細胞肺癌患者 1 例において 10 ヶ月以上にわたり安定 (SD) が維持された¹⁾。プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ (BTZ) もプラチナ製剤既治療の肺癌において著効例が報告されている²⁻³⁾。これらの結果はプロテアソーム阻害剤が効果を示す肺癌症例が少数ではあるものの存在すること、プラチナ製剤への耐性獲得がプロテアソーム阻害剤への感受性に影響を与える可能性を示唆している。

プロテアソーム阻害剤および IP 阻害剤は肺癌において単剤治療、併用治療いずれも臨床試験が行われているが有効性は証明されていない⁴⁻⁵⁾。有効性を予測するバイオマーカーを探索した上で対象をプラチナ系製剤耐性肺癌に絞って治療応用を目指すことが重要と考えられる。

臨床研究の結果を参考にすれば IP 阻害剤が有効である症例は CDDP 耐性肺癌の数%と決して多くはないと予測される。しかし既に ROS1 阻害剤、BRAF 阻害剤など有効である症例が肺腺癌の 1-2% を占めるに過ぎない薬剤も患者選択のためのバイオマーカーと共に臨床応用されている⁶⁾。従ってプラチナ製剤耐性肺癌を対象とした IP 阻害剤治療も効果予測マーカーが同定されれば臨床応用可能で患者利益にかなうものと考えられた。

2. 研究の目的

- (1) シスプラチン耐性肺癌細胞に対する IP 阻害薬の有効性の検討を行う。
- (2) シスプラチン耐性肺癌における IP 阻害剤の効果を予測するバイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1) シスプラチン耐性細胞の作製

in vitro においてシスプラチン耐性肺癌細胞を作成した。非小細胞肺癌細胞株 A549、H1299、H1975 および小細胞肺癌細胞株 SBC3、SBC5 を用いて作成した。継代培養する際に低濃度のシスプラチンを添加することで耐性を誘導した。作成したシスプラチン耐性細胞は親細胞に対して IC50 で約 5-10 倍の耐性を誘導することに成功した (MTT アッセイ法)。このシスプラチン耐性細胞を用いて以下の検討をおこなった。

(2) プロテアソームサブユニットおよび免疫プロテアソームサブユニット発現の検討

親細胞株および作成したシスプラチン耐性細胞を用いてプロテアソームサブユニットおよび免疫プロテアソームサブユニットの発現状況を、mRNA (定量的逆転写 PCR 法) およびタンパク質 (ウエスタンブロット法) において検討した。また蛍光器質を用いて免疫プロテアソームサブユニットによるタンパク分解活性を測定した。

(3) IP 阻害剤の有効性の検討

親細胞株および作成したシスプラチン耐性細胞を用いて、IP 阻害剤 CFZ、PR957 の感受性を MTT アッセイ法で検討した。

(4) シスプラチン耐性細胞における IP 阻害剤の作用機序の検討

免疫プロテアソーム阻害剤の細胞障害機序は、アポトーシスの誘導および細胞周期調節タンパクの分解抑制による細胞周期の乱れによるものとされている。シスプラチン耐性細胞においても同様の作用がみられるかどうか、フローサイトメトリー法および蛍光免疫顕微鏡を用いて検討した。

(5) シスプラチン耐性細胞における IP 阻害剤の効果予測バイオマーカーの検討

IP 阻害剤のシスプラチン耐性細胞における効果を予測するバイオマーカーの探索を定量的逆転写 PCR およびウエスタンブロット法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) シスプラチン耐性細胞の作製

作成したシスプラチン耐性細胞は親細胞に対して IC50 で約 5-10 倍の耐性を誘導することに成功した。

(2) プロテアソームサブユニットおよび免疫プロテアソームサブユニット発現の検討

いずれの細胞においてもシスプラチン耐性細胞は親細胞株に対し、免疫プロテアソームサブユニット PSMB8 および PSMB9 が mRNA、タンパク質いずれも高発現していた。また、PSMB8、PSMB9 によるタンパク分解活性(キモトリプシン様作用)もシスプラチン耐性細胞において亢進していた。A549、H1975、SBC5 においては親細胞に対するシスプラチン耐性での活性は 1.5 倍程度までにとどまったのに対し、H1299、SBC3 では約 3 倍まで亢進していた。

(3) IP 阻害剤の有効性の検討

H1299 および SBC3 においては、親細胞株に対してシスプラチン耐性細胞では CFZ および PR957 の IC50 は 1/10 ~ 1/2 に低下し、感受性が亢進した。一方で A549、H1975、SBC5 においては IC50 が 2 ~ 10 倍に上昇し、感受性は低下した。

したがって一部の肺癌においてはシスプラチン耐性化にともない IP 阻害剤の感受性が亢進し、IP 阻害剤が有効な治療選択肢となると考えられた。これは一部ではあるもののシスプラチン既治療においてプロテアソーム阻害剤および IP 阻害剤の著効例が観察されたという先行する臨床試験の結果¹⁻³⁾に一致する結果であると考えられた。

(4) シスプラチン耐性細胞における IP 阻害剤の作用機序の検討

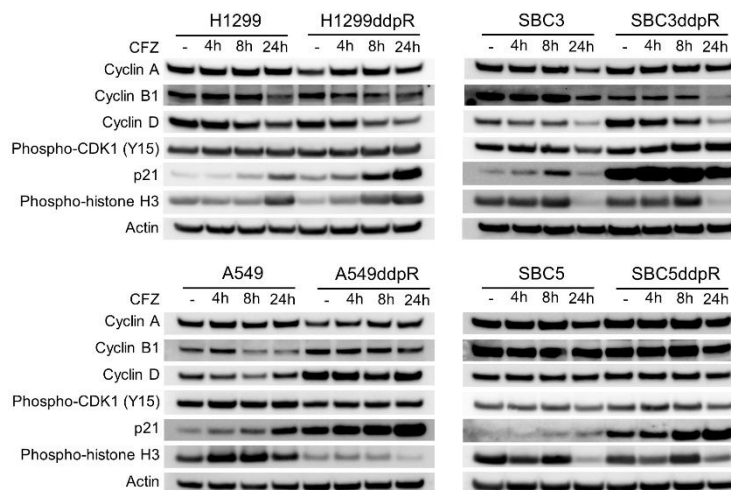
シスプラチン耐性細胞においても IP 阻害剤はアポトーシスおよび細胞周期の M 期、G2 期における停滞を誘導した。また、その誘導効果は H1299 および SBC3 のシスプラチン耐性細胞において大きかった。したがってシスプラチン耐性細胞においても IP 阻害剤の主な作用機序はアポトーシス誘導および細胞周期調整因子の分解抑制による細胞周期の乱れであると考えられた。

(5) シスプラチン耐性細胞における IP 阻害剤の効果予測バイオマーカーの検討

H1299、SBC3 はシスプラチン耐性化に伴いキモトリプシン作用の上昇が大きく、キモトリプシン作用の上昇幅が大きいことが IP 阻害剤の効果予測するバイオマーカーになりうると思われた。しかし実臨床において癌細胞の酵素活性を測定することは困難である。したがってその他のバイオマーカーの探索を行った。

(2) で測定した PSMB8 や PSMB9 の mRNA およびタンパク発現量の変化は IP 阻害剤の効果と相関せず、バイオマーカーになりえなかった。そこでアポトーシス調節、細胞周期調節に関連するタンパクや、ユビキチンプロテアソーム以外のタンパク分解機構であるオートファジーに関連するタンパクを種々の条件で検討した。IP 阻害剤投与下ではそれらの因子は増減し、IP 阻害剤への反応は見られるものの、IP 阻害剤の感受性との量的相関は見いだせず、治療効果予測因子にはならないことが判明した。

今後はさらに検索する因子を増やして検討し、IP 阻害剤の効果予測バイオマーカーを探索していくことが、シスプラチン耐性肺癌細胞における IP 阻害剤の臨床応用にむけた重要課題であると考えられる。



< 引用文献 >

- 1) Papadopoulos et al. Cancer Chemother Pharmacol 2013;71:1499-1506
- 2) Lara et al. J Thorac Oncol 2006;1:126-134
- 3) Drilon et al. Cold Spring Harb Mol Case Stud 2019;5: a003665
- 4) Kontopodis et al. Cancer Chemother Pharmacol 2016;77:949-956
- 5) Arnold et al. Invest New Drugs 2017;35:608-615
- 6) Arbour et al. JAMA 2019;322:764-774

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tetsuaki Shoji
2. 発表標題 The immunoproteasome as a potential therapeutic target in cisplatin-resistant small cell and non-small cell lung cancer
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021)
4. 発表年 2021年～2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------