

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590180

研究課題名（和文） 複数のキナーゼ経路活性化が関与した抗腫瘍薬耐性機構を制御する分子標的薬剤

研究課題名（英文） Targeted therapy for anti-cancer drug resistance mediated by several kinase pathways activation

研究代表者

小林 広幸（KOBAYASHI HIROYUKI）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60195807

研究成果の概要（和文）：急性骨髄性白血病の治療で標準的に使われている抗腫瘍薬イダルビシンに耐性となった細胞で、発現亢進が確認されている種々のリン酸化酵素を抑制しうる核酸製剤を耐性細胞に導入した結果、標的とする遺伝子の発現が抑制され、その遺伝子発現の抑制度に応じてイダルビシンに対する耐性が部分的に克服されることが確認された。活性化されているリン酸化酵素を阻害する分子標的薬および阻害剤を用いると、酵素阻害のレベルに応じてイダルビシンに対する耐性が部分的に克服されることが確認された。

研究成果の概要（英文）：Idarubicin is one of the standard treatments for patients with acute myeloid leukemia. We have developed human acute leukemia cell line resistant to idarubicin. Several kinase pathways were activated in the resistant cell line. Small interfering RNA-mediated gene silencing of the activated kinases resulted in the partial reversal of drug resistance. The magnitude of reversal depended on the effectiveness of gene silencing. The resistance for idarubicin was also partially overcome by means of molecular targeted drugs or inhibitors that inhibit the activated kinases. The magnitude of reversal depended on the effectiveness of kinase inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：癌・薬剤反応性・酵素・シグナル伝達・核酸

1. 研究開始当初の背景

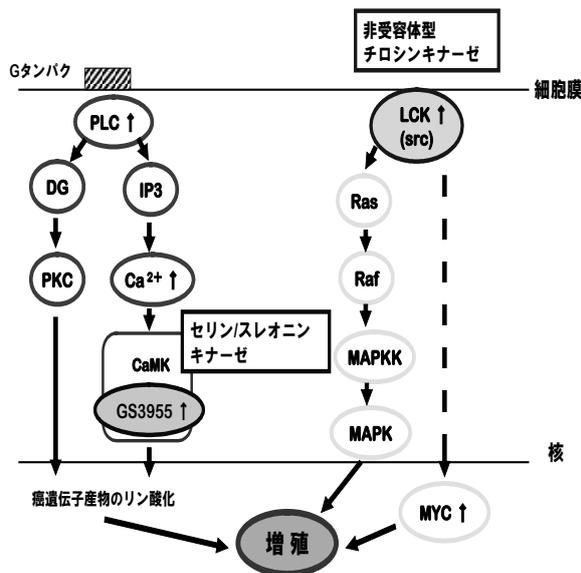
抗腫瘍薬耐性は、多くの悪性腫瘍を治療する際に非常に大きな障壁となっている。キナーゼ経路は、様々な悪性腫瘍で異常な活性化が観察されており、また経路の異常な活性化は腫瘍の悪性度や抗腫瘍薬耐性機構と密接な関連があることが報告されているため、そ

のような経路は創薬ターゲットとして有効であると考えられている。しかし、各種のキナーゼ経路は正常細胞の増殖・生存などにも重要な役割を果たしているため、細胞機能の維持に必要な経路をも非選択的に抑制することは生体にとって有害となる可能性が考えられる。そこで本研究では、「抗腫瘍薬耐

性機構と関わりの深い機能を選択的に抑制する」ことを目的として、抗腫瘍薬に耐性化したヒト腫瘍細胞で「薬剤耐性に関連する活性化経路の探索」と「過度に活性化した経路の抑制による耐性克服」を試みる。

2. 研究の目的

抗腫瘍薬の耐性は多くの機構が関与している。そこで、新たな耐性遺伝子の遺伝子発現異常や制御異常を明らかにする目的で、抗腫瘍薬耐性白血病細胞における耐性遺伝子発現のプロファイルを cDNA マイクロアレイにより解析した結果、イダルビシン耐性 (10 倍) 白血病細胞ではトポイソメラーゼ II α の低下とセリン/スレオニンキナーゼと推測される GS3955 蛋白 および LCK というリンパ球特異的チロシンキナーゼの発現亢進 (3-5 倍) が判明した。トポイソメラーゼ II α の低下は、アンスラサイクリン系抗腫瘍薬やトポイソメラーゼ阻害薬の耐性機序として知られているが、GS3955 蛋白 や LCK の発現亢進が抗腫瘍薬耐性に直接寄与しているという報告は見あたらなかった。但し、LCK の発現亢進がアポトーシスを抑制しているという報告が数件あり、抗腫瘍薬で誘導されるアポトーシスを回避することで抗腫瘍薬耐性が起こる可能性は十分に考えられる。



図に示されるように、刺激にตอบสนองしてホスホリパーゼCが活性化され、イノシトール3リン酸とジアシルグリセロールに分解される。イノシトール3リン酸が細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させてカルモジュリンキナーゼ、GS3955 を活性化し、癌遺伝子産物をリン酸化することで細胞増殖を引き起こす。LCK (src) が活性化され、Ras / MAP キナーゼを介してシグナルを核内に伝えるとともに、MYC の発現が亢進し、細胞増殖に関与する。このように細胞増殖の活性化を介し

て、抗腫瘍薬耐性が引き起こされる経路が想定される。

阻害剤およびRNA干渉法を用いることによって、イダルビシン耐性白血病細胞で発現が亢進している GS3955、LCK、さらにそれらに関わる経路を標的として抑制を試みて、抗腫瘍薬に対する耐性度を指標として異常活性化経路の抑制が抗腫瘍薬耐性に与える効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) RNA干渉法 siRNAによる耐性候補遺伝子の機能解析:

イダルビシン耐性細胞での発現亢進が確認されているキナーゼ (GS3955、LCK) に対する siRNA を Tuschl らの方法 (Nature 411: 494, 2001) に従ってデザインし、ショートヘピン構造発現プラスミドを用いて耐性細胞に導入し安定クローンを得る。安定クローンにおいて、標的とする遺伝子 (GS3955、LCK) の発現が抑制されているかどうかを real-time PCR 法にて確認する。siRNA により耐性遺伝子を抑制したクローン (GS3955 単独抑制、LCK 単独抑制、GS3955 と LCK の両方を抑制) でイダルビシンに対する耐性が克服されるかどうかを MTT アッセイ (Kobayashi H, International Journal of Cancer 81:944, 1999) にて検討する。

(2) マイクロアレイを用いた更なる耐性因子の候補遺伝子探索:

GS3955 と LCK 両方の発現を抑制してもイダルビシンに対する耐性が完全には克服できない場合に、他の耐性因子が関与している可能性を想定して、薬剤耐性白血病細胞と感受性細胞について cDNA 数のより多いマイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイル解析を繰り返す (研究協力者・米国 Vanderbilt 大学癌センター生物統計部門長・Yu Shyr 教授と共同解析)。発現が亢進している遺伝子について、それらの発現を real-time PCR 法にて確認する。耐性因子の新たな候補遺伝子について、上記と同様に siRNA による機能解析を行い、発現抑制で耐性克服が可能かどうかを検討する。

(3) 既存の阻害剤による機能解析:

既に承認されている分子標的薬および試薬として使用されている阻害剤を用いて、イダルビシン耐性細胞においてイダルビシンに対する耐性が克服されるかどうかを MTT アッセイにて検討する。この際に、阻害剤単独では感受性細胞および耐性細胞にて細胞毒性がない濃度を実験的に調べておき、その範囲内でイダルビシンと併用した時に耐性克服効果が発揮されるかどうかを検討する。

(4) 新規の阻害剤による機能解析：

研究協力者である米国 Vanderbilt 大学癌センター第1相試験チーム・Mace L. Rothenberg 教授より、National Cancer Institute が Investigational New Drug として受理した分子標的薬で第1相試験施行中のものについて安全性等の情報を入手する。有望なものの中で試薬として入手可能な一部の阻害剤を用いて、イダルビシン耐性細胞においてイダルビシンに対する耐性が克服されるかどうかを MTT アッセイにて検討する。

(5) 抗腫瘍薬・阻害剤・siRNA の至適投与法の検討：

耐性細胞で活性化されている経路を抑制する阻害剤や siRNA と抗腫瘍薬の投与のタイミング・スケジュールおよび投与量など、阻害剤単独では細胞毒性を發揮せず抗腫瘍薬と組み合わせたときに抗腫瘍薬耐性克服効果が最大限に發揮されるような至適投与法を検討する。得られたデータを将来の臨床試験デザインの参考にすべく、研究協力者である米国 Vanderbilt 大学癌センター第1相試験チーム・Mace L. Rothenberg 教授と討議する。

4. 研究成果

(1) 急性骨髄性白血病の標準治療薬として使われているイダルビシンに耐性となった細胞での発現亢進が確認されているキナーゼ (GS3955、LCK) を抑制しうる核酸製剤 (siRNA) を耐性細胞に導入し、標的とする遺伝子 (GS3955、LCK) の発現が抑制されたことを確認した。さらに遺伝子発現の抑制制度に応じて、イダルビシンに対する耐性が部分的に克服されることを薬剤感受性試験 (MTT アッセイ) で確認した。酵素阻害のレベルでも耐性克服の程度を調べるため、承認されている分子標的薬および試薬として使用されている阻害剤を用いて、イダルビシン耐性細胞においてイダルビシンに対する耐性が克服されるかどうかを検討した。遺伝子発現レベルと同様に、酵素阻害のレベルでも耐性の克服が部分的であったので、他の耐性因子が関与している可能性を想定して、薬剤耐性白血病細胞と感受性細胞についての比較をより遺伝子数の多いマイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイル解析および array based Comparative Genomic Hybridization 法を実施した。(→(3))

(2) siRNA を導入した際の遺伝子発現変化については、高次元データ解析、パスウェイ解析に関して効率の良い解析法を Vanderbilt 大学の Yu Shyr 教授と共同で sensitivity index method と general linear model based method を開発した。

(3) 急性骨髄性白血病の標準治療薬として使われているイダルビシンに耐性となったヒト造血器腫瘍細胞において、親細胞株をリファレンスとして特異的に変化している領域を array based Comparative Genomic Hybridization 法を用いて抽出した。その結果、683 領域がマルチコピー化した候補領域、889 領域が欠失あるいは変異が入った候補領域であった。また、耐性細胞で欠失のみられた 889 プローブからさらに 165 プローブを抽出することができた。これらの遺伝子の中には、キナーゼも含まれていた。今後、薬剤耐性白血病細胞と感受性細胞についての比較を全ゲノム解析で施行し、「薬剤耐性に関連する活性化経路の探索」をより詳細に進めて行く予定である。

(4) 耐性細胞で活性化されている経路を抑制する阻害剤や siRNA と抗腫瘍薬の投与のタイミング・スケジュールおよび投与量など、阻害剤単独では細胞毒性を發揮せず抗腫瘍薬と組み合わせたときに抗腫瘍薬耐性克服効果が最大限に發揮されるような至適投与法を、米国 Vanderbilt 大学癌センター第1相試験チーム・Mace L. Rothenberg 教授から臨床試験で実施されている投与スケジュールの情報を入手し、それも参考として検討した。今後も、マルチキナーゼ阻害薬、または複数のキナーゼ阻害薬の組合せで、抗腫瘍薬耐性克服効果が最大限に發揮されるような至適投与法の基礎的検討を重ねて、将来の臨床試験の基盤とする。

臨床試験においてもキナーゼ阻害剤の選択性の緩さという不利なはずの局面が有利になる現象がみられている。なぜならば多くの腫瘍細胞では唯一のシグナル伝達経路で増殖や抗腫瘍薬耐性が制御されているのではなく、複数のカスケードを利用しているものが多いからである。また、悪性腫瘍においてはキナーゼに突然変異が最も高頻度で発生することがわかっており、この点でも選択性の高い阻害剤で酵素活性部位等における点突然変異が耐性を誘導するという不利な状況を生み出している。複数のカスケードに作用する薬剤では、耐性化には複数の突然変異が協調して起こる必要があり、その頻度は単一の突然変異の頻度よりずっと少ないと想定される。本研究で用いた独自に樹立した複数のキナーゼ経路活性化が関与した抗腫瘍薬耐性細胞を活用して、抗腫瘍薬への感受性という表現型を指標とすることにより効率よく複数の活性化された経路を抑制しうる阻害薬や siRNA のスクリーニングを継続していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Nozaki M, Yoshikawa M, Ishitani K, Kobayashi H, Houkin K, Imai K, Ito Y, Muraki T. Cysteinyl leukotriene receptor antagonists inhibit tumor metastasis by inhibiting capillary permeability. Keio Journal of Medicine, 59, 10-18, 2010. 査読有.

[学会発表] (計1件)

MURAYAMA C, S-1 enhances radiosensitivity in a mouse xenograft model of human colon cancer. Joint ECCO 15- 34th ESMO Multidisciplinary Congress. 2009年9月23日, Berlin.

[その他]

ホームページ等

<http://www.cp-tokai.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 広幸 (KOBAYASHI HIROYUKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：60195807

(2) 研究協力者

Mace L. Rothenberg

Vanderbilt 大学・癌センター・教授

Yu Shyr

Vanderbilt 大学・癌センター・教授