

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3月31日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592125

研究課題名（和文） PET検査による抗癌剤感受性試験法の開発：腫瘍細胞内P糖蛋白発現の画像化の試み

研究課題名（英文） Development of sensitivity test for anti-cancer agents by PET imaging：Try the imaging of P-glycoprotein in cell

研究代表者

黒川 哲司（KUROKAWA TETSUJI）

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60334835

研究成果の概要（和文）：卵巣癌に対する抗癌剤感受性試験の標的とした二つの蛋白は間違いないと確信が得られる結果が出た。しかし、その蛋白をイメージングする薬剤の精度が目的とする結果に達成できなかった。その為、動物実験まで行う事が出来なかった。しかし、抗癌剤抵抗性のメカニズムの一つを解明することができた為、論文を作成し、公表する事ができた。

研究成果の概要（英文）：Our data indicated the possibility that two proteins (P-glycoprotein and hCtr-1) were target protein of sensitivity test for anti-cancer agents. And we weren't able to get the success of making the molecular imaging drug for the proteins. We could resolve one of the mechanism for resistance of anti-cancer drugs and release the manuscript publication

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：婦人科腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、本邦における女性性器悪性腫瘍の中で最も死亡数が多く、予後不良な癌の一つである。その治療法は、手術療法が第一選択だが、手術不能例も多く、化学療法も重要な役割を担っている。そして、その化学療法剤の key drug は、プラチナ製剤である。

卵巣がんの予後改善を目指している臨床家・研究者の大きな関心事の一つは、プラチナ抵抗性卵巣癌や、プラチナ抵抗性を獲得し

た再発癌の取り扱いである。そして、その取り扱いを考える為に、プラチナ抵抗性の機序の解明が進んできている。

たくさんの耐性機序が、過去の報告で、解明されている。その機序は、大きく2つに分けられる。プラチナ製剤が細胞内に取り込まれ、DNA鎖内に架橋を形成するまでの薬理作用部分の阻害とDNA鎖内に架橋を形成してから、アポトーシスを誘導にしていくまでの分子生物学的部分の阻害の2つである。

我々の研究は、上の部分の薬理学的部分に位置し、その中のプラチナ製剤を細胞内に取り込む膜輸送タンパクである hCTR-1 (Human copper transporter 1) 蛋白と排出たんぱくである P 糖蛋白に着眼したものである。今回の研究初期では当初 P 糖蛋白に着眼して研究を進めたが、hCTR-1 の方が有力である事を解明し報告した。(Kurokawa .Cancer Chemother Pharmacol 2010)

hCTR-1 とは

多くの *in vitro* と動物モデルを使用した *in vivo* の研究で、hCTR-1 は、プラチナ製抗癌剤を細胞内に運ぶ主な膜輸送蛋白であることが証明されてきている。

そして近年、ヒト卵巣がん患者の腫瘍組織を使用した研究で、プラチナ製抗癌剤抵抗性腫瘍は、感受性腫瘍と比較して、hCTR-1 mRNA の発現が低いことが確認された。さらに、子宮頸癌マウスモデルを使用した *In vivo* の研究において、シスプラチンと銅のキレート剤を使用する事で、シスプラチナの抗腫瘍効果を高め、はじめて hCTR-1 によるプラチナ抵抗性癌の克服法も報告された。このように、hCTR-1 は、プラチナ抵抗性の機序の一つとして、注目されている。

我々の hCTR-1 に関する報告

我々の研究室は MD Anderson Cancer Center の Prof.Siddik 研究室との共同研究で、「卵巣がん細胞株に対し、シスプラチンと、ある種のリン酸化阻害剤を投与することで、シスプラチンの分子生物学的な抗腫瘍作用に相乗効果をもたらす否か」という研究を行った。しかし、その結果は、仮説に反し、シスプラチンの抗腫瘍効果を阻害した。その原因は、リン酸化阻害剤が、hCTR-1 発現を阻害し、シスプラチンの細胞内濃度を低下させ、抗腫瘍作用を阻害した事を発見し報告した。この発見は、分子生物学的部分に着眼した

分子標的治療剤が、必ずしも効果を示さない理由の一つを証明するもので、臨床的には大きな意味を持つ報告と考えられた。

2. 研究の目的

今回の検討の目的は、「hCTR-1 蛋白発現が、治療経過により変化を起こすか否か」、つまり、治療により獲得されるプラチナ抵抗性能に關与するのかを *in vitro* と *in vivo* の両面から検討した。

さらに、これまでの報告のほとんどが *in vitro* の研究であったため、実際にプラチナ抵抗性卵巣患者に、どの程度關与するかは詳細に理解されていない。

卵巣癌患者からの組織標本を使用し、「hCTR-1 蛋白発現が、組織型により違いがあるのか否か」、そして、「抗癌剤の感受性と相関するの否か」を検討した。

3. 研究の方法

In vitro の実験に使用された卵巣癌細胞株は、プラチナ感受性株 (A2780) とその細胞から作成された耐性株 (2780CP) を使用した。

細胞内プラチナ濃度の測定は、シスプラチン 100 μ M を 4 時間、各々細胞に暴露し、各々の細胞内プラチナ濃度を計測した。そして、次に、シスプラチンと hCTR-1 阻害剤 (Casein kinase inhibitor) を同時に投与し、再び各々の細胞内プラチナ濃度を原子吸光度計で計測した。

In vivo 実験の対象は、2006~2008 年に初回手術療法で治療した上皮性卵巣癌 16 例 (漿液性腺癌 11 例、明細胞腺癌・粘液性腺癌 5 例) とした。hCTR-1 蛋白発現は、Alison K. Holzer らの方法を参考に、hCTR-1 抗体 (Novus biological) を使い、免疫組織学的手法で観察した。発現の強さは、陽性細胞数/

腫瘍細胞 (%) で現した。

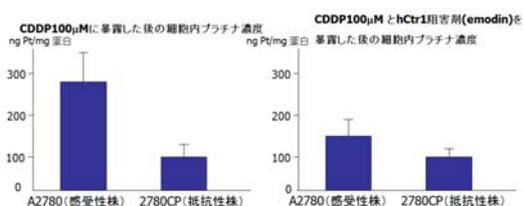
4. 研究成果

1-1. A2780 と 2780CP で hCTR-1 機能を比較

hCTR-1 阻害剤を使用しなかったとき、感受性株と耐性株の細胞内プラチナ濃度には、大きな差を認めた。そこに、hCTR-1 阻害剤を加えると感受性株では、約 50%細胞内プラチナ濃度が、低下するのに対し、耐性株では、ほとんど変化を認めなかった。

つまり、耐性株では、hCTR-1 の発現が、もともと低く、阻害剤の影響を受けなかった可能性が考えられた。

この結果は、hCTR-1 の発現が、プラチナ製剤で治療することにより低下し、後天的に獲得する抵抗性能の可能性が考えられた。



1-2. hCTR-1 発現量は治療経過とともに変化するかどうか。

初回開腹時と化学療法後に腫瘍組織を採取できた漿液性腺癌 4 例において、hCTR-1 蛋白発現の違いを観察した。

プレリミナリーなデータですが、4 例全てに発現量の変化は認めなかった。つまり、hCTR-1 発現は、治療経過と共に変化しなかった。Cancer Chemotherapy Pharmacology

2. hCTR-1 発現は組織型により違いがあるのか。

漿液性腺癌 11 例と明細胞腺癌・粘液性腺癌 5 例の hCTR-1 蛋白発現を比較した。

結果は、漿液性腺癌での hCTR-1 蛋白発現

は高く、明細胞腺癌・粘液性腺癌では低かった。この結果は、プラチナ製抗癌剤に対する感受性が組織型による違う理由の一つである可能性が示唆された。

3. 卵巣がん組織における hCTR-1 蛋白発現の相異と臨床データ

2006～2008 年に当院で初回手術を施行した臨床進行期Ⅲ期とⅣ期の漿液性腺癌 11 例に対し、免疫染色による蛋白発現と、抗癌剤終了から再発までの期間に相関があるかを検討した。結果は、hCTR-1 発現量とプラチナ製剤の反応とに相関を認めなかった。

この結果から、漿液性腺癌の中でのプラチナ製抗癌剤に対する効果の差は、別の耐性機序の関与が考えられた。

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)

- ① Kurokawa T, He G, Siddik ZH
Protein kinase inhibitors emodin and dichloro-ribofuranosylbenzimidazole modulate the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin in a schedule-dependent manner. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2010.65(3):427-36.
査読有
DOI:10.1007/s00280-009-1045-2

[学会発表] (計 1 件)

- ① 第 50 回日本婦人科腫瘍学会 2011/07/22 シンポジスト
黒川 哲司, 吉田 好雄, 後藤健次, 辻隆博, 品川 明子, 澤村 陽子, 津吉秀昭, 小辻 文和
プラチナ抵抗性卵巣癌の機序の一つである hCTR-1 の機能についての検討

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 哲司 (KUROKAWA TETSUJI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：60334835

(2)研究分担者

清野 泰 (KIYONO YASUSI)
福井大学・
高エネルギー医学研究センター・教授
研究者番号：50305603

小辻 文和 (KOTSUJI FUMIKAZU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：50153573

吉田 好雄 (YOSHIDA YOSHIO)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：60220688

品川 明子 (SHIGAWA AKIKO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：90444223