

## 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25年 5月28日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390254

研究課題名（和文） 網羅的薬剤トランスポーター絶対定量による胆道癌の抗癌剤感受性・耐性予測

研究課題名（英文） Prediction of sensitivity and tolerance of anticancer drug for biliary tract cancer by applying a combination of targeted proteomics and metabolomic analyses.

研究代表者

海野 倫明 (UNNO MICHIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70282043

研究成果の概要（和文）：胆道癌や膵癌において塩酸ゲムシタビンなどの抗癌剤の効果を予測することは、生存率の向上のみならず患者のQOL向上に重要である。我々は胆道癌・膵癌細胞株を用いて、薬剤の取込みや排泄に関与するトランスポーターおよび薬物代謝に関係する酵素等を網羅的に同時測定し、抗癌剤の感受性・耐性が予測できないかを検討した。その結果デオキシシチジンキナーゼ(dCK)の発現低下が抗癌剤耐性をもたらしていることを明らかにした。現在前向き臨床試験として、胆道癌・膵癌の切除標本から組織を抽出し臨床経過に照会し解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：To predict the effect of anti-cancer drugs, such as gemcitabine in pancreatic cancer and biliary tract cancer, is also crucial to improve QOL of patients not only improve the survival rate. By combination of targeted proteomics and metabolomic analyses, we investigated the quantitation of membrane transporters and enzymes for drug metabolism using the biliary tract cancer and pancreatic cancer cell line. We found that reduced expression of deoxycytidine kinase (dCK) are brought anticancer drug resistance. Now, we are analyzing the surgical specimens of biliary tract cancer and pancreatic cancer and referring to clinical outcome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：胆道外科学

キーワード：胆道癌、膵癌、塩酸ゲムシタビン、トランスポーター、薬剤感受性、薬剤耐性

## 1. 研究開始当初の背景

胆道癌は現在においても最難治癌の一つであり治療成績の向上が望まれている。塩酸ゲムシタビン(Gemcitabine)、TS-1等の新規抗癌剤の登場・普及により治療成績の向上の

兆しが見られているが、奏効率は低率で有害事象も希ではない。そのため外科切除標本から抗癌剤の感受性・耐性に関する情報を得て効果予測を行うことが重要と考えられる。我々は細胞膜表面に存在する各種薬物トラ

ンスポーターを発見し、トランスポーターの発現と抗癌剤感受性・耐性との関連を研究してきた。薬物動態から見ると、取込側トランスポーターと排出側トランスポーターの両者の機能の総和により抗癌剤の細胞内濃度が決定され、殺細胞効果に関与することを明らかにしてきた。本研究では、科学研究費補助金を申請する平成 22 年度から平成 24 年度の 3 年間に、東北大学薬学部で開発された LC-MS/MS 質量分析装置による網羅的トランスポーター定量法を応用し、胆道癌細胞株および手術標本から得られた細胞膜画分中の約 100 種類のトランスポーター蛋白を絶対定量し、Gemcitabine, 5FU, CDDP の感受性・耐性との相関を検討する。さらに、本プロテオミクス研究で得られた知見からこれら抗癌剤の感受性・耐性を決定するトランスポーター群を同定し、効果予測等の臨床応用を目指すものである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胆管癌培養細胞株や膵癌培養細胞株を用いて塩酸ゲムシタビンの感受性・耐性機構を LC-MS/MS 分析装置を用いた Proteomics, Metabolomics によって明らかにすることである。またこの手法が臨床検体から測定することによって実際の臨床現場で用いられることが可能かどうかを検証することが目的である。

## 3. 研究の方法

我々は膵癌培養細胞株 PK-9 と GEM 耐性細胞株 RPK-9 の細胞から膜タンパクおよび細胞質のタンパク質を抽出し、25 種類の酵素とトランスポーターを LC-MS/MS を用いて定量した。同時に、6 種類の塩酸ゲムシタビン代謝物をも定量し、PK-9 と RPK-9 を比較定量することで GEM 耐性のメカニズムを検討した。膵癌細胞内にトランスポーターによって輸送された塩酸ゲムシタビン (dFdC) は、リン酸化を触媒する deoxycytidine kinase (dCK) によってリン酸化をうける。この dCK タンパク質は PK-9 に比較し RPK-9 は 0.05 倍と著明に減少していた。その他の酵素で大きく変化しているものは認められなかった。また、リン酸化 GEM である dFdCMP, dFdCDP, dFdCTP は、RPK-9 においてほとんど確認されなかった。細胞外における非活性型である dFdU の濃度は、PK-9 と RPK-9 とでは有意差を認めなかった。以上の結果から、RPK-9 の獲得耐性は、dCK の発現低下により dFdC のリン酸化の低下によりもたらされていることを我々は明らかにした。さらに、我々は胆管癌細胞株である TFK-1 についても同様の検討を行った。

また、我々は塩酸ゲムシタビン耐性細胞株の機序を遺伝子変異の点から検討した。耐性株において、dCK 遺伝子の homozygous

deletion 等の変異が確認され、その結果、dCK の発現低下がもたらされていることを明らかにした。

## 4. 研究成果

本研究結果により、従来最も感受性や耐性に関与していると考えられていた核酸トランスポーター (hENT) の関与が少なく、dCK の関与が極めて強いことを示し、従来とは異なる結果であり国内外でさらに検討が進んでいる。また、手術検体の一部を LC-MS/MS を用いた Proteomics, Metabolomics により解析する手法は、これら機器の進歩により、より短時間・高感度・多種の蛋白定量を可能にしており、今後、抗癌剤感受性・耐性のみならず、癌の悪性度評価や個別化治療に繋がる新知見が得られるものと考えている。

## 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 16 件) すべて査読有り

1. Takadate T, Onogawa T, Fukuda T, Motoi F, Suzuki T, Fujii K, Kihara M, Mikami S, Bando Y, Maeda S, Ishida K, Minowa T, Hanagata N, Ohtsuka H, Yu Katayose, Egawa S, Nishimura T, Unno M. Novel prognostic protein markers of resectable pancreatic cancer identified by coupled shotgun and targeted proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int. J. Cancer*. 2013; 132: 1368-1382. DOI10.1002/ijc.27797

2. Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, Douchi D, Oikawa M, Rikiyama T, Fukase K, Katayose Y, Egawa S, Unno M. GCF2/LRRFIP1 promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin-dependent RhoA activation. *Cancer Lett*. 2012;325:99-107. DOI10.1016/j.canlet.2012.06.012

3. Katayose Y, Nakagawa K, Yamamoto K, Yoshida H, Hayashi H, Mizuma M, Ohtsuka H, Fukase K, Onogawa T, Motoi F, Rikiyama T, Egawa S, Unno M. Lymph Nodes Metastasis is a Risk Factor for Bone Metastasis From Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2012; 59: 1758-1760. DOI 10.5754/hge11806

4. Katayose Y, Ohtsuka H, Kitamura Y, Masuda K, Nakagawa K, Yamamoto K, Yoshida H, Onogawa T, Motoi F, Naitoh T, Rikiyama T, Egawa S-I, Unno M. An analysis of a

second-line S-1 monotherapy for gemcitabine-refractory biliary tract cancer. *Hepatogastroenterology*. 2012;59:691-695.  
DOI 10.5754/hge11530

5. Ohmine K, Kawaguchi K, Ohtsuki S, Motoi F, Egawa S, Unno M, Terasaki T. Attenuation of phosphorylation by deoxycytidine kinase is key to acquired gemcitabine resistance in a pancreatic cancer cell line: targeted proteomic and metabolomic analyses in PK9 cells. *Pharm. Res.* 2012;29:2006-2016.  
DOI 10.1007/s11095-012-0728-2

6. Takadate T, Onogawa T, Fujii K, Motoi F, Mikami S, Fukuda T, Kihara M, Suzuki T, Takemura T, Minowa T, Hanagata N, Kinoshita K, Morikawa T, Shirasaki K, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Nishimura T, Unno M. Nm23/Nucleoside Diphosphate Kinase-A as a Potent Prognostic marker in Invasive Pancreatic Ductal Carcinoma Identified by Proteomic Analysis of Laser Micro-dissected Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue. *Clin Proteomics*. 2012;9:8-8.  
DOI 10.1186/1559-0275-9-8

7. Saiki Y, Yoshino Y, Fujimura H, Manabe T, Kudo Y, Shimada M, Mano N, Nakano T, Lee Y, Shimizu S, Oba S, Fujiwara S, Shimizu H, Chen N, Nezhad ZK, Jin G, Fukushima S, Sunamura M, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;421:98-104.  
DOI 10.1016/j.bbrc.2012.03.122

8. 水間 正道, 中川 圭, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 海野 倫明: 進行胆管癌に対する neo-adjuvant therapy: 外科 74 巻 9 号 962-965 (2012.09)

9. 元井 冬彦, 島村 弘宗, 石山 秀一, 及川 昌也, 桜井 直樹, 阿南 陽二, 中村 隆司, 内山 哲之, 片寄 友, 海野 倫明, 宮城肝胆膵癌化学療法研究会: 膵臓癌切除後腫瘍マーカー非正常化は重要な予後因子である: 日本消化器外科学会雑誌 45 巻 7 号 697-707 (2012.07)

10. 石田 晶玄, 元井 冬彦, 坂田 直昭, 内藤 剛, 力山 敏樹, 片寄 友, 江川 新一,

海野 倫明: 最新の膵癌化学療法: 外科 74 巻 5 号 523-529 (2012.05)

11. Katayose Y, Rikiyama T, Motoi F, Yamamoto K, Yoshida H, Morikawa T, Hayashi H, Kanno A, Hirota M, Satoh K, Ariga H, Suzuki M, Ohyauchi M, Kondo Y, Ikeya S, Ogawa Y, Shimosegawa T, Egawa S, Unno M. Phase I trial of neoadjuvant chemoradiation with gemcitabine and surgical resection for cholangiocarcinoma patients (NACRAC study). *Hepatogastroenterology*. 2011; 58: 1866-1872.  
DOI 10.5754/hge10106

12. Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, Rikiyama T, Motoi F, Katayose Y, Unno M, Johnson AC. GC-binding factor 2 interacts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines. *Int. J. Cancer*. 2011;129:1599-1610.  
DOI 10.1002/ijc.25837

13. Maeda S, Motoi F, Onogawa T, Morikawa T, Shigeru O, Sakata N, Takadate T, Naitoh T, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Paclitaxel as second-line chemotherapy in patients with gemcitabine-refractory pancreatic cancer: a retrospective study. *Int. J. Clin. Oncol.* 2011;16:539-545.

14. 元井 冬彦, 力山 敏樹, 片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明: 膵癌に対する術前化学療法: 日本消化器病学会雑誌 108 巻 10 号 1654-1660 (2011.10)

15. 元井 冬彦, 川口 桂, 大峰 健, 大槻 純男, 大塚 英郎, 力山 敏樹, 片寄 友, 江川 新一, 寺崎 哲也, 海野 倫明: 膵癌の個別化医療 分子生物学的解析を中心に: 外科 73 巻 10 号 1073-1078 (2011.10)

16. Motoi F, Rikiyama T, Katayose Y, Egawa S-I, Unno M. Retrospective Evaluation of the Influence of Postoperative Tumor Marker Status on Survival and Patterns of Recurrence After Surgery for Pancreatic Cancer Based on RECIST Guidelines. *Ann Surg Oncol*. 2010;18:371-379.  
DOI 10.1245/s10434-010-1311-x

[学会発表] (計 16 件)

1. 胆膵癌の化学療法の最前線 膵癌に対する術前化学療法(GS 療法)の有効性評価 大規模比較試験に向けて

元井 冬彦(東北大学 肝胆膵外科), 片寄 友,  
海野 倫明  
第 99 回日本消化器病学会総会 (2013. 3. 23:  
鹿児島)

2. 膵癌の外科治療成績の向上をめざして  
術前化学療法の有用性の検証からみた最適  
レジメンの探索

元井 冬彦(東北大学 消化器外科), 青木 豪,  
深瀬 耕二, 水間 正道, 大塚 英郎, 坂田  
直昭, 森川 孝則, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田  
恭徳, 吉田 寛, 内藤 剛, 片寄 友, 江川  
新一, 海野 倫明  
第 74 回日本臨床外科学会 (2012. 12. 1 : 東京)

3. 肝門部胆管癌の治療戦略 当科における  
肝門部胆管癌の治療戦略と切除成績

水間 正道(東北大学病院 肝胆膵外科), 吉  
田 寛, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田 恭徳, 森  
川 孝則, 大塚 英郎, 乙供 茂, 坂田 直昭,  
深瀬 耕二, 青木 豪, 元井 冬彦, 内藤 剛,  
片寄 友, 海野 倫明  
第 74 回日本臨床外科学会 (2012. 11. 30: 東京)

4. 切除企図膵癌に対する術前化学療法の  
意義・有用性の検証

元井 冬彦(東北大学 肝胆膵外科), 吉田 寛,  
片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明  
第 50 回日本癌治療学会 (2012. 10. 26 : 横浜)

5. 膵がん化学療法の新しい展開 切除可能  
膵癌に対する化学療法の新しい展開

江川 新一(東北大学 災害医療国際協力学),  
元井 冬彦, 海野 倫明  
第 50 回日本癌治療学会 (2012. 10. 26 : 横浜)

6. ゲムシタビン耐性胆道癌に対する S-1 の  
効果と有害事象の検討

片寄 友(東北大学 肝胆膵外科), 大塚 英郎,  
北村 洋, 益田 邦洋, 中川 圭, 山本 久仁  
治, 吉田 寛, 森川 孝則, 元井 冬彦, 力山  
敏樹, 林 洋毅, 水間 正道, 海野 倫明  
第 48 回日本胆道学会 (2012. 09. 21 : 東京)

8. 胆道癌のリスクファクター アーカイブ  
FFPE 組織を用いた MS 基盤プロテオミクスから  
の胆道癌マーカー群一斉検証と臨床シー  
ズへの展開

小野川 徹(東北大学病院 肝胆膵外科), 前  
田 晋平, 海野 倫明  
第 48 回日本胆道学会 (2012. 9. 21 : 東京)

9. 胆道癌の化学療法の現況 当科の胆道癌  
補助療法の現状

中川 圭(東北大学病院 肝胆膵外科), 片寄  
友, 海野 倫明  
第 48 回日本胆道学会 (2012. 9. 21 : 東京)

10. アーカイブ FFPE 組織からの質量分析基  
盤プロテオーム解析に基づく膵癌治療抵抗  
性予測

小野川 徹(東北大学病院 肝胆膵外科), 元  
井 冬彦, 高舘 達之, 森川 孝則, 前田 晋  
平, 白崎 圭一, 吉田 寛, 内藤 剛, 力山  
敏樹, 片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明  
第 43 回日本膵臓学会 (2012. 6. 28 : 山形)

11. 通常型膵癌の治療戦略 切除企図膵癌に  
対する術前治療戦略の意義

元井 冬彦(東北大学 肝胆膵外科), 力山 敏  
樹, 片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明  
第 43 回日本膵臓学会 (2012. 6. 28 : 山形)

12. 肝分化/再生/幹細胞 LC-MS/MS を用いた  
マウス再生肝におけるトランスポーターの  
絶対発現量解析

三浦 孝之(東北大学 大学院医学系研究科消  
化器外科学), 大塚 英郎, 内藤 剛, 力山  
敏樹, 片寄 友, 海野 倫明  
第 48 回日本肝臓学会 (2012. 6. 7 : 金沢)

13. 膵癌診療情報アーカイブとホルマリン  
固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いた質  
量分析基盤プロテオミクスからの治療抵抗  
性予測

高舘 達之(東北大学 消化器外科), 小野川  
徹, 元井 冬彦, 前田 晋平, 森川 孝則, 白  
崎 圭一, 内藤 剛, 力山 敏樹, 片寄 友,  
江川 新一, 海野 倫明  
第 112 回日本外科学会 2012. 4. 14 : 幕張)

14. 膵癌外科切除成績の向上を目指した治  
療戦略 切除企図膵癌に対する術前化学療法  
の有効性評価 R0 切除とマーカー陰性化に  
よる「真の」R0 率を指標として

元井 冬彦(東北大学 肝胆膵外科), 力山 敏  
樹, 片寄 友, 江川 新一, 海野 倫明  
第 112 回日本外科学会 (2012. 04. 12 : 幕張)

15. 化学療法の進歩に伴う進行膵胆道癌の  
手術適応 膵癌切除例における術前補助化学  
療法

江川 新一(東北大学 肝胆膵外科), 元井 冬  
彦, 石田 晶玄, 深瀬 耕二, 水間 正道, 坂  
田 直昭, 乙供 茂, 大塚 英郎, 森川 孝則,  
林 洋毅, 中川 圭, 岡田 恭徳, 小野川 徹,  
吉田 寛, 内藤 剛, 力山 敏樹, 片寄 友,  
海野 倫明  
第 112 回日本外科学会 (2012. 4. 12 : 幕張)

16. ゲムシタビン耐性膵癌細胞株における  
ゲムシタビン代謝の解析 (Analysis of  
gemcitabine metabolism in pancreatic  
cancer cell lines and their resistant cell

lines)(英語)

齋木 由利子(東北大学 院医・分子病理), 江川 新一, 砂村 眞琴, 海野 倫明, 堀井 明  
第70回日本癌学会総会(2011.10.4:名古屋)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

1. 名称: 胆道癌診断バイオマーカー

発明者: 小野川徹、海野倫明、前田心平

権利者: 東北大学

種類: 国内特許

番号: 特願 2011-107624

出願年月日: 平成 23 年 5 月 12 日

国内外の別: 国内

2. 名称: 膵臓癌診断・予後予測バイオマーカー

発明者: 小野川徹、海野倫明、元井冬彦、前田心平

権利者: 東北大学

種類: 国内特許

番号: 特願 2011-137320

出願年月日: 平成 23 年 6 月 21 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

海野 倫明 (UNNO MICHIAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 70282043

### (2) 研究分担者

片寄 友 (KATAYOSE YU)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 20302151

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: