

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 4月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591512

研究課題名（和文） 耐性機序を克服する新規抗癌剤ニュージェムシタビンの開発

研究課題名（英文） Development of new gemcitabine that can overcome acquired gemcitabine resistancy.

研究代表者

砂村 眞琴（SUNAMURA MAKOTO）

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：10201584

研究成果の概要（和文）：現時点で膵癌の化学療法は Gemcitabine（以下 GEM と略記）が最も有効であるが、獲得耐性が問題となる。耐性克服のための方策を検討するため、耐性株を複数樹立し、分子生物学的に検討したところ、deoxycytidine kinase（DCK）が高頻度に不活性化されていること、親株で DCK を不活性化させると耐性が生じ、耐性株に DCK を導入すると感受性が復活することを明らかにした。DCK の不活性化が GEM に対する獲得耐性の重要な原因であると考えられる結果である。

研究成果の概要（英文）：Gemcitabine（GEM here-in after）is the best chemotherapeutic agent to patients with pancreatic cancer to date. However, patients often acquire resistance to GEM. In order to overcome this acquired chemo-resistance, we performed molecular analyses and identified DCK as the key molecule for acquired resistance; (1) high frequency of inactivating mutation in acquired cancer cells, (2) introduction of DCK to resistant cells recovered chemo-sensitivity to GEM, and (3) knockdown of DCK in parental cells acquired chemo-resistance. These results demonstrate that inactivating mutation of DCK is one of the key alterations for acquisition of GEM resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・消化器外科学

キーワード：膵癌、薬剤耐性、ジェムシタビン、新規抗癌剤、DCK、S100A4

1. 研究開始当初の背景

ジェムザール（GEM）の登場により膵癌治療成績は改善したが、長期生存例を生み出すまでには至っていない。膵癌細胞や膵癌組織を用いたゲノム解析・プロテオミクス解析などから、GEMの薬剤耐性機序が明らかとなり、治療効果の予測などは可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、解明された GEM 薬剤耐性機序を標的とし、この障害を打破することが出来る新規抗癌剤 New-GEM を開発し、その臨床応用を目指すことである。New-GEM はトランスポーターに影響を受けない癌細胞内への移行が可能であり、癌細胞内で容易に活性

体となる特徴を有している。

3. 研究の方法

新規抗癌剤 New-GEM は NuCana BioMed Limited 社が作製し、海外共同研究者である英国 London 大学 Hammersmith 病院 Nagy Habib らと共に研究を進めていた。作製された薬剤の中から効果が優れているものを選別し、New-GEM の薬剤耐性に関する実験を行うこととした。

4. 研究成果

はじめに、抗癌剤耐性機構の理解のため、3 株の異なる GEM 感受性の膵癌細胞株（感受性が比較的高いもの、中等度のもの、比較的低いもの）を親株として GEM 耐性の細胞株を樹立した。並行して 10 種類の異なるシスプラチン（CDDP）感受性の頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）細胞株を親株として CDDP 耐性の細胞株を樹立した。

候補となる New-GEM の試作物が複数個樹立され、膵癌細胞株で検証したが、GEM 耐性細胞株には有効ではなかった。耐性機構打破に向けた New-GE のプロジェクトでは、さらに候補薬物の開発を進めることとした。

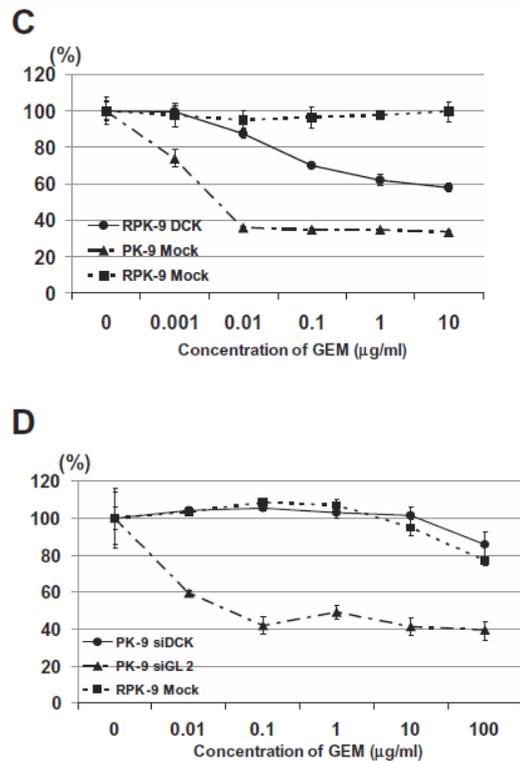
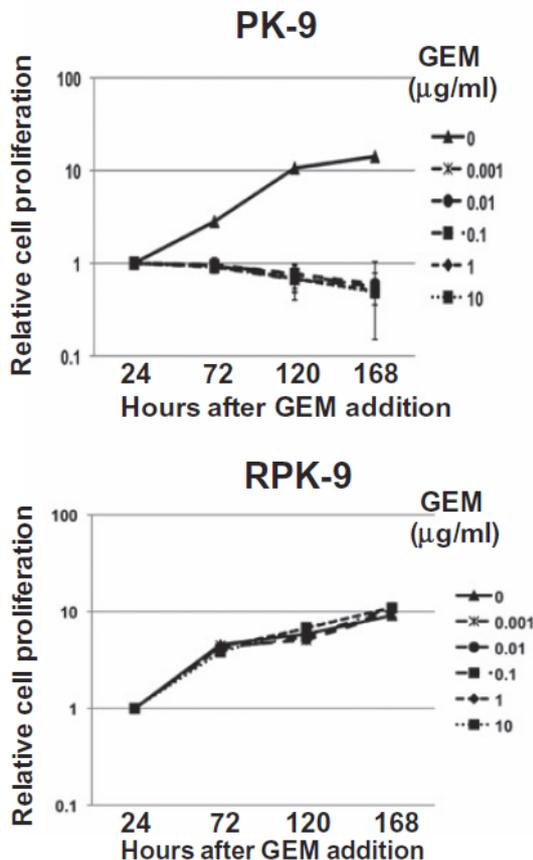
樹立した GEM 耐性膵癌細胞株 (3 株) と CDDP 耐性 HNSCC (1 株) で発現アレイ、マイクロ RNA アレイ解析を行い候補遺伝子を絞り込んだ。その結果、HNSCC では IGF2 遺伝子の高発現が CDDP 耐性の原因となる場合があることが示唆され、遺伝子導入、およびノックダウン実験で検証した。加えて、miR-34a の発現

が CDDP 治療の効果予測に有用であることを明らかにした。膵癌でも発現アレイ、マイクロ RNA アレイ、質量分析解析を行い、細胞内外の GEM とその代謝産物の濃度を調べたところ、耐性機構が複数あることが判明した。機序の重要な一つはトランスポーターの発現であるが、代謝にかかわる分子である DCK の発現抑制が高頻度に見られることが判明した。そこで、DCK の遺伝子解析を行ったところ、不活性化変異がすべての耐性株で見られた。さらに大腸癌、胆管癌、胃癌でもそれぞれ GEM 耐性株を樹立できたため、これらも調べたところ、DCK の不活性化変異が 2 株で見られ、最終的に 5/6 (83%) の耐性株において DCK の不活性化が関わっていることが判明した。

DCK の変異により耐性を獲得した細胞株に DCK を導入すると GEM への感受性が回復し、親株で DCK をノックダウンすると耐性がみられることも明らかにし、DCK の異常がこれらの癌細胞における耐性獲得の鍵となっていることを明らかにした。

次に、DCK による活性化を必要としない 5-FU を用いたところ、耐性株でも親株同様の感受性を示した。これらの結果は、GEM に対する耐性を獲得した場合のセカンドラインとして TS-1 や 5-FU などを用いることが妥当であることを示唆する。

S100A4 の発現と GEM 投与による予後との相関が報告されているため、S100A4 について解析したところ、強制発現させると運動能の亢進が見られた。臨床検体で調べると、特に神経浸潤と高発現が相関を示した。しかし、薬



剤感受性との関連は見られなかった。

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 14 件)

- ① Tsukamoto N, Egawa S, Akada M, Abe K, Saiki Y, Kaneko N, Yokoyama S, Shima K, Yamamura A, Motoi F, Abe H, Hayashi H, Ishida K, Moriya T, Tabata T, Kondo E, Kanai N, Gu Z, Sunamura M, Unno M, Horii A. The expression of S100A4 in human pancreatic cancer is associated with invasion. *Pancreas*, 査読有、2013、印刷中
- ② Barry S, Chelala C, Lines K, Sunamura M, Wang A, Marelli-Berg FM, Brennan C, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T. S100P is a metastasis-associated gene that facilitates transendothelial migration of pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 査読有、30、2013、251 – 264、DOI: 10.1007/s10585-012-9532-y
- ③ Sunamura M, Ishibashi H, Karino T. Flow patterns and preferred sites of intimal thickening in bypass-grafted arteries. *Int Angiol*, 査読有、31、2012、187–197
- ④ Sekine H, Chen N, Sato K, Saiki Y, Yoshino Y, Umetsu Y, Jin G, Nagase H, Gu Z, Fukushima S, Sunamura M, Horii A. *S100A4*, frequently overexpressed in various human cancers, accelerates cell motility in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、429、2012、214–219、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.048
- ⑤ Ogawa T, Saiki Y, Shiga K, Chen N, Fukushima S, Sunamura M, Nagase H, Hashimoto S, Matsuura K, Saijo S, Kobayashi T, Horii A. miR-34a is downregulated in cis-diamminedichloroplatinum treated sinonasal squamous cell carcinoma patients with poor prognosis. *Cancer Sci*, 査読有、103、2012、1737–1743、DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02338.x
- ⑥ Kimura Y, Tsukada J, Tomoda T, Takahashi H, Imai K, Shimamura K, Sunamura M, Yonemitsu Y, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Okamoto M. Clinical and immunologic evaluation of dendritic cell-based immunotherapy in combination with gemcitabine and/or S-1 in patients with advanced pancreatic carcinoma. *Pancreas*, 査読有、41、2012、195–205、DOI: 10.1097/MPA.0b013e31822398c6
- 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* 査読有、421、98–104、2012、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.122
- ⑧ 砂村真琴、河地茂行、島津元秀、膵癌の疫学、査読無、臨床外科、67、2012、214–221
- ⑨ Saiki Y, Ogawa T, Shiga K, Sunamura M, Kobayashi T, Horii A. A human head and neck squamous cell carcinoma cell line with acquired cis-diamminedichloroplatinum-resistance shows remarkable upregulation of BRCA1 and hypersensitivity to taxane. *Int J Otolaryngol*, 査読有、2011、2011、521852、DOI: 10.1155/2011/521852
- ⑩ Shimizu H, Horii A, Sunamura M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Fukushima S. Identification of epigenetically silenced genes in human pancreatic cancer by a novel method “microarray coupled with methyl-CpG targeted transcriptional activation” (MeTA-array). *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有、411、2011、162–167、DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.121
- ⑪ Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, Ghaneh P, Cunningham D, Goldstein D, Padbury R, Moore MJ, Gallinger S, Mariette C, Wente MN, Izbicki JR, Friess H, Lerch MM, Dervenis C, Olah A, Butturini G, Doi R, Lind PA, Smith D, Valle JW, Palmer DH, Buckels JA, Thompson J, McKay CJ, Rawcliffe CL, Büchler MW, European Study Group for Pancreatic Cancer (Sunamura M 他 259 名), Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA*, 査読有、304、2010、1073 – 1081、DOI: 10.1001/jama.2010.1275
- ⑫ Oishi H, Sunamura M, Egawa S, Motoi F, Unno M, Furukawa T, Habib NA, Yagita H. Blockade of delta-like ligand 4

- signaling inhibits both growth and angiogenesis of pancreatic cancer. *Pancreas*, 査読有、39、2010、897-903、DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181ce7185
- ⑬ Ogawa T, Ogawa K, Shiga K, Furukawa T, Nagase H, Hashimoto S, Kobayashi T, Horii A., Upregulation of *IGF2* (insulin-like growth factor 2) is associated with an acquired resistance for *cis*-diamminedichloroplatinum in human head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 査読有、267、2010、1599-1606、DOI: 10.1007/s00405-010-1257-4
- ⑭ 堀井明、膵臓癌の診療 —基礎から臨床へ—、*日本医事新報*、査読無、4491、2010、38-42
[学会発表] (計14件)
- ① 高野公德、砂村眞琴、阿部雄太、梅田純子、糸井隆夫、土岐真朗、粕谷和彦、佐藤公、板倉淳、曾我朋義、杉本昌弘、千葉斉一、河地茂行、島津元秀、唾液バイオマーカーによる膵臓癌診断と切除症例における動態、第113回日本外科学会定期学術集会、2013年4月11日-13日、福岡
- ② 梅田純子、糸井隆夫、砂村眞琴、唾液による膵臓癌診断法の開発、第54回日本消化器病学会大会、2012年10月10日-13日、神戸
- ③ 砂村眞琴、糸井隆夫、梅田純子、土岐真朗、板倉淳、佐藤公、粕谷和彦、阿部雄太、高野公德、杉本昌弘、曾我朋義、島津元秀、唾液を用いたメタボローム解析による膵臓癌診断法の開発、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、札幌
- ④ 齋木由利子、吉野優樹、福重真一、砂村眞琴、石田晶玄、元井冬彦、江川新一、海野倫明、堀井明、ゲムシタピン耐性ヒト癌細胞株における deosycytidine kinase の不活化、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日-21日、札幌
- ⑤ 砂村眞琴、阿部雄太、高野公德、糸井隆夫、梅田純子、杉本昌弘、島津元秀、メタボロミクス解析を応用した膵臓癌診断法の開発、第67回日本消化器外科学会総会 2012年7月18日-20日、富山
- ⑥ 糸井隆夫、砂村眞琴、土岐真朗、梅田純子、祖父尼淳、糸川文英、土屋貴愛、森安史典、阿部雄太、高野公德、中村健二、板倉淳、佐藤公、杉本昌弘、曾我朋義、粕谷和彦、島津元秀、唾液メタボローム解析を用いた膵臓癌診断法の開発、第43回日本膵臓学会大会、2012年6月28日-29日、山形
- ⑦ 梅田純子、糸井隆夫、祖父尼淳、糸川文英、土屋貴愛、栗原俊夫、石井健太郎、辻修二郎、池内信人、田中麗奈、殿塚亮祐、森安史典、曾我朋義、杉本昌弘、砂村眞琴、新しい膵臓バイオマーカーの探索 —メタボローム解析の検討から—、第43回日本膵臓学会大会、2012年6月28日-29日、山形
- ⑧ 齋木由利子、江川新一、砂村眞琴、海野倫明、堀井明、ゲムシタピン耐性膵臓癌細胞株におけるゲムシタピン代謝の解析、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、名古屋
- ⑨ 嶋健太郎、水間正道、大村範幸、林洋毅、中川圭、岡田恭徳、北村洋、元井冬彦、力山敏樹、片寄友、江川新一、石井直人、堀井明、海野倫明、NOG-EGFP マウス異種移植モデルを用いた高精度な癌細胞 sampling system の構築を目指して、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日-5日、名古屋
- ⑩ 齋木由利子、江川新一、海野倫明、砂村眞琴、堀井明、膵臓の Gemcitabine 耐性機構の解明、第42回日本膵臓学会大会、2011年7月29日-30日、弘前
- ⑪ 齋木由利子、江川新一、砂村眞琴、海野倫明、堀井明、ゲムシタピン耐性膵臓癌細胞株におけるゲムシタピン代謝の解析、第70回日本癌学会総会、2011年10月3日-5日、名古屋
- ⑫ 齋木由利子、江川新一、砂村眞琴、海野倫明、堀井明、膵臓の Gemcitabine 耐性機構の解明、第42回日本膵臓学会大会、2011年7月29日-30日、弘前
- ⑬ Sekine H, Tabata T, Tsukamoto N, Chen N, Sato K, Umetsu Y, Nakamura K, Kim G, Yamamura A, Yoshino Y, Fukushige S, Sunamura M, Horii A., S100A4 regulates tumor growth, motility, and invasion in pancreatic cancer.、アメリカ人類遺伝学会、2010年11月2-6日、アメリカ合衆国ワシントン市
- ⑭ Ogawa T, Ogawa K, Shiga K, Furukawa T, Hashimoto S, Kobayashi T, Horii A., Microarray analyses of mRNA and miRNA associated with an acquired resistance for *cis*-diamminedichloroplatinum in human head and neck squamous cell carcinoma.、International Federation of Head and Neck Oncologic Societies 総会、2010年6月15-20日、韓国ソウル市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂村 眞琴 (SUNAMURA MAKOTO)
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講
師
研究者番号：10201584

(2) 研究分担者

堀井 明 (HORII AKIRA)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40219983

(3) 連携研究者

()

研究者番号：