

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591146

研究課題名(和文)ガンマセクレターゼインヒビターとABT-737併用治療に関する検討

研究課題名(英文)Combined antitumor effect of gamma-secretase inhibitor and ABT-737

研究代表者

榊原 純(小西純)(Sakakibara, Jun)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50374278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Notch発現非小細胞肺癌細胞株におけるNotch inhibitorである secretase inhibitor (GSI)とBcl-2 inhibitor (ABT-737)の併用治療効果について検討した。GSI、ABT-737の併用治療は、in vitroで相乗的に抗腫瘍効果を認め、in vivoにおいても単独治療と比較して有意に肺癌細胞の増殖を抑制した。併用治療はアポトーシスを強く誘導し、PARPの発現上昇とBimとBakの発現が増強した。Bim siRNAにより併用治療におけるアポトーシスの抑制とPARPの発現低下を認めたことからBim依存性であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of Notch by gamma-secretase inhibitor (GSI) has been shown to have an antitumor effect in Notch expressing non-small cell lung cancer (NSCLC) and induce apoptosis through modulation of Bcl-2 family proteins. ABT-737, a BH3-only mimetic, targets the prosurvival Bcl-2 family and also induces apoptosis. GSI or ABT-737 alone inhibited cell proliferation in a dose dependent manner and combination drug treatment showed a synergistic antitumor effect in Notch expressing NSCLC in vitro. In vivo, this drug combination significantly suppressed tumor proliferation compared to single drug treatment. Phospho-Bcl-2 was down-regulated and Bax was up-regulated by both the single and combination drug treatments. Bim was induced by single drug treatment and was enhanced by combination treatment. Combination treatment-induced apoptosis was decreased by Bim inhibition, suggesting that the antitumor effect of the drug combination was dependent on Bim.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：併用治療効果 肺癌 Notch

1. 研究開始当初の背景

Notch pathway は造血、血管といった様々な組織の分化にとって重要な役割を果たしており、また Notch の異常活性化が癌の増殖に関与していることが報告されている。非小細胞肺癌 (NSCLC) の外科切除検体において Notch3 は 40%程度高発現しており、Notch の inhibitor である γ secretase inhibitor(GSI)(図 1)は NSCLC を Bcl-2 family を介してアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制することを以前に報告した。

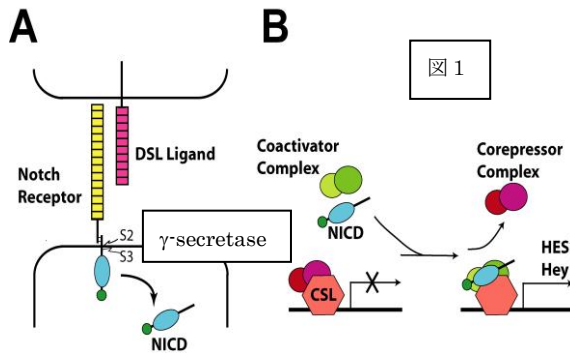


図 1. Notch pathway の機序

A) Notch は Notch 受容体の細胞外ドメインが Ligand と結合することでプロテアーゼである γ -secretase により細胞内ドメイン (NICD) が細胞膜から細胞質に遊離する。

B) NICD は核内へ移行し coactivator とともに転写因子である CSL と結合する。それにより Notch の標的遺伝子 (Hes, Hey など) の転写が開始されることで Notch pathway が活性化する。

γ -secretase inhibitor は A)の γ -secretase を抑制することで NICD の発現を低下し Notch pathway を抑制する。

さらに Bcl-2 inhibitor である ABT-737 は悪性リンパ腫、小細胞肺癌において単独で有効な抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、NSCLC に対しては単独治療は十分な効果を示していず、併用治療における報告はほとんどない。

2. 研究の目的

上記の背景から GSI XX、ABT-737 併用治療効果を検討することとした。

(1) Bcl-2 family である BH-3 蛋白 (Bim,

Noxa, Puma) の NSCLC における発現を外科切除組織を使用し免疫組織学的に検討する。

(2) GSI XX、ABT-737 単独、併用治療の抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で検討する。

(3) 併用効果認められた場合の Bcl-2 family の発現、apoptosis の誘導等検討する。

3. 研究の方法

NSCLC 細胞株は、今までの我々の検討ですでに Notch の発現が確認されている 4 種 (H460, A549, HCC2429, N1793) を使用し Notch 非発現 NSCLC には H1395 を使用した。

(1) 当院での 125 例の NSCLC 外科切除組織における BH3-only proteins (Bim, Noxa, Puma) の発現と臨床学的因子、予後との免疫組織学的検討を行う。

(2) Notch 発現 NSCLC 細胞株において MTT assay や apoptosis assay を用いて GSI、ABT-737 単独または併用治療における抗腫瘍効果を調べる。また Notch 発現の必要について Notch 非発現 H1395 を使用して同様の実験を行う。

(3) Bcl-2 関連蛋白、Notch シグナル蛋白発現を western blot 法を用いて検討し、併用効果の機序についてより詳細に調べる。

(4) ノードマウスを用いて NSCLC 細胞株を皮下注射しゼノグラフトマウスモデルを作成し、*in vivo* における GSI XX、ABT-737 単独、併用治療における抗腫瘍効果と副作用について検討を行う。

4. 研究成果

(1) NSCLC 組織において免疫染色用の抗体の特異度を検討するために Bim, Noxa, Puma の発現を同一組織を用いて免疫染色と western blot を行った。その結果、免疫染色発現と western による蛋白発現は Bim、Noxa、Puma とともに一致し抗体の特異性を確認することができた。125 外科切除組織において Bim、Noxa、Puma とともに腫瘍細胞に発現を認めたが予後との関連を認めなかった。Bim 発現に関しては増殖能のマーカーである Ki67 と逆相関しており Bim がアポトーシス誘導蛋白であることを考えると矛盾しない結果であった。さらに分化度において高分化肺癌は Bim の発現が保持されており、組織系において扁平上皮癌において Bim の発現が低下していた (表 1、表 2)。

表 1 Bim 発現と臨床因子学的背景との関連について

臨床因子	人数(人)		p
	低発現	高発現	
年齢			
<65 歳	38	27	0.74
≥65 歳	39	31	
性別			
男	61	30	<0.001
女	16	28	
喫煙			
無	16	22	0.03
有	61	36	
組織系			
腺癌	32	42	0.001
扁平上皮癌	39	15	
他 ¹	6	1	
pT ²			
T1	16	22	0.03
T2-4	61	36	
pN ³			
N0	47	44	0.09
N1-3	30	14	
pStage ⁴			
I	41	42	0.02
II-IV	36	16	
分化度			
中・低	64	29	<0.001
高	13	29	

- 1: 腺扁平上皮癌、大細胞癌
 2: 術後 T 因子
 3: 術後 N 因子
 4: 術後ステージ

表 2 Bim 発現と臨床因子との多変量解析

臨床因子	Adjusted OR* (95%CI**)	P
性別 (男 vs 女)	0.32 (0.09-1.17)	0.08
喫煙 (有 vs 無)	0.46 (0.30-1.80)	0.50
組織系 (Sq vs non-Sq)	0.37 (0.17-0.84)	0.04
pT (pT2-4 vs pT1)	0.77 (0.34-1.97)	0.65
pStage (II-IV vs I)	0.47 (0.33-1.83)	0.12
分化度 (高 vs 中/低)	5.12 (1.16-6.92)	0.02

(2) GSI XX、ABT-737 の単独治療、併用治療における抗腫瘍効果を MTT assay を用いて検討した。GSI、ABT-737 は Notch 発現 NSCLC の増殖を濃度依存性に抑制した。さらに Notch 発現 NSCLC において GSI XX、ABT-737 併用治療は相乗効果を示したが、Notch 陰性細胞においては相乗効果を認めなかった。ヌードマウスに H460、H1793 (1×10⁶ 個) NSCLC 細胞株を皮下注射しゼノグラフトマウスモデルを作成後に GSI (200μg/kg、週 3 回、2 週間)、ABT-737 単独 (20mg/kg、14 日間)、併用治療を行ったところ併用治療において優位に腫瘍増殖抑制された (図 2)。

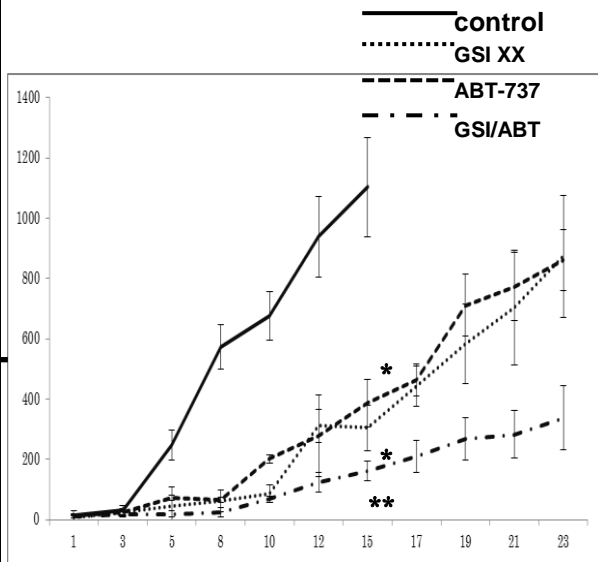


図 2: H460 ゼノグラフトマウスモデルにおいて併用治療 (GSI/ABT) は単独治療、コントロールと比較して有意に腫瘍増殖を抑制した。
 * vs control, ** vs GSI xx または ABT-737
 p<0.05

(3) H460、H1793 を用いて GSI、ABT-737、併用治療後の Bcl-2 family、PARP の発現を western blot にて検討した。さらに単独治療、併用治療後のアポトーシス細胞の割合を Annexin V 陽性 PI 陰性細胞としてフローサイトメトリーを用いて検討した。

併用治療により Bcl-2 蛋白の発現低下、Bim の発現が上昇した (図 3)。さらに PARP の発現の上昇(図 4)とアポトーシス細胞数が増加した(図 5)。Bim を siRNA にて抑制すると併用治療によって増強した PARP 発現は低下(図 6)、アポトーシス細胞数も減少した (図 7)。このことから GSI XX と ABT-737 による併用治療効果は Bim に依存していることが示された。

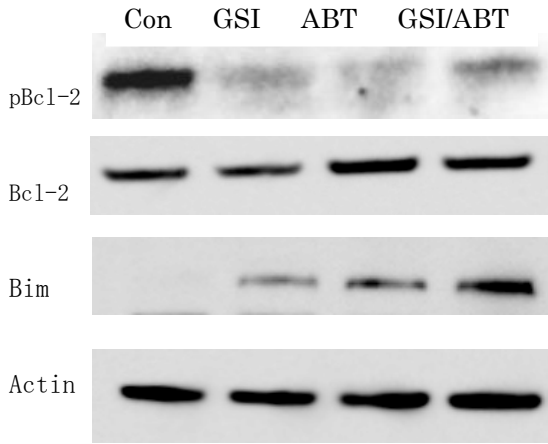


図 3: 併用治療により Bcl-2 の低下と Bim の発現上昇を認めた。

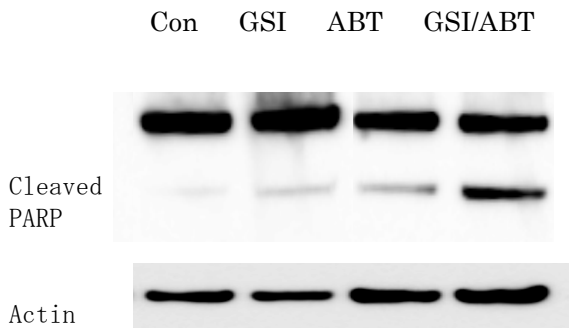


図 4: 併用治療により PARP の発現の誘導を認めた。

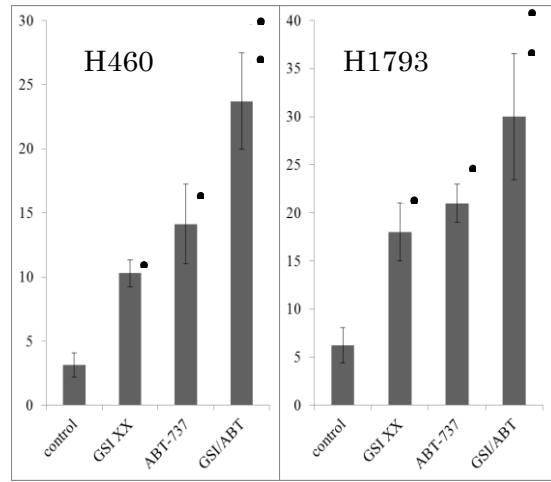


図 5; 併用治療によりアポトーシスが優位に増強した。
* vs control $p < 0.05$, ** vs GSI XX または ABT-7373 $p < 0.05$

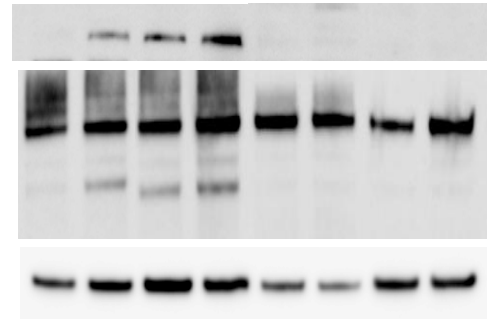


図 6; Bim siRNA により Bim の発現が抑制されたことで併用治療後 PARP の発現低下が認められた。
Con;control, G;GSI XX, A; ABT-737, G/A; 併用治療

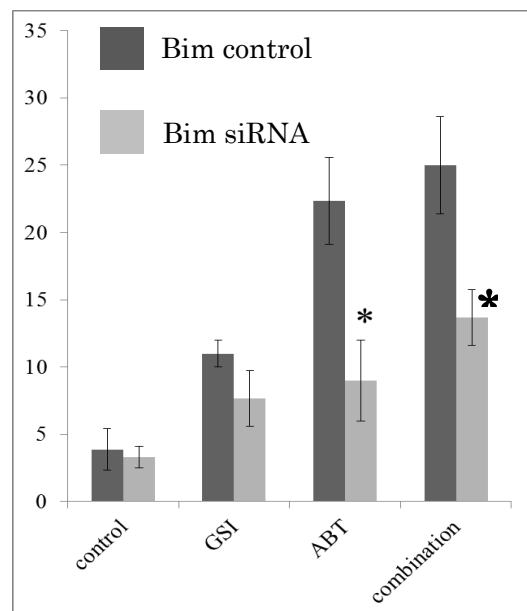


図 7; Bim siRNA により併用治療において増加したアポトーシス細胞の低下を認めた。* vs Bim control $p < 0.05$

これらの結果から GSI、ABT-737 併用治療は肺癌治療における一つの新しい選択肢となりうることが示唆された。

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 Jun Sakakibara-Konishi 他 7 名 (1 番目)
Expression of Bim, Noxa and Puma in non-small cell lung cancer. BMC cancer, vol12, 286. 2012 (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 榑原 純、池澤靖元、水柿秀紀、菊地順子、菊地英毅、品川尚文、大泉聡史、西村正治、肺癌における γ セクレターゼインヒビターと Bcl-2 inhibitor との併用治療効果の検討、日本肺癌学会、2014 年 11 月 16 日、国立京都国際会館 (京都市)
- ② 榑原 純、池澤靖元、水柿秀紀、菊地順子、菊地英毅、大泉聡史、西村正治、Combination of g-secretase inhibitor and ABT-737 shows synergistic antitumor effect in Notch expressing lung cancer、日本癌学会、2014 年 9 月 25 日、パシフィコ横浜 (横浜市)
- ③ Jun Sakakibara-Konishi 他 7 名、Expression of Bim, Noxa and Puma in non-small cell lung cancer. AACR 2012, 2012 年 3 月 31 日~4 月 4 日, McCormick Place West Chicago (Chicago, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑原 純 (Sakakibara Jun)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：50374278

(2) 研究分担者

木下 一郎 (Kinoshita Ichiro)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40343008