

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461158

研究課題名(和文) アムルピシンによる薬剤耐性化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of resistance mechanism to amrubicin

研究代表者

立原 素子 (Tachihara, Motoko)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40448626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アムルピシンにより耐性を誘導した肺がん細胞株では、EGFRのリガンドであるアンフィレグリンの遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。アンフィレグリンはアムルピシンに対する感受性を低下させる一方で、アムルピシン耐性株のアンフィレグリンの発現をsiRNAによりノックダウンすると、アムルピシンに対する感受性が回復した。セツキシマブにもsiRNAと同様の効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Amrubicin (AMR) has shown promising activity for lung cancer. However, little is known about the mechanism of resistance for this agent.

Transcriptome analysis of amrubicinol (AMR-OH)-resistant lung cancer cell lines (H520/R, and DMS53/R) showed that amphiregulin (AREG) was most highly up-regulated gene in both of the AMR-OH-resistant cells compared to H520 and DMS53. AREG concentration in cultured medium of DMS53/R was higher compared to DMS53 after 72h culture with AMR-OH. A conditioned medium from DMS53/R decreased sensitivity to AMR-OH in DMS53. On the other hand, DMS53/R transfected with siRNA directed against AREG recovered sensitivity to AMR-OH. Additional administration of cetuximab (CET) on AMR-OH also recovered sensitivity to AMR-OH in DMS53/R. AMR/CET treatment showed higher antitumor activity in DMS53/R-bearing mice than AMR treatment.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：アムルピシン 薬剤耐性 アンフィレグリン

1. 研究開始当初の背景

アムルピシン塩酸塩および生体内でカルボニルレダクターゼにより変換され生成される活性代謝物アムルピシノールは、がん細胞の DNA らせん構造の間に入り込み、トポイソメラーゼ II に結合してその活性を阻害する。トポイソメラーゼ は生体内において DNA の切断作用を有し、DNA 二重らせんのよじれやたわみを解消する働きを有しているため、この活性が阻害されることによりがん細胞の増殖は抑制される。本剤の活性代謝物であるアムルピシノールは親化合物より 5 ~ 200 倍強い作用を示すことと、この活性代謝物が腫瘍に多く分布することは本剤が高い抗腫瘍活性を示す要因と考えられている。アムルピシンは非小細胞肺癌および小細胞肺癌に対する治療薬として認可されており、抗がん剤治療歴のない症例に対してアムルピシンの単剤投与を行った第 II 相臨床試験の結果、奏効率は非小細胞肺癌で 27.9%、生存期間中央値が 11.3 か月、進展型小細胞肺癌で奏効率が 75.8%、生存期間中央値が 11.7 か月と、今までの殺細胞性抗癌剤の奏効率と遜色のない結果が得られた。特に、小細胞肺癌のセカンドライン以降の治療において、sensitive relapse (初回治療が奏効し、治療終了から 90 日以上経過しての再発)における奏効率が 52%と従来の抗がん剤の奏効率 17-28%に比較して高いのみならず、従来の抗がん剤では奏効率が 0-29%にとどまる refractory relapse (初回治療に不応または治療終了から 90 日以内の再発)においても奏効率が 50%と極めて高く、小細胞肺癌患者のセカンドライン以降の Key Drug として用いられている。

進展型小細胞肺癌のファーストライン治療として第一選択薬として用いられるシスプラチンとイリノテカン (IP 群) の併用療法と、シスプラチンとアムルピシン (AP 群) の併用療法の全生存期間 (OS) を比較する第 III 相臨床試験の結果によると、OS において AP 群が勝っているという当初の期待に反して、AP 群は奏効率では 77.9%と IP 群の 72.3%より高いものの、生存期間中央値は 15.3 か月で IP 群の 18.0 か月より有意に低下していた。この原因として初回アムルピシン投与により薬剤抵抗性、すなわち肺癌細胞における薬剤耐性遺伝子の誘導が生じたと推測し、本研究の着想に至った。

アムルピシンによる薬剤耐性遺伝子の誘導を示唆する知見として、多剤耐性遺伝子である MDR-1 (multidrug-resistance) 遺伝子の肺癌細胞株における発現と、アムルピシンを含めた薬剤に対する感受性を調べ、同遺伝子がアムルピシノールの投与により誘導されて薬剤耐性と関係することが報告されている (Takakuwa et al. Cancer Chemother Pharmacol. 68:669-676, 2011)。しかしながら、アムルピシン投与により発現が促進される遺伝子を網羅的に解析した報告はない。

2. 研究の目的

本研究ではアムルピシンにより発現が促進される遺伝子の中に薬剤耐性に関する遺伝子が含まれ、その遺伝子の機能により薬剤耐性が獲得されるという仮説を立て、原因遺伝子の網羅的解析を行い、候補遺伝子の発現と薬剤耐性との相関関係を調べることを目的としている。

3. 研究の方法

実験 1) アムルピシノール耐性肺癌細胞株の樹立

アムルピシノールに 3 か月曝露することで、H520/P と DMS53/P の 2 つの細胞株においてアムルピシノール耐性株 (H520/R、DMS53/R) を樹立する。

実験 2) アムルピシノール耐性遺伝子の網羅的解析

まず、H520/P と H520/R、DMS53/P と DMS53/R の耐性株から tRNA を回収して、cDNA 合成を行い、whole human genome の microarray 解析で網羅的に mRNA の発現が上昇するものを調べる (microarray 解析は CELI 社に外注検査を依頼)。

実験 3) アンフィレグリンの外分泌能の評価

DMS53/P と DMS53/R の細胞培地中のアンフィレグリンの量を ELISA により定量する。また、DMS53/R の細胞培地を DMS53/P に投与することでアムルピシノールに対する感受性が変化するかを MTT assay で調べる。

実験 4) アンフィレグリン遺伝子の発現と薬剤耐性との関係

DMS53/R にアンフィレグリンに対する siRNA を投与することで、アムルピシノールに対する感受性が改善するかを MTT assay で検討する。

実験 5) アムルピシン耐性細胞株に対する in vitro のセツキシマブの治療効果

DMS53/R にセツキシマブ (1 μ M) を併用することで、アムルピシノールに対する感受性が改善するかを MTT assay で検討する。

実験 6) アムルピシン耐性細胞株の担がんマウスモデルの作成と in vivo のセツキシマブの治療効果

BALB/c のヌードマウスの皮下に DMS53/R を 1.0×10^6 cells/50 μ L の細胞懸濁液を注射して皮下移植マウスモデルを作成し、セツキシマブ (100 μ L、週 2 回腹注)、アムルピシン (25mg/m²、1 日目に尾静注) + の併用療法、PBS (コントロール) を投与して、経時的な腫瘍増殖抑制効果を調べた。

4. 研究成果

1) アムルピシノール耐性肺癌細胞株の樹立

H520/P と DMS53/P の 2 つの細胞株にアムルピシノールを 3 か月曝露し、アムルピシノール耐性株 (H520/R、DMS53/R) を樹立した (図 1)。

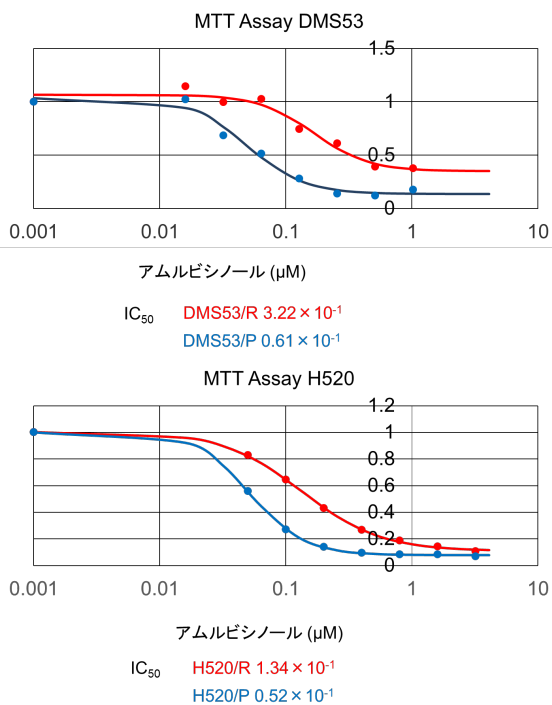


図 1. MTT assay による肺がん細胞株の耐性化の確認

2) DNA マイクロアレイによるアムルピシノール耐性遺伝子の検索

2 組の細胞株(DMS53 と H520 のそれぞれの感受性株と耐性株)についてマイクロアレイ解析を行った。その結果、アムルピシノールに対して耐性を獲得することで、アンフィレグリンの発現の増大が見られた(図 2)。

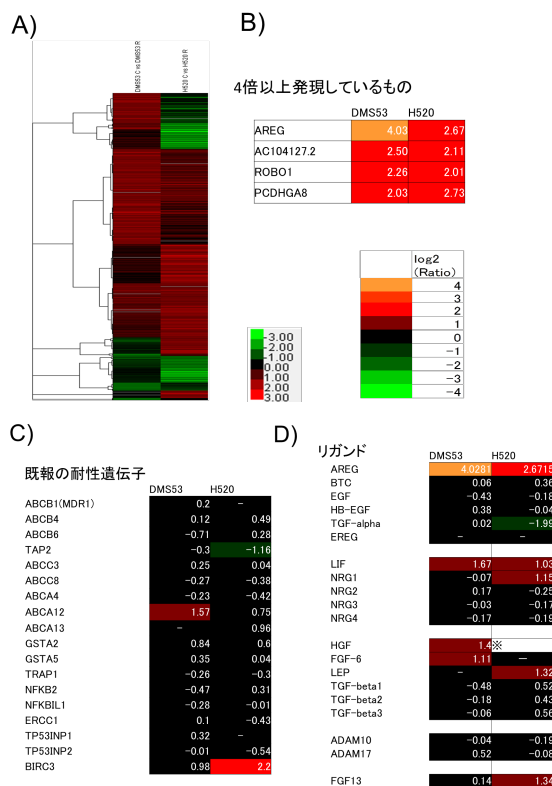


図 2. アムルピシノール耐性遺伝子の網羅的解析結果

log2 比についてピアソン相関係数を用いて階層的クラスタ分析を行い、少なくともどちらか一方で2倍以上の上昇もしくは下降した 2442 の遺伝子について解析を行った(図 2A)。その結果、4 つの遺伝子だけが2 つの細胞株において4 倍以上の上昇を示し、アンフィレグリン(AREG)はDMS53において最も発現が上昇していた(図 2B)。既報の耐性遺伝子で2 つの細胞株で共通して発現が2 倍以上の上昇もしくは下降するものはなかった(図 2C)。上皮成長因子受容体(EGFR)のリガンドのうち AREG が唯一、2 倍以上の上昇を示した(図 2D)。

3) アンフィレグリンの外分泌作用の評価

DMS53/Rを72時間培養した培地のアンフィレグリンの濃度は、DMS53/Pを培養したものに比べて3.8倍の上昇が見られた(図 3A)。また、DMS53/Rを培養した培地を用いてDMS53/Pを培養したものと、DMS53/Pを培養した培地で培養したものとで、アムルピシノールの抗腫瘍効果をMTT assayを評価するとDMS53/Rを培養した培地を用いたもので感受性が低下していた(図 3B)。

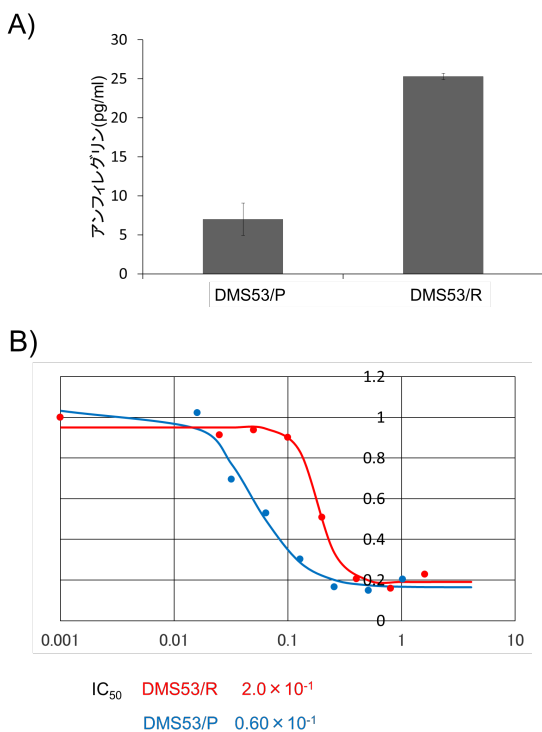


図 3. アンフィレグリンの外分泌機能の評価

4) アンフィレグリンの遺伝子発現のアムルピシノール感受性へ与える影響の評価

次に、DMS53/Rをアンフィレグリンに対するsiRNAでノックダウン(KD)したところ(図 4A)、アムルピシノールに対する感受性が回復した(図 4B)。

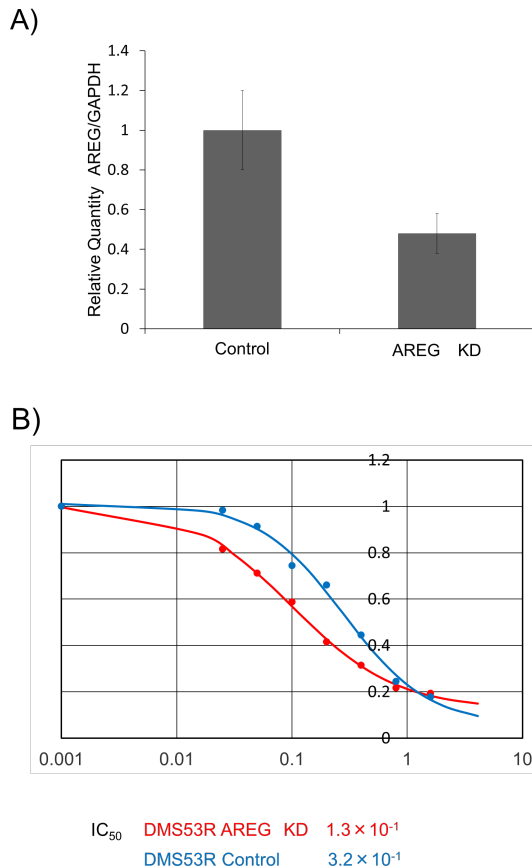


図 4. アンフィレグリンのノックダウンによる感受性の改善

5) セツキシマブによる感受性の改善効果の評価

DMS53/R にセツキシマブ (1 μ M) を併用することで、アムルピシノールに対する感受性が改善した (図 5)

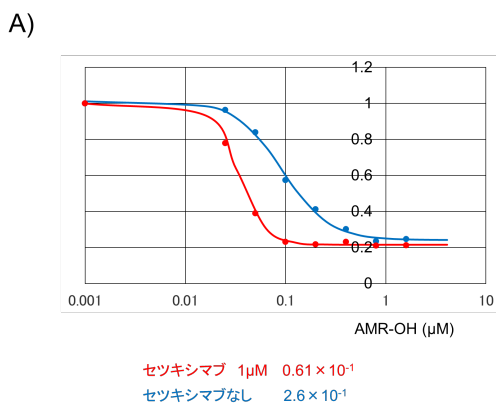


図 5. セツキシマブの併用によるアムルピシノールに対する感受性の改善

6) アムルピシノール耐性細胞株のマウス皮下移植モデルの作成とセツキシマブの治療効果の評価

DMS53/R を使用してマウス皮下移植モデルを作成し、セツキシマブ (Cetu)、アムルピシノール (AMR)、Cetu+AMR の併用療法、PBS (Control) を投与したところ、アムルピシノール単独投与群に比べて、アムルピシノールにセツキシマブを併用した群で有意に腫瘍増殖の抑制が見られた (図 6)。

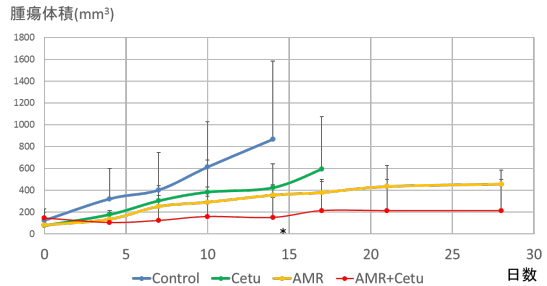


図 6. 皮下移植モデルでのセツキシマブの併用による感受性の改善効果

以上の結果をまとめると、今回、我々は小細胞肺癌アムルピシノール耐性株について、マイクロアレイ解析を行うことにより、EGFR のリガンドであるアンフィレグリンが高発現していることを見いだした。アンフィレグリンをノックダウンすることで、アムルピシノールの感受性が改善し、同様に EGFR の抗体であるセツキシマブを併用することでアムルピシノールの感受性が改善した。アムルピシノール耐性後の治療に、アムルピシノールとセツキシマブの併用療法は有用かもしれないと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 徳永俊太郎、永野達也、國政啓、田村大介、立原素子、小林和幸、西村善博、Amrubicinol 耐性肺癌細胞株での amphiregulin の発現の上昇、第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋、名古屋国際会議場

2. 徳永俊太郎、永野達也、國政啓、田村大介、山本正嗣、立原素子、小林和幸、西村善博、肺癌細胞株におけるアムルピシノール耐性化機序の検討、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 9 日、京都、国立京都国際会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立原 素子 (TACHIHARA MOTOKO)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40448626

(2) 研究分担者

西村 善博 (NISHIMURA YOSHIHIRO)
神戸大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：20291453

小林 和幸 (KOBAYASHI KAZUYUKI)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50403275

田村 大介 (TAMURA DAISUKE)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号：80646597

永野 達也 (NAGANO TATSUYA)
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教
研究者番号：80624684

(3) 連携研究者

()

研究者番号：