

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460943

研究課題名(和文) 胃癌のBH3 プロファイリングに基づく新規抗がん剤感受性試験の開発および予後予測

研究課題名(英文) Prediction of drug sensitivity to gastric cancer using BH3 profiling

研究代表者

河野 豊 (KAWANO, YUTAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80398320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：7種類の胃癌培養細胞株における抗癌剤感受性試験とアポトーシスを評価するBH3プロファイリングを検討し、Docetaxelの薬剤感受性にBIM BH3プロファイリングが関連していることを見出した。さらにこのBIM BH3プロファイリングはBAK蛋白発現とも相関を認めていたことから、胃癌患者におけるBAK蛋白発現と予後解析を検討した。その結果、BAK蛋白発現の多寡が、Docetaxelを用いた化学療法における予後を規定していることが分かった。

胃癌におけるBAK蛋白発現はDocetaxelを用いた化学療法の治療を予測するバイオマーカーとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Drug sensitivity and BH3 profiling for seven gastric cancer cell lines were examined. BIM BH3 profiling results correlated with docetaxel sensitivity and also BAK protein expression. Patients with higher BAK protein expression in gastric cancer showed improved progression-free survival and overall survival.

BAK expression in gastric cancer is thus predictive of chemotherapeutic response to docetaxel and clinical prognosis in patients with docetaxel including chemotherapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗癌剤感受性 胃癌 BH3プロファイリング

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において胃癌は平成 21 年現在でも約 5 万人が胃癌に罹患して死亡しており、悪性新生物の中では肺癌に次いで多い。とくに**切除不能進行及び再発胃癌においては極めて予後が不良であり、国内外で行われた様々な臨床試験において生存期間の中央値は未だ約 6-13 ヶ月と満足のいく成績ではない。** Docetaxel + CDDP+S-1 (DCS) の 3 剤を併用した化学療法においては、切除不能進行胃癌に対する奏効率は 87.1%と高く、生存中央値は 20 ヶ月と既報に比べて治療成績が良好であった (Sato Y et al, Cancer Chemother Pharmacol, 2010)。しかしその一方で重篤な副作用も出現することから、抗がん剤による治療効果とのバランスが患者の生命予後に重要と考えられる。**もし化学療法開始前に抗がん剤による治療効果が事前に予測できれば、適切な抗がん剤を選択することによって治療効果を上げるだけでなく、治療効果の乏しい抗がん剤を使用しないことによって必要な副作用を防ぐことができる。しかし胃癌に対する抗癌剤の治療予測を可能としたものは未だ定まっていない。**

研究協力者の Dr. Letai Anthony らは**アポトーシスの新しいプロファイリングアッセイ (BH3 プロファイリング)**を確立し、その有効性を学術雑誌に報告した (Science 2011, Cell 2012)。この手法を用いて**白血病や多発性骨髄腫患者の化学療法の治療効果を事前に予測することを可能とした**。一般的に複数のアポトーシス関連蛋白がカスケードになって複雑に関与しているため個々のアポトーシス関連蛋白の発現を測定するのみではアポトーシスの解析は不十分である。一方この BH3 プロファイリング法では、**個々のアポトーシス関連蛋白の発現多寡に関わらず生存している細胞が起こし得るアポトーシスを直接測定することができるため、機能的なアポトーシスを評価するアッセイとして非**

**常に有用**である。さらにこのプロファイリング法は**サンプル量が有限で希少な臨床検体においても十分に応用が可能**である。また**申請者らはオリジナルで使用したものと別の陽イオン性の蛍光試薬 (TMRE) によって、BH3 ペプチドの必要量を約 1/10 程度に減らした BH3 プロファイリング法の樹立に成功した (Kawano Y et al, Hematologica 2014)。**

### 2. 研究の目的

本研究では、まず胃癌細胞株に対して TMRE を用いた BH3 プロファイリングを行い、*in vitro* における機能的なアポトーシスに関する検討を行う。次に胃癌細胞株に対する抗がん剤感受性を検討する。これらの結果から**BH3 プロファイリングと抗がん剤感受性との間の相関を探る。相関を認めた項目に対して、実地臨床での化学療法前の胃癌患者検体を用いて感受性の予想が可能かどうかの更なる解析を行う。**

### 3. 研究の方法

#### (1) 胃癌培養細胞株の抗がん剤による殺細胞効果の検討

7 種類の胃癌培養細胞株 (MKN45, MKN74, JR-St, HSC-39, NCI-N87, NUGC-4, KATO-III) を用いて Docetaxel, CDDP, 5-FU に対する各々の **50% 阻害濃度 (Half maximal inhibitory concentration, IC50)** を算出した。次に同胃癌培養細胞株に Docetaxel, CDDP, 5-FU で 72 時間処理した後のアポトーシス陽性細胞をフローサイトメトリ法で解析した。

#### (2) 胃癌培養細胞株の BH3 プロファイリング

BH3 プロファイリングに用いた 7 つの BH3 ペプチドは既報に従って作成した (PNAS 2010, Science 2011)。胃癌培養細胞株  $2.0 \times 10^5$  個に対して最終濃度が  $10 \mu\text{M}$  になるよう BH3 ペプチドをそれぞれ添加し、30 分間ペプチドと細胞との反応を行った。その後 25 nM TMRE を添加した。その後フローサイトメトリ法を用いて FL-2 (PE) で検出された蛍光シグナル強度を検出した。陰性コントロールにはペブ

チドの溶媒である DMSO を，陽性コントロールにはミトコンドリアの脱共液剤 FCCP を添加したサンプルを用いた．陰性コントロール時の FL-2 の蛍光強度を”ミトコンドリア膜電位の変化を認めない” 0 %，陽性コントロール時を”ミトコンドリア膜電位が最大限変化してアポトーシスを起こす” 100 %と設定して，各 BH3 ペプチド投与時のミトコンドリア膜電位の脱分極の程度，すなわちアポトーシスの程度を測定した(図 1)．

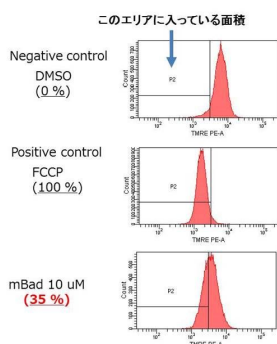


図1 BH3プロファイリング法の原理

### (3) 胃癌培養細胞株のアポトーシス関連蛋白発現の検討．

各胃癌培養細胞株から蛋白を抽出し，ウエスタンブロッティング法にて BCL-2, MCL-1, BCL-W, BCL-XL, BIM, BAX, BAK といったアポトーシス関連蛋白発現を測定した．

### (4) 胃癌培養細胞株における BH3 プロファイリングと各抗がん剤の感受性との比較検討

(1)(2)及び(3)から得られた結果を元に，各 BH3 ペプチドによるアポトーシスの程度と，抗癌剤の IC50 やアポトーシス関連蛋白発現との間の相関について Spearman 順位相関係数を用いて統計学的に解析した．

### (5) ヒト臨床胃癌サンプルを用いた BH3 プロファイリング

インフォームド・コンセントを得た胃癌患者検体を採取し，胃癌細胞を単離，解析する．採取した胃癌粘膜生検は細切した後，蛋白分解酵素等で処理して単細胞化してから BH プロファイリングを検討した．

## 4. 研究成果

### (1) 胃癌培養細胞株における抗癌剤感受性と BH3 プロファイリングとの関連

Docetaxel, CDDP, 5-FU の 7 種類の胃癌培養細胞株に対する殺細胞効果を IC50 とアポトーシス陽性率で評価し，7 つのペプチドによる BH3 プロファイリングとの相関を検討した．その結果，BIM BH3 ペプチドによるプロファイリングと，Docetaxel による殺細胞効果との間に強い相関を認めた(図 2)．

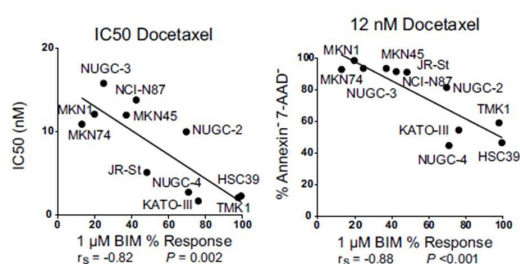


図2 Docetaxelの殺細胞効果とBIM BH3 プロファイリング

### (2) BIM BH3 プロファイリングとアポトーシス関連蛋白発現との関連

次にアポトーシス関連蛋白発現と BH3 プロファイリングとの関連を検討した．その結果 BIM BH3 プロファイリングは BIM 蛋白発現自身とは相関を認めなかったが，BAK 蛋白発現と強い相関を認めた(図 3)．

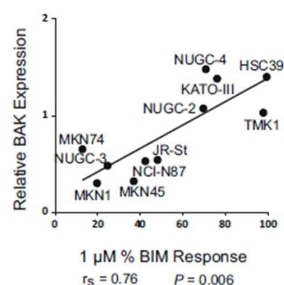


図3 BAK蛋白発現とBIM BH3 プロファイリング

この結果から Docetaxel の感受性が BAK 蛋白発現量と関連している可能性が示唆された．このことは研究当初は想定していなかった結果であったが，以後はこれを検証することとした．

### (3) BAK 蛋白発現抑制による Docetaxel 感受性への影響

BAK siRNA を用いて BAK 蛋白発現を抑制させた胃癌細胞株を用いて Docetaxel による آپトーシス陽性率を検討した。その結果 **BAK 蛋白発現を抑制した胃癌細胞株は有意に Docetaxel による آپトーシス陽性率の低下を認めた(図 4)。**

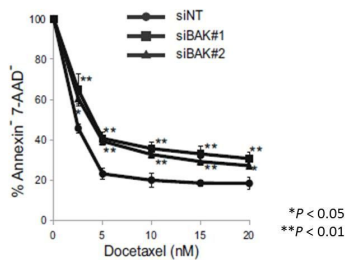


図4 BAK蛋白発現抑制によるDocetaxel感受性の変化

### (4) ヒト臨床胃癌サンプルを用いた BAK 蛋白発現と予後解析

当初の目的は胃癌サンプルを直接 BH3 プロファイリングすることによって感受性を検討することであったが、研究の進捗過程において上述の如く **BAK 蛋白発現が Docetaxel の感受性を予測できる可能性が出てきたことから、すでに化学療法を施行した患者での胃癌組織中の BAK 蛋白発現を免疫染色法を用いて検討した。**胃癌細胞における BAK 蛋白発現の陽性率と強度をそれぞれスコア化 (BAK index) し、Docetaxel を含む化学療法施行後に切除術が施行された胃癌組織中の化学療法による治療効果の程度と比較検討した。その結果 **BAK 蛋白発現の多寡が、化学療法による組織学的な治療効果と強く関連していたことが分かった(図 5)。**さらに生命予後について Kaplan-Meier 法で検討したところ、**BAK 蛋白発現の高い胃癌患者は、低い患者に比べて Docetaxel を含む化学療法施行における生命予後の有意な延長を認めた(図 6)。**

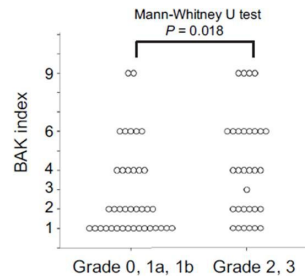


図5 BAK蛋白発現程度と組織学的な化学療法効果判定

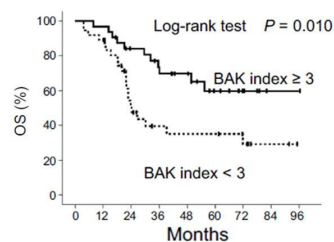


図6 BAK蛋白発現程度と生命予後との関連

### 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 8 件)

1. Kawano Y, Miyanishi K, Takahashi S, Kubo T, Ishikawa K, Sugita S, Takada K, Kobune M, Hasegawa T, Kato J. Hepatitis C virus reactivation due to antiemetic steroid therapy during treatment of hepatocellular carcinoma. J Infect Chemother. 2017 May;23(5):323-325. doi: 10.1016/j.jiac.2016.12.008. Epub 2017 Jan 18. 査読有り
2. Kamihara Y, Takada K, Sato T, Kawano Y, Murase K, Arihara Y, Kikuchi S, Hayasaka N, Usami M, Iyama S, Miyanishi K, Sato Y, Kobune M, Kato J. The iron chelator deferasirox induces apoptosis by targeting oncogenic Pyk2/ -catenin signaling in human multiple myeloma. Oncotarget. 2016 Sep 7;7(39):64330-64341. doi: 10.18632/oncotarget.11830. 査読有り

3. Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Ibata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells. PLoS One. 2016 Mar 31;11(3):e0152823.doi:10.1371/journal.pone.0152823. 査読有り.

4. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, Iyama S, Takada K, Sato T, Ono K, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Kawano Y, Miyanishi K, Sawada N, Kato J. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. Haematologica. 2016 Apr;101(4):437-47. doi: 10.3324/haematol.2015.134932. Epub 2016 Jan 22. 査読有り

5. Kubo T, Kawano Y, Himuro N, Sugita S, Sato Y, Ishikawa K, Takada K, Murase K, Miyanishi K, Sato T, Takimoto R, Kobune M, Nobuoka T, Hirata K, Takayama T, Mori M, Hasegawa T, Kato J. BAK is a predictive and prognostic biomarker for the therapeutic effect of docetaxel treatment in patients with advanced gastric cancer. Gastric Cancer. 2016 Jul;19(3):827-38. doi: 10.1007/s10120-015-0557-1. Epub 2015 Oct 20. 査読有り

6. Tamura F, Sato Y, Hirakawa M, Yoshida M, Ono M, Osuga T, Okagawa Y, Uemura N, Arihara Y, Murase K, Kawano Y, Iyama S, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Kobune M, Takimoto R, Kato J. RNAi-mediated gene silencing of ST6GalNAc

I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. Gastric Cancer. 2016 Jan;19(1):85-97. doi:

10.1007/s10120-014-0454-z. Epub 2014 Dec 23. 査読有り

7. Hoki T, Miyanishi K, Tanaka S, Takada K, Kawano Y, Sakurada A, Sato M, Kubo T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Increased duodenal iron absorption through up-regulation of divalent metal transporter 1 from enhancement of iron regulatory protein 1 activity in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology. 2015 Sep;62(3):751-61. doi: 10.1002/hep.27774. Epub 2015 Apr 8. 査読有り

8. Sato Y, Ohnuma H, Hirakawa M, Takahashi M, Osuga T, Okagawa Y, Murase K, Takada K, Kawano Y, Iyama S, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Okita K, Mizuguchi T, Furuhashi T, Hirata K, Kato J. A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine/irinotecan (XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2015 Mar;75(3):587-94. doi: 10.1007/s00280-014-2672-9. Epub 2015 Jan 11. 査読有り

〔学会発表〕(計 1 件)

河野 豊, 久保智洋, 加藤淳二

進行胃癌における BH3 profiling を用いた Precision Medicine の基礎的検討

第 102 回日本消化器病学会総会

2016 年 4 月 21-23 日 京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

河野 豊 (KAWANO YUTAKA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80398320

### (2)研究分担者

佐藤 康史 (SATO YASUSHI)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学  
係)・特任教授

研究者番号：80343383

加藤 淳二 (KATO JUNJI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

### (3)研究協力者

Anthony Letai (Anthony Letai)

ダナ・ファーマー癌研究所