科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号: 12301

研究種目: 基盤研究(C)(一般)

研究期間: 2014~2016

課題番号: 26461154

研究課題名(和文)進行非小細胞肺癌におけるxCT(シスチントランスポーター)発現の薬剤耐性機構

研究課題名(英文) Chemo-resistance of xCT expression in NSCLC

研究代表者

解良 恭一(Kaira, Kyoichi)

群馬大学・大学院医学系研究科・特任教授

研究者番号:40400783

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):非小細胞肺癌に比べて小細胞肺癌で有意にxCT発現量は低かった。細胞実験で薬剤感受性試験を行い小細胞肺癌で有意に細胞増殖能が低下した。小細胞肺癌ではxCT発現量に関わらず細胞増殖能低下が見られた。しかし、非小細胞肺癌細胞株ではxCT高発現で薬剤感受性は低かった。これらの結果から、小細胞肺癌ではxCT発現は低い傾向があり、薬剤抵抗性にはあまり関与しない可能性がある。非小細胞肺癌はxCT発現は高く、薬剤抵抗性となることがわかった。肺癌切除例に対して腫瘍組織110例のxCT発現量を測定した。xCT高発現症例は、xCT低発現量症例に比べて有意に予後不良であった。

研究成果の概要(英文): Our in vitro study showed that the expression of xCT mRNA was significantly higher in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells than in small-cell lung cancer (SCLC) cells. By drug sensitivity experimental approach, tumor cell proliferation rate was lower in SCLC cells, regardless of the quantitative amount of xCT expression. However, NSCLC cells yielded a high expression of xCT mRNA, suggesting a drug resistance. In SCLC cells, xCT expression may not be associated with chemotherapy resistance, whereas, the expression of xCT seemed to be linked to the resistance of any chemotherapy. The quantitative amount of xCT expression was assessed in 110 patients who underwent surgical resection. The patients with high xCT expression displayed a worse prognosis compared to those with a low xCT expression.

研究分野: 呼吸器内科

キーワード: xCT アミノ酸トランスポーター 薬剤耐性 肺癌

1.研究開始当初の背景

進行非小細胞肺癌は予後不良な疾患であり、有効な治療法の開発が望まれている。現在、プラチナ製剤含む2 剤併用療法が標準治療として施行されているが、ほとんどの症例で薬剤耐性となり再発をするのが現状である。そのため、治療効果や予後を予測するバイオマーカーの開発が望まれている。今まで我々はバイオマーカー開発のため、腫瘍におけるアミノ酸トランスポーター発現に着眼して研究・報告してきた[1-5]。

Amino acid transporter の中で、腫瘍の増殖・進展 に重要な役割を果たし、腫瘍に高発現しているトランス ポーターとして、L-type amino acid transporter 1(LAT1), system ASC amino acid transporter-2 (ASCT2), xCT(cysteine-glutamate exchanger transporter)が知ら れている [2,6,7]。LAT1 高発現は、肺癌、膵臓癌、乳癌、 胃癌、前立腺癌、泌尿器生殖癌、脳腫瘍、胆管癌などの ヒト悪性腫瘍で認められ、細胞増殖、血管新生、予後不 良に強く関連している。In vitro, in vivo の研究では、 LAT1 阻害剤により腫瘍細胞の増殖は有意に抑制される ことが示され、そのメカニズムとして mTOR シグナル伝達 阻害による細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導、細胞 周期 G1 arrest などが考えられている。また、LAT1 高発現は非小細胞肺癌におけるプラチナ製剤抵抗性の可 能性も示唆されている。しかし、アミノ酸トランスポー ター発現と抗癌剤薬剤耐性の関係については明らかでは ない。最近、xCT 発現が抗癌剤薬剤耐性に重要であるこ とが、膵臓癌細胞株を使った研究で報告された[8]。その 機序として、がんで多く発現している CD44 バリアントフ ォーム(CD44v)がトランスポーターである xCT の細胞膜 上での発現を安定化させ、グルタチオン生成を促進し細 胞内の活性酸素種の蓄積を抑制することにより酸化スト レスへの抵抗性が高まり、がん幹細胞が生き残る方向に 向かい治療抵抗性を示すと考えられている [9]。我々は 肺癌における xCT 発現の治療抵抗性の意義について基礎 的・臨床的検討を行うことで、そのメカニズムの解明、 臨床へ応用の意義を研究する着想に至った。

2.研究の目的

進行非小細胞肺癌における標準治療は全身化学療法である。しかし、ほとんどの症例で薬剤耐性となり増悪し予後不良となる。アミノ酸トランスポーターであるxCT【シスチントランスポーター】が薬剤耐性に関与しているとの報告があるが、基礎と臨床のトランスレーショナルな研究はなく、肺癌においてはその役割も不可にてxCTの薬剤耐性のメカニズムを含めて詳細な検討を行い、そして化学療法を施行された臨床検体を用いて臨床応用への可能性を探索する橋渡し研究を行う。さらに、xCT 阻害剤を用いた基礎研究も施行して xCT を標的とした治療薬としての可能性も併せて探索する。

【参考文献】

- 1; Kaira K, et al. BMC Cancer 2013 in press.
- 2; Kaira K, et al. Br J Cancer 2012;107:632-8.
- 3; Kaira K, et al. Clin Cancer Res. 2007 1;13:6369-78.
- 4; Kaira K, et al. Br J Cancer 2008;98:742-8.
- 5; Kaira K, et al. Int J Cancer 2008;124:1152-60.
- 6; Fuch BC, et al. Semin Cancer Biol 2006;15:254-66.
- 7; Baek S, et al. Clin Cancer Res 2012;18:5427-37.
- 8; Ishimoto I, et al. Cancer Cell 2011;11:387-400.

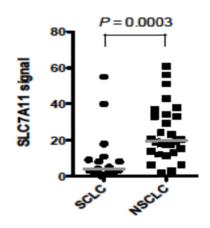
3.研究の方法

肺癌細胞株に対して、xCT, CD44 mRNA 発現量と酸化ストレス状態におけるグルタチオン、酸化ストレスシグナル、細胞増殖、血管新生に関連するマーカーを検討する。xCT 発現に従った抗癌剤による薬剤感受性の評価をin vitro と in vivo で検証し、xCT 発現の薬剤耐性について詳細な検討を行う。悪性腫瘍で高発現しているアミノ酸トランスポーターであるLAT1とASCT2発現も評価し、xCT との関連を調べる。xCT 発現の原因遺伝子特定のため次世代シークエンサーを用いて遺伝子解析も行い、さらに xCT 阻害剤である sulfasalazine を用いて肺癌細胞における抗腫瘍効果を検証する。次に抗癌剤治療がなされた 280 例の進行非小細胞肺癌における xCT, CD44, LAT1, ASCT2 発現を測定して、xCT 発現の薬剤感受性を臨床検体で検証する。本研究では xCT 発現の抗癌剤薬剤耐性を基礎的・臨床的側面から検討できるように研究計画を立てた。

4.研究成果

xCT と薬剤抵抗性

20 種類の肺癌細胞株を用いて、xCT 発現について、RT-PCR 法を行い xCT mRNA 発現量を評価した。肺癌細胞株は非小細胞肺癌と小細胞肺癌の細部株を使用して検討したが、非小細胞肺癌に比べて小細胞癌の細胞株は有意に xCT 発現量が低かった(下図)。



細胞株における治療効果は有意に小細胞肺癌で高かった。xCT 発現は小細胞肺癌細胞株に比べて非小細胞肺癌細胞株で高発現の結果であった。非小細胞癌は

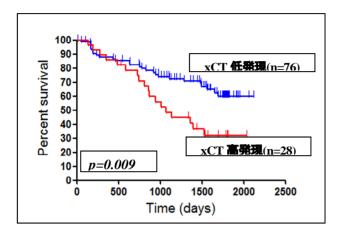
薬剤感受性試験

臨床的にも小細胞肺癌は薬剤感受性が高く、化学療法により腫瘍が縮小する傾向がみられる。一方、非小細胞肺癌は薬剤感受性が低く治療抵抗性のため、化学療法が奏効しにくい腫瘍である。

MTT assay による in vitro study で 5-FU、CDDP、paclitaxel による薬剤感受性試験を行ったところ小細胞肺癌細胞株のほうが非小細胞肺癌細胞株より有意に細胞増殖能が低下した。小細胞肺癌と非小細胞肺癌の各々の細胞株で xCT 発現に従った治療効果を評価したところ、小細胞肺癌では xCT 発現量に関わらず肺癌細胞株の増殖能低下とアポトーシスが見られた。しかし、非小細胞肺癌細胞株では xCT 発現が高い細胞で 5-FU、CDDP、paclitaxelの治療感受性は低く、xCT 発現が低い細胞では薬剤感受性が高い傾向がみられた。これらの結果から、小細胞肺癌では xCT 発現は低い傾向があり、薬剤抵抗性にはあまり関与しない可能性がある。しかし、非小細胞肺癌において xCT 発現は高く、この mRNA 発現量により薬

剤抵抗性となることがわかった。さらに、xCT 以外のアミノ酸トランスポーターであるLAT1やASCT2について薬剤耐性の可能性について検討したが、小細胞肺癌と非小細胞肺癌の細胞株でこれらのアミノ酸トランスポーターの mRNA 発現量に有意差はなく、細胞株におけるLAT1とASCT2 発現量の違いで薬剤感受性の違いはなかった。

臨床検体用いた研究

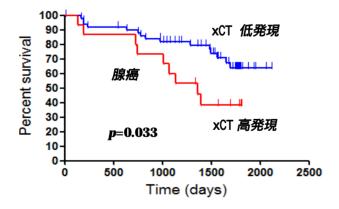


我々は非小細胞肺癌切除例 104 例の腫瘍組織を用いて xCT の蛋白発現を免疫組織学的に検討した。その結果、xCT 高発現の症例で有意に予後不良であった(上図)。

次に、腫瘍組織の RNA より xCT 発現を測定して臨床 的な検討を行った。

肺癌切除例に対して腫瘍組織の DNA および RNA を前向きに採取した国立病院機構渋川医療センターの 110 例の検体を群馬大学の臨床研究倫理審査委員会の承認を得て、xCT 発現量を mRNA で定量化した。症例は 72 例が肺腺癌、21 例が扁平上皮癌、13 例がその他組織型であるが、xCT 発現量は組織型により有意な差は認めなかった。 しかし、xCT 高発現症例は、xCT 低発現量症例に比べて有意に予後不良であった。特にその傾向は肺腺癌で見られた(下図)。

薬剤感受性との相関は術後再発で治療がなされている症例が少ないため有意な差を認めなかった。同時に腫瘍組織の xCT 蛋白発現を免疫染色で確認しようとしたが、免疫染色で評価できる xCT の抗体はなく、蛋白発現を検討するのは不可能と判断した。



マウスによる in vivo 研究

In vivo による研究でマウスを用いて xCT 阻害剤である サラゾピリンを用いて xCT 発現を抑制することで薬剤感 受性が改善するかどうかを検証する実験を計画した。さ らに CRISPR/Cas9 による xCT のノックダウンを行う予定 であるが、本研究期間内に結果を出すことが出来なかっ た。現在、進行中の研究で in vivo による検証で xCT 発 現の薬剤耐性の可能性を探求することにした。

今後の課題

xCT 発現と薬剤耐性の関係について、シグナル伝達経路をグルタチオン中心に進めていく予定である。

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5件)

- 1 Sato T, <u>Kaira K</u>, Takahashi K, Takahashi N, <u>Kanai Y</u>, Asao T, Horiguchi J, Oyama T. Prognostic significance of the expression of CD98 (4F2hc) in gastric cancer. Anticancer Res 37, 631-636, 2017.
- 2 Shimizu A, <u>Kaira K</u>, Okubo Y, Utsumi D, Yasuda M, Tominaga H, Oriuchi N, <u>Kanai Y</u>, Takahashi K, Ishikawa. Prognostic impact of LAT1 and CD98 expression in cutaneous angiosarcoma. Neoplasma 64, 283-288, 2017
- 3 Imai H, <u>Kaira K</u>, Naruse I, Hayashi H, Iihara Hm Kita Y, Mizusaki N, Asao T, Ithoh Y, Sugiyama T, Yamada M. Successful afatinib treatment of advanced non-small celllung cancer who are undergoing hemodialysis. Cancer Chemother Pharmacol 79, 209-213, 2017.
- 4 <u>Kaira K</u>, Tomizawa Y, Imai H, Sakurai R, Matsuura M, Yoshii A, Ochiai M, kotake M, Ebara T, Saitoh JI, Sunaga N, Minato K, Saito R, Hisada T. Phase I study of nab-paclitaxel plus carboplatin and concurrent thoracic radiotherapy in patients with locally advanced non-small cell lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 79, 165-171, 2017.
- 5 <u>Kaira K</u>, Higuchi T, Sunaga N, Arisaka Y, Hisada T, Tominaga H, Oriuchi N, Asao T, Tsushima Y, Yamada M. Usefulness of ¹⁸F-α-Methyltyrosine PET as Therapeutic Monitoring of Patients with Advanced Lung Cancer. Anticancer Res 36; 6481-6490, 2016.

[学会発表](計2件)

- 解良恭一、成清一郎、徳満葉子、茂木政彦、浅尾高行: 夜間化学療法と就労支援 第54回日本癌治療学会学術集会 2016
- <u>Kaira K</u>, Shimizu A, Yasuda M, Ohkubo Y, Asao T, Takahashi K, Ishikawa O, PD-L1 expression and possibility of its therapeutic target in cutaneous angiosarcoma, 2016 ASCO Annual Meeting, Chicago, Illinois, June 3-June 7, 2016.

[図書](計1件)

Yuichi Takiguchi, Editor. Molecular Targeted Therapy of Lung Cancer. Springer eBook 2017. (Chapter 3; <u>Kaira K.</u> PET-CT, Bio-imaging for predicting prognosis and response to chemotherapy in patients with lung cancer. P45-61)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称: 発明者: 権利者: 種類:

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

解良恭一 (Kaira Kyoichi)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40400783

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

金井好克 (Kanai Yoshikatsu) 大阪大学・大学院医学系研究科・教授 研究者番号:60204533

(4)研究協力者

()