

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461183

研究課題名(和文) 悪性中皮腫における薬剤耐性の克服と分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Development of targeted therapy to overcome drug resistance in malignant mesothelioma

研究代表者

関根 郁夫 (SEKINE, Ikuo)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10508310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト悪性中皮腫細胞のペメトレキセド(PEM)耐性株を樹立し、核酸合成酵素の発現上昇が見られない耐性株と親株で網羅的に遺伝子発現を比較した。当該蛋白質が耐性株で増加し、PEM刺激でさらに増加した遺伝子としてCARPを同定した。しかし、siRNAを用いて発現を低下させてもPEM耐性に変化はなかった。次に耐性株ではリン酸化AMPKとリン酸化p70S6Kの発現が亢進し、PEM刺激によってこれらがさらに増強することを見いだした。さらにAMPK活性化剤が親株にPEM耐性を誘導し、阻害剤がPEM耐性株の耐性を減弱させることが示された。

以上よりPEM耐性には活性化AMPKが関与していると考えた。

研究成果の概要(英文)： We established pemetrexed (PEM)-resistant mesothelioma cells which did not show any increase of the relevant enzyme activities. We found that expression of CARP was elevated in the PEM-resistant cells with a microarray and Western blot analysis. However, down-regulation of CARP expression with si-RNA did not influence the PEM resistance. Next, we found increased phosphorylated AMPK and p70S6K levels in PEM-resistant cells, and PEM stimulation augmented these phosphorylation. An AMPK activator increased PEM resistance in the parent cells and an inhibitor decreased PEM resistance of the PEM-resistant cells.

These data indicated that constitutive activation of AMPK was associated with PEM resistance.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：ペメトレキセド 薬物耐性 CARP AMPK ANKRD1

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性胸膜中皮腫 (MPM) は中皮細胞から発生するまれな悪性腫瘍で、アスベスト(石綿)への曝露が原因と考えられている。日本における MPM の年間死亡数は 1995 年の 500 人から 2006 年の 1000 人へと倍増し、さらに今後も増え続けることが予想されている。

(2) MPM に対する標準治療はシスプラチン (CDDP)+ ペメトレキセド (PEM) による全身化学療法であるが、7 割の患者では腫瘍縮小効果が認められない(自然耐性)、3 割の患者では腫瘍が一旦小さくなるが、半年ほどで再び増大し、その際には CDDP+PEM 療法はほとんど効果が期待できない(獲得耐性)。このような MPM に対する 2 次化学療法として確立したレジメンはない。従って、悪性胸膜中皮腫細胞の CDDP や PEM に対する耐性機序の解明と克服は、重要な治療戦略の 1 つである。

(3) CDDP に対する耐性機序として細胞内蓄積低下、細胞質内不活性化、DNA 修復の異常などが報告されている。一方、PEM 耐性については第 1 標的分子である Thymidylate synthase (TS)の発現上昇が知られているが、他の耐性機序についてはよく分かっていない。

(4)我々はコロニー形成能を指標に PEM 濃度を段階的に増加させて 4 つの PEM 耐性株を樹立した。そのうちの 2 株 (NCI-H28、NCI-H228) では TS 発現上昇を認めず、未知の耐性機序が推定された。この 2 株において親株を対照として網羅的に遺伝子発現を調べた (Agilent 社 Whole human Genome Array を使用)ところ、6 つの遺伝子 (CARP、ADRB2、SERPINE1、ITGB3、ADAMTS5、IGFBP3) の発現が共通して上昇していた。

2. 研究の目的

これら 6 つの遺伝子の MPM における病理的意義とその下流シグナル伝達経路の検討を行い、PEM 耐性克服、さらには新たな分子標的治療の標的を同定し、MPM の新規治療法を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) WST-1 細胞増殖アッセイを用いて PEM に対する細胞障害活性を確認した。

(2) 上記 6 つの遺伝子の発現をウエスタンブロット法で検討した。

(3) 蛋白レベルで発現が確認された遺伝子について、RNA 干渉によって発現をブロックし、細胞増殖が抑えられるかを観察することによって、その遺伝子産物が治療標的分子になるかを検討した。

(4) PEM の第二の標的酵素についてもその発現レベルと下流シグナル伝達系の活性化状態と細胞増殖の関係を検討した。

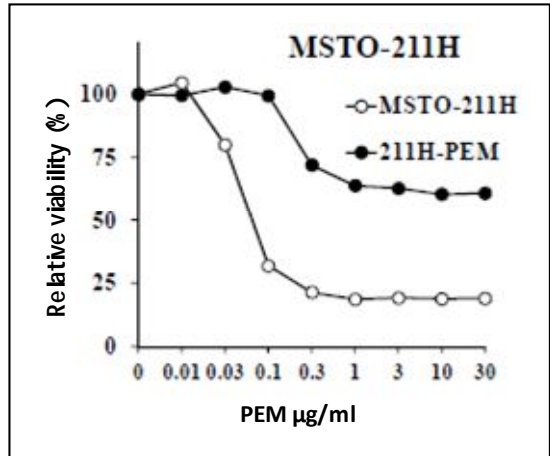
(5) 培養上清液の蛋白量をエライザ法で測定し、遺伝子転写産物の分泌量を評価した。

(6) 重要な遺伝子産物蛋白に対する阻害剤と活性化剤を投与し、PEM に対する感受性の変化を観察した。

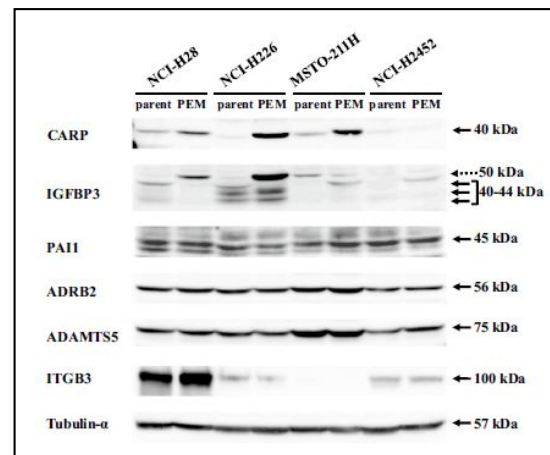
(7) 以上検討した遺伝子のうちで、治療標的となりうる遺伝子を決定した。

4. 研究成果

(1) WST-1 細胞増殖アッセイによって、2 つの PEM 耐性株 (NCI-H28、NCI-H228) で PEM 細胞障害活性が低下していることを確認した。同様の手法で新たに 2 つの MPM 細胞株 (MSTO-211H、NCI-H2454) から PEM 耐性株を作成し、PEM 細胞障害活性の低下を確認した。この 4 種類の耐性株は PEM に対する IC50 が最大で約 100 倍上昇していた。

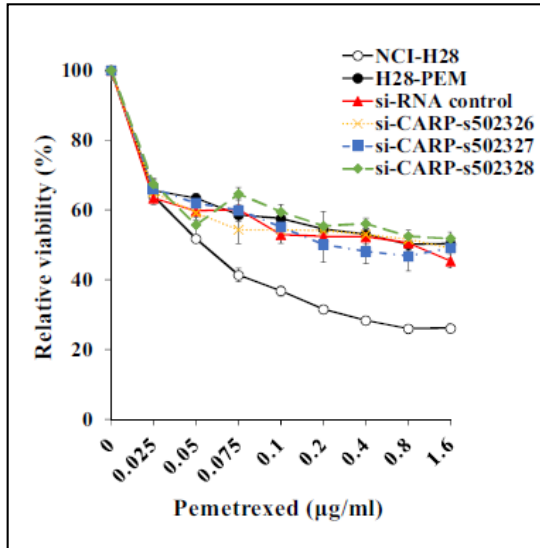


(2) 6 つの遺伝子の発現をウエスタンブロット法で調べたところ、CARP と IGFBP3 分子に発現上昇が 4 種類の PEM 耐性株すべてにおいて認められた。従って、この 2 つは PEM 耐性に関する有力な候補分子と判断し、siRNA を用いてさらに検討を加えた。



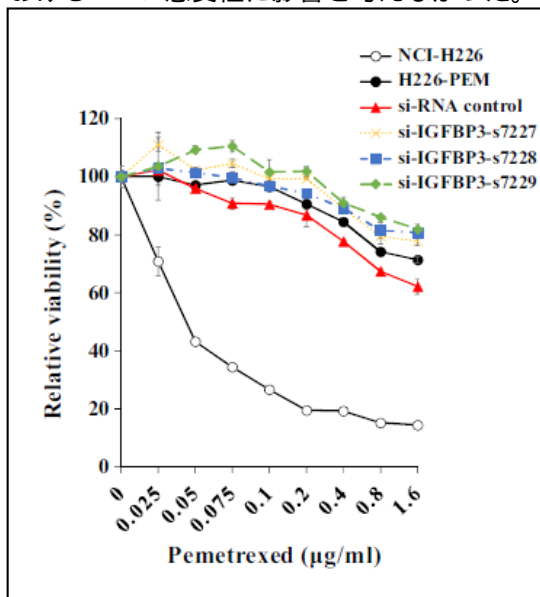
(3) siRNA による CARP 分子の発現減少は、

PEM 耐性を変化させなかった。



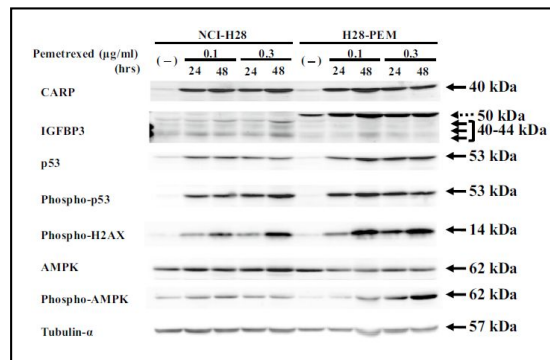
そこで親株と耐性株を PEM で処理したところ、CARP の発現上昇を認めた。さらに PEM 刺激によって親株では p53 のセリン 15 残基のリン酸化が誘導され、結果として細胞内 p53 レベルが上昇したが、PEM 耐性株では p53 のリン酸化や p53 レベル上昇は認められなかった。そこで PEM 処理による DNA 損傷、p53 遺伝子型と CARP 発現との関連を調べた。CARP 発現の程度は細胞株によって様々であったが、DNA 損傷のマーカーであるリン酸化 H2AX の発現は全ての細胞株で上昇していた。次に、CARP 発現と DNA 損傷に拠らない内因性の p53 発現上昇との関連を見るために、p53 蛋白の分解を阻害する nutlin-3a で処理すると、CARP 発現は PEM 耐性株か親株かではなく細胞株の種類に依存していた。

(4) siRNA による IGFBP3 分子の発現低下は、3 種類の siRNA のいずれにおいても、耐性株における PEM 耐性を増加させたが、親株における PEM 感受性に影響を与えなかった。



この結果は、IGFBP3 分子の PEM 耐性における関与を示唆するも、発現上昇が PEM 耐性に関連していないことを意味している。そこで、培養上清液の IGFBP3 量をエライザ法を用いて検討したところ、PEM 耐性株では IGFBP3 分子の分泌が実は低下しており、siRNA 処理によって、さらに分泌量が低下することが判明した。一方、細胞内部の IGFBP3 は親株に比較して増加していた。すなわち、PEM 耐性株では IGFBP3 分子の分泌傷害によって細胞外分子の量が低下しており、それを補正するため産生量（細胞内蛋白量）が増加したと想定された。また、IGFBP3 分泌の減少は増殖因子である IGF の当該受容体への結合性を増加させ、薬剤感受性を減少させたと考えられる。さらに親株と耐性株を PEM で刺激したところ、IGFBP3 発現はほとんど変化しなかった。

(5) 次に PEM の第二の標的酵素である AICART が阻害され、AMPK および mTOR 系が亢進する可能性を検討した。耐性株ではリン酸化 AMPK とリン酸化 p70S6K の発現が亢進し、PEM 刺激によってこれらがさらに増強することを見いだした。



さらに AMPK 活性化剤 A769662 が親株に PEM 耐性を誘導し、阻害剤 compound C が PEM 耐性株の耐性を減弱させることが示された。一方、PEM 耐性株を mTOR 阻害剤ラパマイシンと p70S6K 阻害剤 PF4708671 で処理しても、PEM 感受性に変化は無かった。

(6) 以上より CARP 発現上昇は PEM 耐性のバイオマーカーになる可能性があり、また PEM 耐性には活性化 AMPK が関与していると考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Qin Y, Sekine I, Fan M, Takiguchi Y, Tada Y, Shingyoji M, Hanazono M, Yamaguchi N, Tagawa M. Augmented expression of cardiac ankyrin repeat protein is induced by pemetrexed and a possible marker for the pemetrexed resistance in mesothelioma cells. *Cancer Cell Int.* 2017 Dec 11;17:120.

doi:10.1186/s12935-017-0493-8. 査読有り

2. Shimazu K, Tada Y, Morinaga T, Shingyoji M, Sekine I, Shimada H, Hiroshima K, Namiki T, Tatsumi K, Tagawa M. Metformin produces growth inhibitory effects in combination with nutlin-3a on malignant mesothelioma through a cross-talk between mTOR and p53 pathways. BMC Cancer. 2017;17(1):309. doi:10.1186/s12885-017-3300-y. 査読有り
3. Yamauchi S, Zhong B, Kawamura K, Yang S, Kubo S, Shingyoji M, Sekine I, Tada Y, Tatsumi K, Shimada H, Hiroshima K, Tagawa M. Cytotoxicity of replication-competent adenoviruses powered by an exogenous regulatory region is not linearly correlated with the viral infectivity/gene expression or with the E1A-activating ability but is associated with the p53 genotypes. BMC Cancer. 2017 Sep 5;17(1):622. doi: 10.1186/s12885-017-3621-x. 査読有り

〔学会発表〕(計 3件)

1. 鐘 博雅、関根 郁夫、滝口 裕一、グエン・タオ、盛永 敬郎、多田 裕司、山口 直人、田川 雅敏．悪性中皮腫におけるペメトレキセド耐性は AMPK の活性化が関与する．第 76 回日本癌学会総会．2017、横浜
2. グエン・タオ、鐘 博雅、盛永 敬郎、久保 秀司、関根 郁夫、多田 裕司、巽 浩一郎、島田 英昭、廣島 健三、田川 雅敏．MDM2 阻害剤は p53 野生型悪性中皮腫の内因性 p53 を増加させ腫瘍融解性ウイルスによる細胞傷害活性を上昇させる．第 76 回日本癌学会総会．2017、横浜
3. 田川雅敏、盛永敬郎、チョンボウヤア、グエンタオ、久保秀司、関根郁夫、多田裕司、巽浩一郎、島田英昭、廣島健三：MDMX 阻害剤の悪性中皮腫に対する細胞傷害活性は p53 非依存的であるが、MDM2 阻害剤とは相乗的な併用効果を示す A MDMX inhibitor produces cytotoxicity in a p53-independent manner but achieves synergistic actions with MDM2 inhibitors. 第 75 回日本癌学会学術総会．2016、横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

関根 郁夫 (SEKINE, Ikuo)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：10508310

(2)研究分担者

滝口 裕一 (TAKIGUCHI, Yuichi)
千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30272321

岩澤 俊一郎 (IWASAWA, Shunichiro)
千葉大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：00527913

田川 雅敏 (TAGAWA, Masatoshi)
千葉県がんセンター研究所・細胞治療開発
研究部・部長
研究者番号：20171572