

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08593

研究課題名(和文) 肺癌化学療法の効果・副作用予測因子としての有機カチオントランスポーターの橋渡し研究

研究課題名(英文) Translational research of organic cation transporter as the predictive biomarker for lung cancer chemotherapy

研究代表者

小栗 鉄也 (Tetsuya, Oguri)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：60363925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤プラチナ耐性肺癌細胞株を樹立し、有機カチオントランスポーター6(OCT6)の発現低下とともに細胞内プラチナ濃度が減少し、プラチナ製剤耐性との関連することを認めた。OCT6の機能的な遺伝子多型(SNP)に着目し、このSNPについて、非小細胞肺癌患者におけるシスプラチン投与症例での効果との関連について後方視的に検討を行った。シスプラチン投与症例において、中央生存期間は遺伝子多型により有意な差を認めた。一方でこのOCT6のSNPはドキソルビシンの薬剤代謝にも関わることも示されており、同じアントラサイクリン系抗がん剤であるアムルビシンについても検討中である。

研究成果の概要(英文)：We established platinum drug-resistant lung cancer cell lines and found that the intracellular platinum concentration was decreased concomitantly with decreased organic cation transporter 6 (OCT6) expression in the platinum-drug resistant cell lines. The present findings indicate that OCT6 is directly involved in platinum drug resistance by mediating platinum drug uptake in cancer cells. Then we focused on a functional single nucleotide polymorphism (SNP) of OCT6. We retrospectively examined the relationship between the efficacy of cisplatin and OCT6 SNP in non-small lung cancer patients. We found that progression free survival was significantly different depending on OCT6 SNP. This OCT6 SNP has shown influenced on doxorubicin pharmacokinetics, therefore we are now going to investigate the influence of OCT6 SNP for another anthracycline derivative, amrubicin.

研究分野：肺癌化学療法

キーワード：薬剤トランスポーター シスプラチン 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

生体には、必要な物質を体内・組織細胞内に取り込むためのトランスポーター、生体異物の体外排出を担う、あるいは体内への侵入を防ぐためのトランスポーターなど、様々な種類のトランスポーターが備わっている。抗がん剤においても、その治療効果や副作用との関連についてこれらトランスポーターの関わりが広く研究されている。抗がん剤の作用機序において、腫瘍細胞内の薬剤濃度は重要な要因である。有機カチオントランスポーター (Organic Cation Transporter : OCT) は、カチオン性薬剤の細胞内への取り込みに関わっており、ヒトでは OCT1~3、6 の 4 つのファミリーが知られている。申請者は、複数のシスプラチン耐性肺癌細胞株で、OCT6 の発現の変化が細胞内プラチナ濃度の変化とともにシスプラチン (CDDP) の殺細胞効果に影響することを認め、OCT6 がシスプラチンの感受性・耐性規定因子になる可能性を見出した。OCT ファミリーは他の抗がん剤の細胞内取り込みにも関与しているが、正常細胞でも臓器による発現特異性があり、OCT ファミリーの基質となる抗がん剤の基礎的研究とともに、OCT ファミリーと抗がん剤の臨床効果や副作用との関連について検討する本研究を立案した。

2. 研究の目的

OCT ファミリーの新たな基質となる抗がん剤の基礎的検討とともに、プラチナ製剤をはじめとする抗がん剤の効果や副作用と OCT ファミリーとの関連について臨床的な検討を行い、肺癌化学療法の効果・副作用予測因子としての OCT の有用性について明らかにする。

3. 研究の方法

1) 基礎的検討

肺癌細胞株におけるプラチナ製剤や他の抗がん剤耐性と OCT ファミリー発現との関連を検証するために、耐性株を作成し、OCT の発現や薬剤細胞内濃度の検討を行う。また OCT ファミリーの遺伝子強制発現ベクターを肺癌細胞株に導入し、親株との比較で抗がん剤耐性変化を検討する。

OCT6 には、機能的な遺伝子多型 rs714368 146A>G の遺伝子多型 (SNP) があり、抗がん剤との関連については不明であるため、クリスパー・キャスナイン (CRISPR/Cas9) システムによるゲノム編集技術を用いて、OCT6 の遺伝子多変化した癌細胞株の樹立をおこない、OCT6 の SNP が薬剤の感受性の変化や細胞内薬剤濃度に変化を及ぼすか検討を行う。

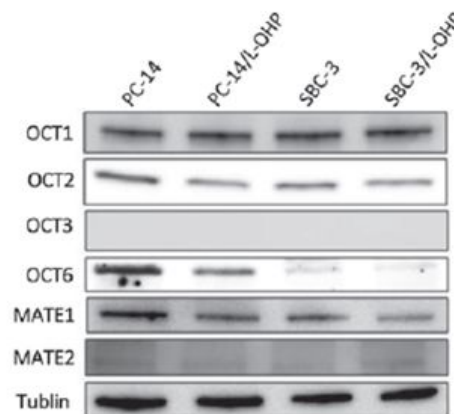
2) 臨床的検討

CDDP が投与された非小細胞肺癌症例について、血液検体から採取した DNA を用いて確認した rs714368 の SNP と治療や副作用との関連について、後方視的に検討を行う。

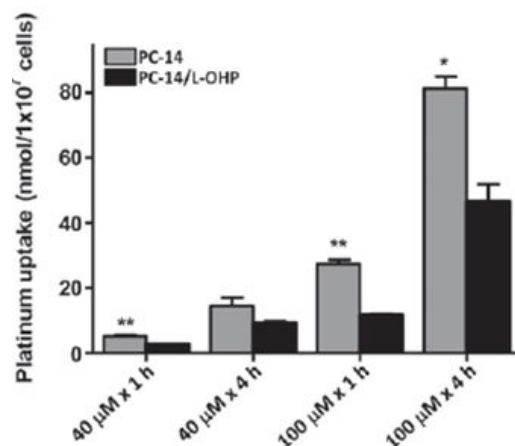
4. 研究成果

1) オキサリプラチン (L-OHP) 耐性との関連

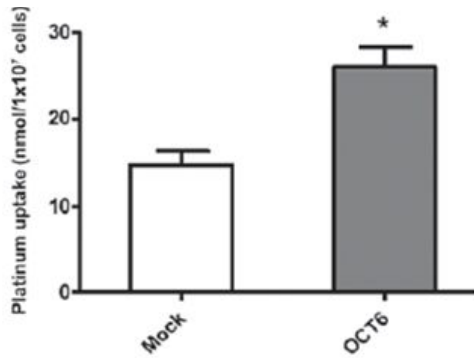
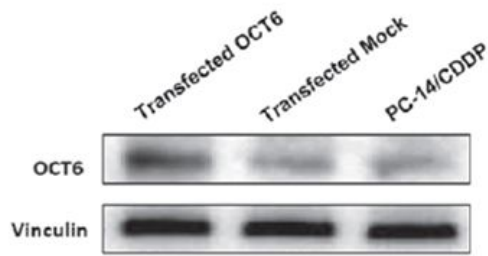
OCT と CDDP 以外の抗がん剤プラチナ製剤耐性との更なる関連を調べるために、肺癌細胞株 PC-14 に L-OHP を持続暴露し、L-OHP 耐性肺癌細胞株 (PC-14/L-OHP) を樹立した。L-OHP 耐性肺癌細胞株は L-OHP 以外に CDDP にも交叉耐性を示し、OCT ファミリーの中で OCT6 の蛋白発現低下が認められた。尿管で L-OHP の排泄に関わるトランスポーター multidrug and toxin extrusion (MATE) ファミリーの蛋白発現も調べたが、変化を認めなかった。



親株と L-OHP 耐性肺癌細胞株において L-OHP 曝露後の細胞内プラチナ濃度を測定したところ、L-OHP 耐性肺癌細胞株において細胞内プラチナ濃度は減少しており、OCT6 の蛋白発現低下により細胞内への L-OHP の取り込みが減少していることが分かった。

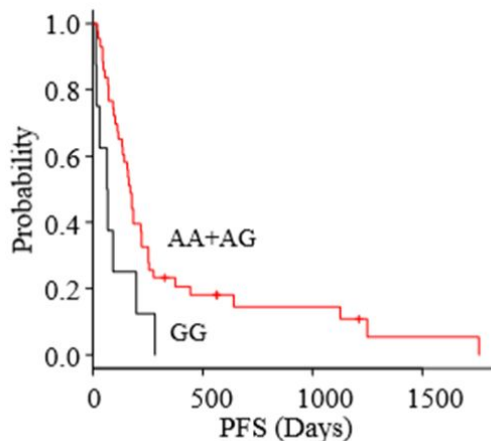


さらに、PC-14/CDDP より作成した OCT6 強制発現細胞肺癌細胞株において、ベクターのみをトランスフェクションしたコントロールに比べて L-OHP 曝露後の細胞内プラチナ濃度が有意に上昇していた。以上の結果から以前 CDDP 耐性肺癌細胞株での結果と同様に、OCT6 の蛋白発現が L-OHP 耐性に直接かかわることが示され、OCT の臨床検討を行うこととなった。



2)OCT6 の SNP と CDDP 投与との臨床的な関連

CDDP 投与 51 症例において、血液検体から採取した DNA を用いて確認した rs714368 の SNP は AA16 例、AG27 例、GG8 例であった。A アレルを持つ AA+AG 群と A アレル持たない GG 群で比較をすると、CDDP 投与後の中央生存期間(MST)は AA+AG 群 171 日(95% CI 115-220 日)、GG 群 66 日(95% CI 14-97 日)で有意に AA+AG 群で奏功していた ($P < 0.017$)。しかし奏効率や病勢制御率については、SNP の間で差を認めなかった。



	n	MST [95% C.I.]	p value
AA+AG	43	171 [115-220]	0.017
GG	8	65.5 [14-197]	

	Response rate		
	CR+PR	SD+PD	p value
AA+AG	20	23	0.119
GG	1	7	

	Disease control rate		
	CR+PR+SD	PD	p value
AA+AG	38	5	0.3
GG	6	2	

現在 CDDP と同じプラチナ製剤であるカルボプラチンについても、OCT6 の遺伝子多型と治療効果との関連について症例を蓄積し検討を進めている。

一方、rs714368 146A>G の SNP で CDDP をはじめとするプラチナ製剤の細胞内の濃度や殺細胞効果に影響を与えるか否かについては、未だ明確なエビデンスはないため、現在クリスパー・キャスナイン(CRISPR/Cas9)システムによるゲノム編集技術により、OCT6 が継続的に高発現している HeLa 細胞を用いて、OCT6 の遺伝子多型の細胞株の樹立を行っている。現在シングルクローンを単離し、遺伝子多型の確認をシーケンスで行っており、それが確認できれば、プラチナ製剤暴露によるプラチナ製剤の細胞内の濃度や殺細胞効果に基礎的検討を進めてゆく。

3)OCT6 の SNP とアムルピシンとの関連について

OCT6 はドキソルビシンの薬剤代謝にも関わることが示されており、同じアントラサイクリン系抗がん剤であるアムルピシン (AMR) についても検討中である。小細胞肺癌の既治療症例に対して AMR 単剤で治療行った症例で、以前血中濃度をモニタリング行ったデータを解析すると、この OCT6 の rs714368 146A>G の SNP により、薬物濃度時間曲線下面積 (Area Under the blood concentration-time Curve : AUC) に有意な差を認めることが明らかとなった。以前より AUC とアムルピシンの副作用である骨髄毒性との間に相関関係があることも知られており、現在 AMR の代謝に関わる代表的な薬剤排出トランスポーター ABCB1 などの遺伝子多型ととともに、治療効果との関連のみならず、OCT6 の遺伝子多型とアムルピシンの骨髄抑制との関連について検討を進めている。

また前述の OCT6 遺伝子多型編集を行った HeLa 細胞を用いて、アムルピシン投与後の細胞内濃度や薬剤感受性について、基礎的に SNP で差を認めるか否かについても検討を行ってゆく。

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)

Oguri T, Kuni E, Fukuda S, Sone K, Uemura T, Takakuwa O, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Maeno K, Ito Y, Niimi A. Organic cation transporter OCT6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs. Biomed Rep 5:639-643, 2016. DOI:10.3892/br.2016.772

[学会発表](計 2 件)

Sone K, Fukuda S, Oguri T, Kuni E, Uemura T, Takakuwa O, Maeno K, Ito Y, Niimi A. Expression of organic cation transporter 6 mediates the resistance to anticancer platinum drug cisplatin and oxaliplatin. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日-8日 横浜

Oguri T, Kunii E, Fukuda S, Uemura T, Takakuwa O, Maeno K, Kanemitsu Y, Ohkubo H, Takemura M, Ito Y, Niimi A. Organic cation transporter 6 directly confers resistance to anticancer platinum drugs. ESMO Asia 2015 Congress, December 18-21, 2015, Singapore.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小栗 鉄也 (OGURI, Tetsuya)
名古屋市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60363925

(2)研究分担者

高桑 修 (TAKAKUWA, Osamu)
名古屋市立大学・医学研究科・助教
研究者番号：60363925

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

国井 英治 (KUNII, Eiji)
福田 悟史 (FUKUDA, Satoshi)
曽根 一輝 (Sone, Kazuki)