

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11345

研究課題名(和文) 小児悪性固形腫瘍に対する抗アポトーシスタンパクを標的とした分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Molecular target therapy to IAP for pediatric solid tumor

研究代表者

上野 豪久 (Ueno, Takehisa)

大阪大学・医学部附属病院・特任准教授(常勤)

研究者番号：10456957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：小児固形腫瘍における分子標的薬のターゲットとして、抗アポトーシス分子 cIAPは新規分子標的薬 Birinapantのターゲットとなり、小児固形腫瘍の一つである肝芽腫にたいして、シスプラチンによる化学療法と併用することにより、化学療法の効果を増強し、また、その副作用を低減できることが明らかになった。今後動物実験も含めて検証していくことが望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、新規IAP発現抑制薬Birinapantにより、小児腫瘍の増殖が抑制されることが明らかになれば、小児悪性腫瘍に対する新しい分子標的治療の可能性が拓かれる。成人癌でBirinapantを用いた臨床試験が行われている現状を考えると、この研究の成果を、早期に臨床的に実用化できる可能性が高い。すなわち、我々の研究によりIAPを標的とした分子標的治療が実用化できれば、従来の化学療法と異なったコンセプトによる新しい薬物治療の可能性が拓かれ、難治性の小児悪性腫瘍の治療成績向上に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The anti-apoptotic molecule cIAP is a target of the novel molecular targeting drug "Birinapant" as a target of molecular target drug in pediatric solid tumors hepatoblastoma, is treated with chemotherapy by cisplatin in combination with chemotherapy. It was clarified that the effect of the drug can be enhanced and its side effects can be reduced. It is hoped that verification including animal experiments will be conducted in the future.

研究分野：小児外科

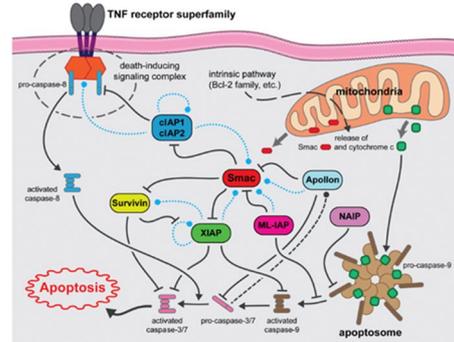
キーワード：小児がん 分子標的薬 肝芽腫 化学療法 シスプラチン 相乗効果 副作用 薬物耐性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

IAP(inhibitor of apoptosis) family タンパク質はアポトーシスの抑制と細胞分裂の調節の2つの機能を有するタンパク質である。IAPファミリーには cIAP、XIAP、サバイビンなどがあり IAP family タンパク質は直接的にカスパーゼ活性を抑制し、細胞死に対する抵抗性を示すと考えられている。cIAP と XIAP は多様な癌腫において過剰発現している IAP タンパク質であり、ヒトにおいて多発性骨髄腫や MALT リンパ腫などで過剰に発現していることが知られていて癌組織特異的な発現であることがわかっている。(Oncogene 2008 27, 6252-6275) IAP は TRAIL 誘導アポトーシスの制御にかかわっており、IAPファミリーの一つのサバイビンの機能を抑制することにより腫瘍細胞死の誘導、細胞死抵抗性の解除および既存の抗悪性腫瘍薬による細胞死の感受性が高まることすでに報告されている。(Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 17:2909-15.) 従って同じく IAPファミリーの cIAP と XIAP の発現をそのアンチセンスで抑制することにより、放射線や、抗癌剤の感受性を高めることが可能であると考えられる。また様々な癌腫で癌細胞に高発現する変異のない抗原として同定され、cIAP と XIAP 特異的免疫療法の臨床試験も開発されている。これらのことから cIAP と XIAP を標的とした治療法の確立は小児固形腫瘍に対しても可能であることが推察される。



我々は IAPファミリーの中でも分子標的薬のターゲットとなりうる cIAP と XIAP に着目した。Birinapant は SMAC (第2のミトコンドリア由来カスパーゼ活性化因子) の低分子ペプチド模倣薬で、アポトーシス阻害タンパク質 (IAP) に選択的に拮抗する。Birinapant は cIAP と XIAP を迅速に分解して TNF および TRAIL による外因性アポトーシス経路の活性化を可能にし、同時に古典的 NF- $\kappa$ B 生存経路を迅速に遮断してがん細胞を死滅させる。Birinapant は数種類の成人固形腫瘍で臨床開発が第2相に入り、急性骨髄性白血病 (AML) における第2相試験が進行中である。これまでに実施された臨床試験における Birinapant の忍容性は良好で、有効な IAP 抑制機能と抗がん活性を示している、これらを小児腫瘍に用いることで、小児腫瘍が抑制されるかを in vitro と in vivo で検討し、小児腫瘍における cIAP と XIAP が分子標的治療のターゲットとなり得るかを明らかにするために本研究を計画した。小児悪性腫瘍、特に横紋筋肉腫において cIAP と XIAP の発現が亢進し、その抑制により腫瘍細胞の増殖が抑制されるという仮説をたて、これを検証するために小児腫瘍細胞株を用いて以下の研究を計画した。

### 2. 研究の目的

1. まず小児固形腫瘍の一つである肝芽腫で cIAP と XIAP の発現が存在するかを詳細に検討する。これは他の小児悪性固形腫瘍で報告があるが、小児肝芽腫でも同様であるかを検討しておく必要がある。実際の臨床検体を用い、腫瘍細胞内の cIAP と XIAP の発現をタンパクレベルで免疫染色法にて検討し、患者背景 (年齢、性別、病期、組織型、予後) との相関を検討する。また初発時の生検検体のみでなく、化学療法の有無や再発時の臨床検体も検討する。
2. 次に huh6 と HepG2 (肝芽腫由来) において cIAP と XIAP を特異的に阻害する新規 cIAP と XIAP 発現抑制剤である Birinapant により cIAP と XIAP の低下を定量的 RT-PCR 法及び Western blot 法により確認する。さらに腫瘍細胞増殖抑制効果を WST assay により検討し、また apoptosis 亢進の有無を検討する。
3. 以上の実験により、IAP family タンパクである cIAP と XIAP が、特に小児悪性固形腫瘍の分子標的治療の標的遺伝子となりうるかが明らかとなる。

### 3. 研究の方法

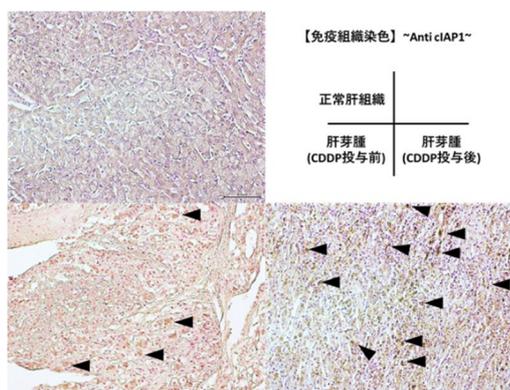
1. 小児肝芽腫の臨床検体を用い cIAP の発現が存在するかを検討する。正常肝組織と、肝芽腫の臨床検体を用い、anti-cIAP 抗体にて免疫染色を行った。また、化学療法の前後で発現に変化があるかを調べるために、シスプラチンを投与する前の標本と、投与した後の標本で同様の免疫染色を行い、その発現を比較する。
2. 肝芽腫の細胞株である、HUH-6 並びに HEP G2 に cIAP が発現しているかどうか、anti-cIAP 抗体を用いて Western blotting をおこなう。コントロールとしてはハウスキーピング蛋白の GAPDH を用い、また、ポジティブコントロールとして発現が確認されている Hela 細胞を用いて発現を検討した。
3. それぞれの細胞株に対して cIAP と XIAP 発現抑制剤である Birinapant によって、遺伝子の発現が抑制されるかどうかを real time PCR によって確認する。検出には cIAP1, cIAP2, XIAP を検出した。
4. 同様にしてそれぞれの細胞株に対し cIAP と XIAP 発現抑制剤である Birinapant によって、蛋白の発現が抑制されるかどうかを Western blotting 法により確認する。
5. 肝芽腫の細胞株 Huh-6 と HepG2 に対して Birinapant を 100  $\mu$ M までの間で割り振って

24 時間と、72 時間培養して WST-8 アッセイにて細胞数を測定することにより、増殖抑制効果を確認する

6 . 肝芽腫の細胞株 Huh-6 と HepG2 に対して Birinapant を 80  $\mu$ M、シスプラチンを 3 , 6  $\mu$ M 投与し、48 時間共培養して、48 時間培養して WST-8 アッセイにて細胞数を測定することにより、化学療法との相乗効果を確認する

#### 4 . 研究成果

1 . cIAP は正常肝組織では発現が認められないが、肝芽腫の組織では高発現が認められた。また、シスプラチンにて治療した化学療法後には発現が亢進していることがわかった。( 図 1 ) このことから、抗アポトーシス分子である cIAP が化学療法後に更新していることが判明し、この分子をターゲットにすることにより、化学療法の反応性を高める可能性がある。

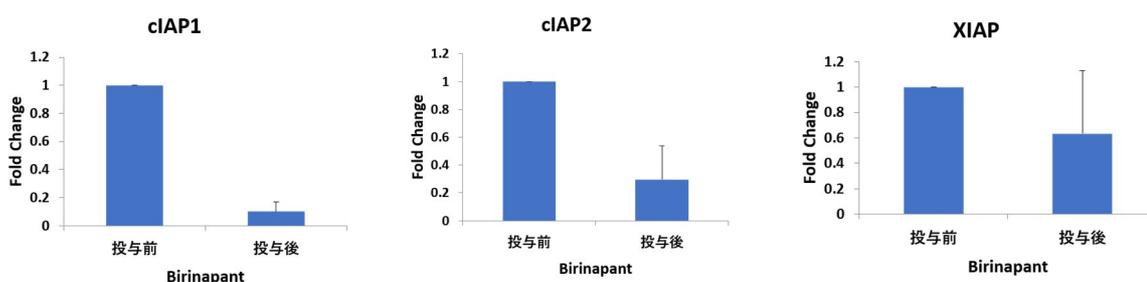


2 . 細胞株 Huh-6, HepG2 において cIAP が高発現していることが明らかになった。ポジティブコントロールである HeLa 細胞に対しても遜色のない発現をしていた。Huh-6 細胞のほうが HepG2 よりも高発現を認めた。

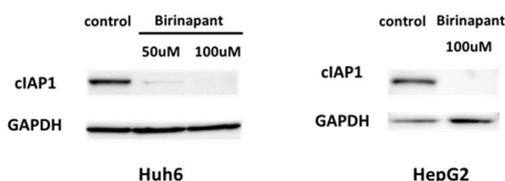
【Western blot】



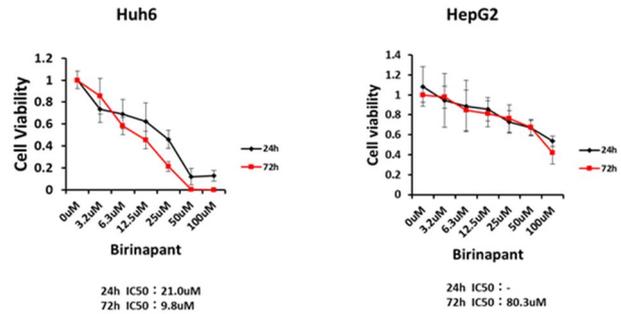
3 . cIAP と XIAP 発現抑制剤である Birinapant によって、肝芽腫の細胞株 Huh-6 の抗アポトーシス分子である cIAP1、cIAP2 並びに XIAP の遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。



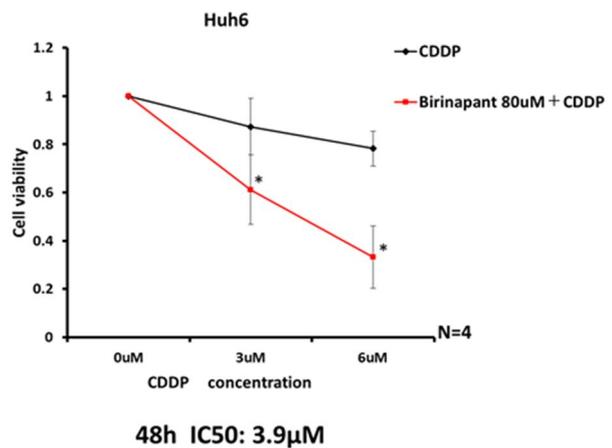
4 . 同様に Birinapant によって、cIAP1 のタンパクの発現も低下することが明らかになった。Huh-6 においては 50  $\mu$ M でも cIAP1 の発現が抑えられることが明らかになった。



5 .Birinapant を投与することによって、肝芽腫細胞株 Huh-6 と HepG2 の増殖が抑制されることが明らかになった。24 時間の時点で、発現が抑えられており、72 時間まで延長してもほとんど差はなかった。Huh-6 においては 24 時間の IC50 は 21  $\mu$ M、72 時間の IC50 は 9.8  $\mu$ M、HepG2 においてはどちらも 80  $\mu$ M であった。



6 .Birinapant は 80  $\mu$ M をシスプラチンと共培養することにおいて、シスプラチン濃度 3  $\mu$ M、6  $\mu$ M のどちらにおいても増殖効果を抑制することが明らかになった。その為、Birinapant はシスプラチンと併用することにより、シスプラチンの効果を増強することが明らかになった。



#### まとめ

以上のことから小児固形腫瘍における分子標的薬のターゲットとして、抗アポトーシス分子 cIAP は新規分子標的薬 Birinapant のターゲットとなり、小児固形腫瘍の一つである肝芽腫にたいして、シスプラチンによる化学療法と併用することにより、化学療法の効果を増強し、また、その副作用を低減できることが明らかになった。今後動物実験も含めて検証していくことが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田附 裕子  (Tazuke Yuko)  (10397698)	大阪大学・医学系研究科・准教授   (14401)	
研究分担者	奥山 宏臣  (Okuyama Hiroomi)  (30252670)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	中畠 賢吾  (Nakaha Kengo)  (50643532)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	
研究分担者	山中 宏晃  (Yamanaka Hiroaki)  (70467570)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	
研究分担者	野口 侑記  (Noguchi Yuki)  (30771042)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	
研究分担者	児玉 匡  (Kodama Tasuku)  (60771045)	大阪大学・医学部附属病院・医員   (14401)	

