

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07726

研究課題名(和文) 高悪性度肺神経内分泌腫瘍に対するStathmin1を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung targeting Stathmin1

研究代表者

清水 公裕 (Shimizu, Kimihiro)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90375535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、微小管不安定化因子SMN1を過剰蓄積するHGNET細胞株に対してSTMN1特異的阻害剤であるSTMN1 PIPがHGNET細胞株の増殖、浸潤、抗がん剤感受性に与える影響を検討した。さらに、担癌モデルマウスに対してSTMN1特異的PIPとタキサン系抗がん剤を併用する意義を検討した結果、併用群はコントロール群、STMN1単独群、タキサン系抗がん剤単独群と比較して有意な腫瘍サイズの縮小が観察された。また動物実験においてSTMN1 PIP投与は体重減少など顕著な副作用は観察されず、難治性HGNETに対する治療ツール有望であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タキサン系抗がん剤は癌診療において重要な治療ツールであるが、STMN1を過剰蓄積する腫瘍には効果が不十分であることは臨床上的問題である。この治療抵抗性を克服するためにSTMN1を抑制する治療ツール開発研究が注目されている。本研究結果によりSTMN1を過剰発現するHGNETに対してSTMN1特異的PIP阻害剤が顕著な副作用を引き起こすことなくタキサン系抗がん剤の増感作用を示すことが明らかとなった。今後、このSTMN1 PIPによるタキサン系抗がん剤増感効果を臨床試験で証明することができれば、難治性HGNET患者にとって治療抵抗性克服、予後延長を目指した新たな治療ツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the effects of STMN1 PIP, an STMN1-specific inhibitor, on the proliferation, invasion, and anticancer drug sensitivity in refractory HGNET cells overexpressing microtubule destabilizing factor SMN1. Therefore, we investigated the combined effect of STMN1-specific PIP with a taxane anticancer drug in a tumor-bearing mouse model. As a result, we observed a significant tumor reduction in the combination group compared to the control group, STMN1 alone, and the taxane alone group. Furthermore, in animal studies, STMN1 PIP administration did not cause significant side effects such as weight loss, suggesting that STMN1 PIP is a promising treatment tool for refractory HGNET.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 高悪性度肺神経内分泌腫瘍 Stathmin 1 PIP化合物 タキサン系抗がん剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞にとっても微小管は細胞生存に重要であり、微小管を不安定化する Stathmin 1 (STMN1) という癌特異的タンパクはがんマーカー、治療標的分子として注目されている。申請者および共同研究者はさまざまな固形癌で STMN1 が過剰発現し、癌の進行、予後不良と関連すること、微小管標的タキサン系抗がん剤の耐性を誘導することをこれまでに報告してきた。その研究過程において、特に高悪性度肺神経内分泌腫瘍 [HGNET: 大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) + 小細胞癌 (SCLC)] における STMN1 の発現が全癌腫の中で最も高く、さらにその発現は全症例、かつ腫瘍全体で均一に高いレベルであることを見出した(図1)。そこで我々は、高悪性度かつ難治性の HGNET に対してピロールイミダゾームポリアミド (PIP) 化合物を用いて STMN1 を特異的に抑制する治療が新たな治療戦略として有用かを細胞・動物実験にて明らかにすることを目的に本件研究を計画した。PIP 化合物は RNA 干渉と同様に任意の遺伝子配列をターゲットとして設計可能な新規の標的遺伝子発現抑制ツールであり、RNA 干渉の弱点である 生体内での不安定性を克服し、特殊なデリバリーシステムなしに腫瘍内に取り込まれるという特徴を有する次世代の抗がん化合物である

## 2. 研究の目的

本検討では生体内の腫瘍組織特異的な STMN1 抑制を達成するために、ピロールイミダゾームポリアミド (PIP) 化合物に注目した。現時点において、タキサン系抗がん剤が高悪性度の HGNET に対して first line 治療とならない理由は、HGNET における STMN1 過剰発現が関与している可能性が高い。本研究の目的は『PIP 化合物を用いて STMN1 を抑制する治療戦略が難治性の HGNET に対して抗腫瘍効果、タキサン系抗がん剤増感効果を誘導しうるかを明らかにすること』である。この研究の成果は HGNET に限らず STMN1 が過剰発現する他のがん種全般への新規治療ツールの開発にも繋がることも期待される。また、HGNET での STMN1 過剰発現は、ほぼ全症例で腫瘍全体に均一に認められるため、治療効果もほぼ全症例に期待できる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 細胞実験

#### 1) HGNET 細胞株における STMN1 抑制意義の検証

HGNET 細胞株 H446、H810 に対して STMN1 特異的 siRNA (siRNA1, siRNA2) をエレクトロポレーション法にてトランスフェクションし、STMN1 発現を抑制した。その抑制細胞を使用して CCK8 アッセイにて増殖能の変化を定量評価した。

#### 2) STMN1 PIP 化合物による STMN1 抑制効果の検証

HGNET 細胞株 H446, H810, H1694, H2106 より total RNA を抽出し、real time qRT-PCR 法で STMN1 発現を評価した。内在性コントロールとして  $\beta$ -actin を使用し

Ct 法で比較定量した。

4 種類の細胞株の中で STMN1 発現レベルの高い H446 に対して STMN1 PIP を 3  $\mu$ M で処理し 72、96、120 時間後に細胞を回収し total RNA を抽出し、上記の手法で STMN1 発現を評価した。

STMN1 PIP による STMN1 蛋白発現レベルの変化を評価するために、STMN1 抗体 (Cell Signaling Tech, 13655S) を用いて Western blot 法にて STMN1 蛋白レベルを評価した。ローディングコントロールには  $\beta$ -actin を使用した。

### 3) STMN1 PIP とタキサン系抗がん剤 PTX の併用効果の検証

H446、H1694 細胞に対して STMN1 PIP (3  $\mu$ M) とタキサン系抗がん剤パクリタキセル (PTX, 0.001  $\mu$ g/mL) を投与し 72 時間後に増殖能を CCK8 アッセイで評価した。

#### 動物実験

1) HGNET 細胞株 H446  $1 \times 10^7$  個を balb/c ノードマウスの皮下に移植し担癌も得るマウスを作成した。移植後 1 週経過した時点で評価可能な皮下腫瘍が形成された個体を PBS 群、STMN1 PIP 単独、PTX 単独群、併用群の 4 群に群分けした (Day 0)。STMN1 PIP (200  $\mu$ g/body, Day0, Day7)、PTX (45 mg/kg, Day1, Day8) に投与し、腫瘍径、体重、外観、生存を Day14 まで評価した。

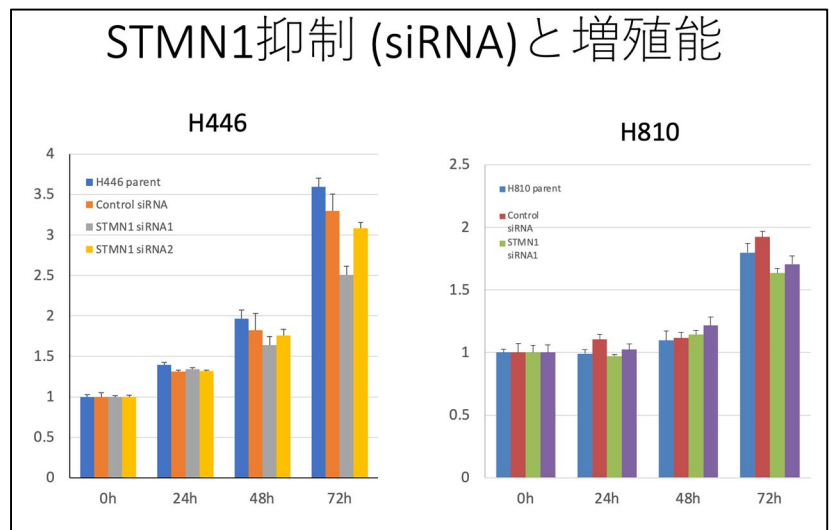
## 4 . 研究成果

#### 細胞実験 解析結果

##### 1) HGNET 細胞株における STMN1 抑制意義の検証

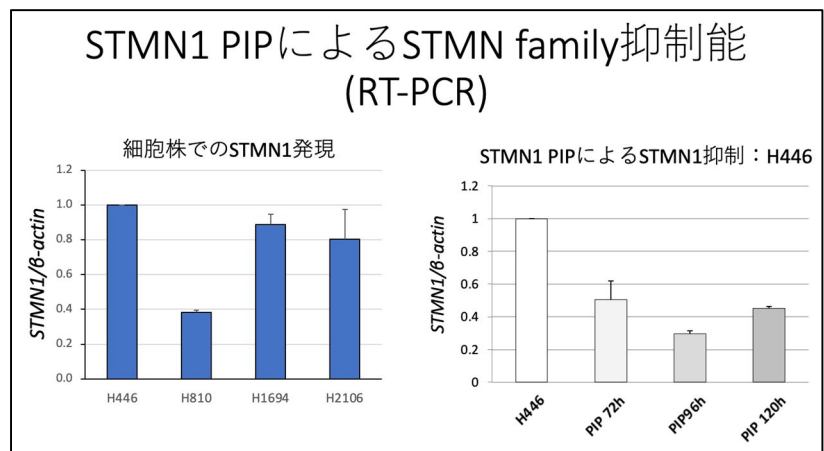
STMN1 特異的 siRNA を使用して HGNET 細胞株 H446、H810 の STMN1 発現を抑制したところ、抑制細胞群において増殖能が低下することが確認できた (図 1)。

図 1



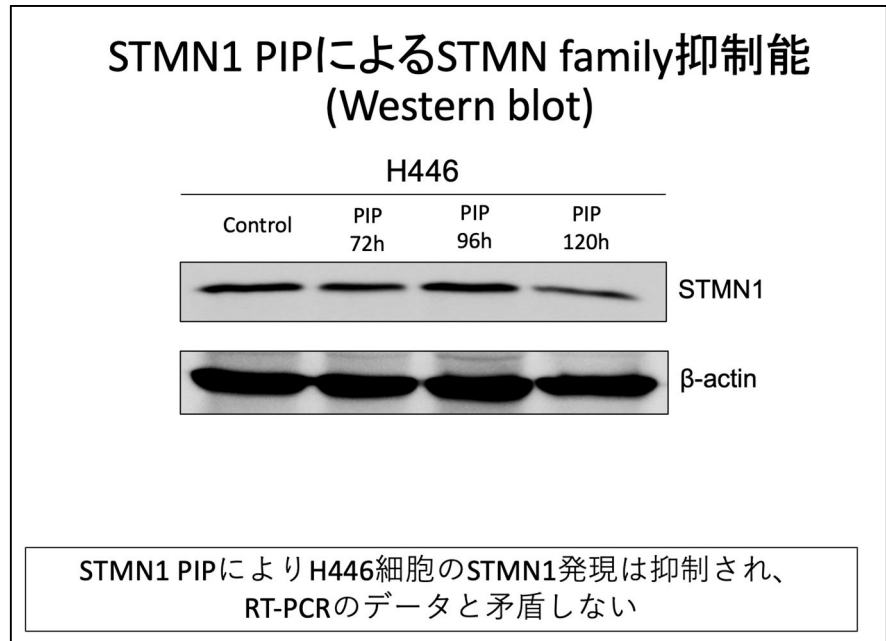
2) STMN1 PIP 化合物による STMN1 抑制効果の検証 STMN1 発現 H446 細胞に対して STMN1 PIP 化合物を投与した結果、STMN1 発現は抑制された (図 2)。

図 2



また、蛋白レベルでも STMN1 発現が抑制されるのが確認できた (図 3)。

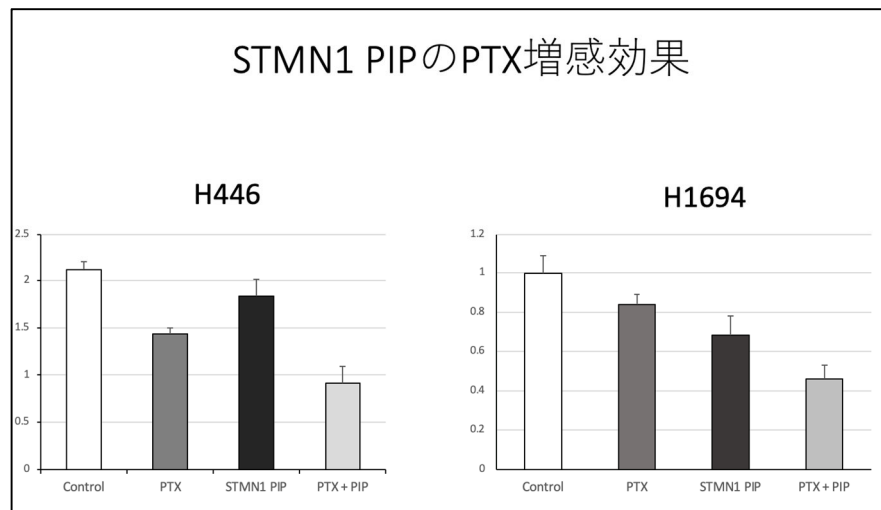
図 3



### 3) STMN1 PIP とタキサン系抗がん剤 PTX の併用効果の検証

H446、H1694 細胞に対して STMN1 PIP とタキサン系抗がん剤 PTX を投与し増殖能を CCK8 アッセイで評価結果、STMN1 PIP に PTX を併用した群で最も増殖能が抑制されており、両者の併用効果を確認することができた (図 4)。

図 4

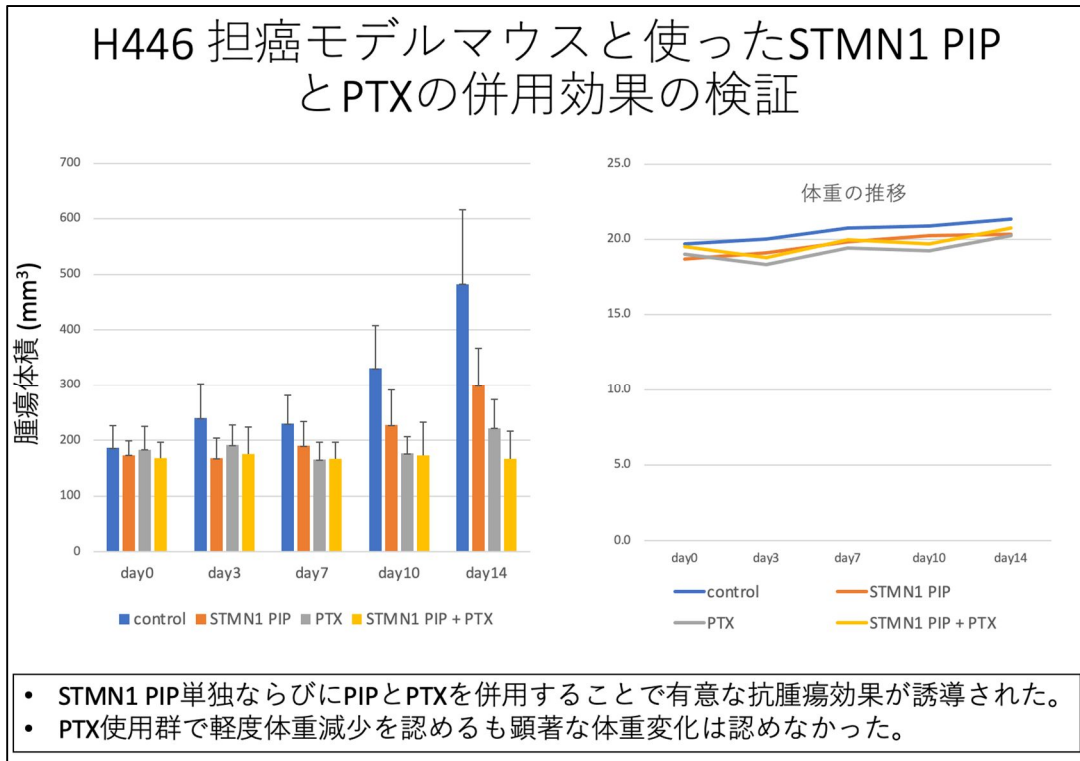


### 動物実験 解析結果

#### 1) HGNET 細胞株 H446 を使用した担癌モデルマウスに対する STMN1 PIP と PTX の併用効果の検証

H446 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、STMN1 PIP と PTX の薬効ならびにその併用効果を検証した。下図に示すように STMN1 PIP と PTX はコントロール群と比較して腫瘍体積は縮小していた。さらに、併用群はさらに腫瘍縮小効果が強いことが確認できた。担癌モデルマウスに対する副作用を評価するために、体重、外観の変化を腫瘍径の評価と並行して実施したが、PTX 使用群で軽度体重減少を認めたのみで顕著な体重減少、外観の変化、治療経過中の死亡個体は観察されなかった (図 5)。

図 5



#### 今後の計画と展望

HGNET 細胞株での STMN1 PIP の薬効評価並びに PTX 併用効果の意義を本研究の成果として報告することができた。現在、他の癌細胞株での動物実験データの再現性を検証した上で論文作成を計画している。さらに、PIP 化合物は抗がん剤を直接結合させることでより高い抗腫瘍効果を発揮することも報告されており、今後は抗がん剤を結合させた STMN1 PIP が HGNET ならびに NSCLC を含む他癌腫に対して有効かを検証する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miura Kentaro, Shimizu Kimihiro, Ide Shogo, Mishima Shuji, Matsuoka Shunichiro, Takeda Tetsu, Eguchi Takashi, Hamanaka Kazutoshi, Uehara Takeshi	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Strategy for the Diagnosis of Pulmonary High-Grade Neuroendocrine Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1945 ~ 1945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/diagnostics11111945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水公裕
2. 発表標題 高悪性度肺神経内分泌腫瘍に対するStathmin1を標的とした新規治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会
4. 発表年 2019年

〔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	矢島 俊樹 (Yajima Toshiki) (20346852)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  (12301)	
研究分担者	横堀 武彦 (Yokobori Takehiko) (60420098)	群馬大学・未来先端研究機構・准教授  (12301)	
研究分担者	中澤 世識 (Nakazawa Seshiru) (60791978)	群馬大学・医学部附属病院・助教  (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	調 憲  (Shirabe Ken)  (70264025)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授    (12301)	
研究分担者	尾林 海  (Obayashi Kai)  (70726249)	群馬大学・医学部附属病院・助教    (12301)	
研究分担者	永瀬 浩喜  (Nagase Hiroki)  (90322073)	千葉県がんセンター（研究所）・がん遺伝創薬研究室・研究所長    (82504)	
研究分担者	渡部 隆義  (Watanabe Takayoshi)  (60526060)	千葉県がんセンター（研究所）・がん研究開発グループ・研究員    (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------