

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18923

研究課題名(和文) 膵癌の新規治療創出を目指したゲムシタピンとmTOR阻害薬の併用効果とその機序

研究課題名(英文) A mechanism how mTOR inhibitor potentiate the effect of gemcitabine against pancreatic cancer

研究代表者

村上 雄一 (Murakami, Yuichi)

九州大学・薬学研究院・共同研究員

研究者番号：60464385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲムシタピンはピリミジンアナログ系抗がん剤であり、膵癌を含め様々ながんに臨床応用されている。治療効果の改善のためにゲムシタピンの併用薬の臨床試験が行われており、エルロチニブや nab-パクリタキセルとの併用による生存期間の延長が示されたがいずれの併用効果も十分ではなく、著名な有効性が期待される治療法が求められている。本研究でゲムシタピンとmTOR阻害剤の併用が相乗的に膵癌の細胞増殖を抑制することを示した。また、そのメカニズムはmTOR阻害剤によるゲムシタピン代謝酵素であるCDAの発現抑制であった。ヒト膵癌に対してゲムシタピンのmTOR阻害剤の併用が有効である可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Gemcitabine, a difluorinated deoxy cytidine analogue, shows clinical activity against various human solid tumors, including pancreas. Clinical application of the gemcitabine-base adjuvant therapy has improved progression-free survival of patients with pancreas cancer. Many clinical trials for gemcitabine-based chemotherapy with various drugs has been applied to patients with pancreas cancer. However, its benefit is modest. In this study, we screened anticancer agents that can potentiate gemcitabine against human pancreatic cancer cells. We found that combination of mTOR inhibitor and GEM synergistically inhibit cell growth in pancreatic cancer cells. We also elucidated mechanism how mTOR inhibitors can augment the cytotoxic effect of gemcitabine. Inhibitor of mTOR induced CDA mRNA expression via stabilization of CDA mRNA. Therefore, mTOR inhibitor might potentiate the therapeutic efficacy of gemcitabine through modification of nucleoside metabolism in pancreatic cancer cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：mTOR Gemcitabine

1. 研究開始当初の背景

- (1) 膵癌の治療は外科的切除とゲムシタピンや TS-1 を中心とした薬物療法が実施されているが、切除不能癌に対するゲムシタピン治療時の生存期間中央値は 9 ヶ月程度と短い。そこで、膵癌患者の治療の改善のために、ゲムシタピンと数多くの薬剤との併用臨床試験研究が行われた。その結果、EGFR チロシキナーゼ阻害薬エルロチニブや、nab-パクリタキセルとの併用が有意な生存期間の延長を示すことが報告された (Moore et al., J.Clin. Oncol., 2007; Von Hoff et al., N. Engl. J., 2013)。しかし、何れの併用も 2 ヶ月以内の生存延長効果しかなく、膵癌患者に対して有意に著明な有効性が期待される治療法が求められている。
- (2) 我々は、ヒト膵癌細胞を用いたゲムシタピンとの併用薬剤のスクリーニングの結果、ゲムシタピンと mTOR 阻害剤の併用はそれぞれの単独処理時と比較して相乗的に殺細胞効果を増強することを観察している。実際に、免疫組織化学染色によりヒト膵癌の癌部位においては mTOR のリン酸化が亢進していることが報告されている (Pham et al., BMC Cancer, 2008)。
- (3) がんでは有酸素条件下における解糖系の亢進いわゆる Warburg 効果など正常細胞とは異なる栄養・核酸の代謝が行なわれており、この特徴的な栄養代謝に mTOR が深く関与していると考えられている。そこで我々は本研究で膵癌の新規治療を創出する上で、mTOR シグナルによるがん核酸代謝の制御とゲムシタピンの代謝系の相互作用に注目した。mTOR 下流シグナルはカルバモイルリン酸合成酵素-2、アスパラギン酸カルバモイル転移酵素、オルニチン脱水素酵素 (CAD) の活性化を誘導し、核酸代謝に関与することが 2 つのグループから報告されている (Robitaille et al., Science, 2013; Ben-Sahra et al., Science, 2013)。また、核酸の代謝に関与するとともにゲムシタピンの解毒にも関与する酵素であるシチジンデアミナーゼ (CDA) の発現と mTOR 阻害剤が関連することが示唆されている。よって mTOR による核酸代謝制御がゲムシタピンの効果に深く関与することが推察される。

2. 研究の目的

ゲムシタピンと mTOR 標的薬との併用が膵癌に対する有効で有用性の高い新規治療法となるのではないかと考え mTOR シグナル系とゲムシタピン関連代謝系との相互作用を把握しゲムシタピン感受性との関連を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

薬剤感受性の測定 (WST 法)

ヒト膵癌細胞を 96well プレートに播種し、次の日に薬剤を処理した。薬剤処理後 37、72 時間 インキュベーター内で静置した。生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク、京都、日本) を各 well に 15 μ l 加えて 37 で 1-2 時間インキュベートし、450nm の吸光度を測定した。この実験は各濃度 N=3 で行い、 \pm SD を算出した。

CDA siRNA の遺伝子導入

CDA siRNA 及び control siRNA は Thermo Fisher Scientific Inc. より購入した。それぞれの siRNA は Lipofectamine RNAi max と Opti-MEM medium を用いて、プロトコールに従って導入した。

薬剤耐性株の樹立

ヒト膵癌細胞株 HPAC 細胞をゲムシタピン含有 RPMI 培地 (ゲムシタピン濃度: 1nM から 1 μ M) を用いて約 6 か月間培養し、耐性株を単離した。

CDA ルシフェラーゼベクターの作成

ヒト血管内皮細胞のゲノム DNA より CDA 遺伝子の 5' 上流域 (-1462 から +41、-416 から +41 及び -183 から +41) を PCR 法を用いて増幅した。3 種の PCR 増幅産物を pGL3-Basic vector (Promega) に挿入することによって CDA プロモーターベクターを作成した。

ルシフェラーゼアッセイ

ヒト膵癌細胞を 12well プレートに播種し、翌日に CDA ルシフェラーゼベクター及び phRL-TK ベクターを Lipofectamine LTX、PLUS reagent、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、プロトコールに従って導入した。24 時間後にエベロリムスを添加し 37、48 時間 インキュベーター内で静置した。ルシフェラーゼ活性の検出は Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) を用いてプロトコールに従って行った。

4. 研究成果

(1) ゲムシタピンと mTOR 阻害剤の併用効果の検討

ヒト膵癌細胞株を用いて mTOR 阻害剤のラパマイシン及びエベロリムスとゲムシタピンとの併用効果について WST 法を用いて検討したところ、ラパマイシン、エベロリムス共にゲムシタピンとの併用時の Combination Index (併用係数) が 1 以下を示し、相乗的に細胞増殖を阻害することが示された。

(2) mTOR 阻害剤による核酸代謝酵素への効果の検討

ヒト膵癌細胞へ mTOR 阻害剤のラパマイシン

ン、エベロリムス、AZD8055 を処理することによって、核酸代謝酵素 CAD のリン酸化の低下が観察された。また、ゲムシタピンの代謝に關与する CDA mRNA の発現を有意に抑制した。

(3)CDA のゲムシタピンの殺細胞効果への關与の検討

CDA はゲムシタピンを不活化するためゲムシタピンの殺細胞効果を抑制すると考えられる。そこで、CDA 発現抑制によってゲムシタピンの感受性が增強するかについて検討した。CDA の siRNA を用いてヒト膵癌細胞株における CDA の発現を抑制したところ、ゲムシタピンの感受性が增強された。

(4)ゲムシタピン耐性株によるゲムシタピンと mTOR 阻害剤の併用効果の検討

膵癌細胞へゲムシタピンを長期暴露することによりゲムシタピン耐性株を樹立した。エベロリムスとゲムシタピンの併用によってゲムシタピンの感受性が相乗的に增強された。このことより、ゲムシタピンの耐性膵癌においてもゲムシタピンと mTOR 阻害剤の併用が有効である可能性が示された。

(5)mTOR 阻害剤による CDA プロモーター活性への効果の検討

mTOR 阻害剤によって CDA の発現が低下するメカニズムを検討するために、エベロリムスによる CDA の転写活性抑制効果についてルシフェラーゼアッセイによって検討した。

CDA の 5' 上流 1462bp までのプロモーターを含む複数のルシフェラーゼベクターを作成した。そして、エベロリムスによる各ベクターに対する転写活性を検討したところ、いずれの長さのプロモーターにおいてもエベロリムスによる転写活性の抑制は認められなかった。

(6)mTOR 阻害剤による CDA mRNA の安定性への効果の検討

mTOR 阻害剤による CDA の転写活性の抑制がみられなかったことから、次に mTOR 阻害剤による CDA mRNA の安定性について検討した。転写阻害剤のアクチノマイシン D の存在下で経時的な CDA mRNA の発現を検討したところ、エベロリムス処理によって CDA mRNA の分解の促進が観察された。

(7)mTOR 阻害剤による microRNA の発現への効果の検討

CDA mRNA の安定性に關与する miRNA として miR-484 が報告されている。そこで、mTOR 阻害剤による miR-484 発現への効果を検討した。ヒト膵癌細胞へエベロリムスを処理することによって CDA の mRNA 発現が低下した一方、miR-484 の発現に変化は認められなかった。

以上の結果よりヒト膵癌において mTOR 阻害剤は CDA の mRNA 分解促進による発現低下を介してゲムシタピンの不活化を阻害し、ゲムシタピンの殺細胞効果を增強することが示された。これらのことより、ヒト膵癌に対してゲムシタピンと mTOR 阻害剤併用が有効である可能性が示唆された。

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 3 件)

1. Watari K, Nishitani A, Shibata T, Noda M, Kawahara A, Akiba J, Murakami Y, Yano H, Kuwano M, Ono M. Phosphorylation of mTOR Ser2481 is a key target limiting the efficacy of rapalogs for treating hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7: 47403-47417. 査読有
2. Kuwano M, Sonoda K, Murakami Y, Watari K, Ono M. Overcoming drug resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors: Learning from lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2016; 161: 97-110. 査読有
3. Maeda M, Murakami Y, Watari K, Kuwano M, Izumi H, Ono M. CpG hypermethylation contributes to decreased expression of PTEN during acquired resistance to gefitinib in human lung cancer cell lines. *Lung Cancer*. 2015; 87: 265-71. 査読有

[学会発表](計 1 件)

村上雄一、渡公佑、柴田智博、河原明彦、鹿毛政義、桑野信彦、小野眞弓. ゲムシタピンと mTOR 阻害剤の併用による相乗的な膵癌の増殖抑制効果のメカニズム 第 74 回日本癌学会学術総会 2015.10.9 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

九州大学大学院薬学研究院創薬腫瘍科学講座ホームページ
<http://shuyo.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 雄一 (MURAKAMI Yuichi)

九州大学大学院・薬学研究院・研究員

研究者番号：60464385