

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592057
 研究課題名 (和文) 多剤耐性関連蛋白を標的にした RNA 干渉による薬剤耐性神経芽腫に対する治療法の開発
 研究課題名 (英文) Suppression of Multi-drug resistance-associated genes in neuroblastoma cell
 研究代表者：
 福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
 大阪大学・医学系研究科・教授
 研究者番号：60165272

研究成果の概要：神経芽腫をはじめとする種々の小児悪性腫瘍臨床例に関し、多剤耐性遺伝子の発現を検討し、化学療法前後で比較した。その結果 MDR1、MRP1 の発現は種々の小児腫瘍で認められ、またその発現は化学療法後の増強し、LRP は化学療法前はいずれの腫瘍にも発現は認められなかったが、化学療法を行うことにより肝芽腫、腎芽腫において発現が新たに出現することが判明した。抗癌剤によりこれら種々の耐性遺伝子が同時に発現亢進するため、これらのうち一つのみを抑制しても抗癌剤の耐性の低下は得られず、期待されるような臨床効果が得られないと考えられ、RNA 干渉による多剤耐性遺伝子抑制の治療への応用は困難であることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：神経芽腫・薬剤耐性・RNA 干渉

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い腫瘍で、乳児期に発生する予後の良い腫瘍から、1歳以上に進行例として発生する予後不良の腫瘍まで多様性に富むことが特徴である。近年の集学的治療の進歩にも関わらず、進行例の治療成績は未だ不良

で、中でも強力な予後不良因子とされる MYCN 遺伝子増幅をもつ症例の救命率は 30%前後である。これら予後不良例の多くは化学療法の初期段階では薬剤に対する反応が良好であるが、治療経過と共に薬剤耐性を獲得することが多く、これが治療成績を悪くする一因と考えられる。

薬剤耐性に関与する蛋白は、multidrug resistance transporter と総称される。これらは、ATP 依存性に薬剤を細胞外に排出する膜蛋白であることから ABC drug transporter とも呼ばれ、化学療法を繰り返すことによって発現が誘導され、腫瘍細胞が薬剤耐性を獲得していくとされる。神経芽腫においては、ABC drug transporter の中でも多剤耐性関連蛋白 MRP (multidrug resistance-associated protein) をコードする MRP1 や MRP4 の発現亢進例が予後不良であることから、薬剤耐性が予後不良の一因であることが裏付けられている。さらに最近の研究により、MYCN 遺伝子産物が MRP1 発現を直接誘導していることが明らかとなってきた。

このことより、MRP を標的とし、その発現を抑制することで腫瘍の化学療法感受性を高め、治療効果を増強することができると期待される。過去にアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて MYCN や MRP1 の発現を抑制する研究が散見されるが、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる遺伝子発現抑制は生体への応用が難しく、いずれも臨床応用には至っていない。

近年特異的かつ効果的に遺伝子発現抑制を行う方法として、RNA 干渉が開発されてきた。RNA 干渉は 1989 年にはじめて線虫において発見され、二本鎖 RNA によってその配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子発現が抑制される現象である。その後この現象は種を超えて観察され、やがて RNA 干渉を誘導する活性化分子は 20 塩基前後の二本鎖 RNA、small interfering RNA (siRNA) であることがわかった。RNA 干渉により効果的な遺伝子発現抑制が可能で、現在では様々な遺伝子に特異的な siRNA が開発されている。我々も RNA 干渉を用い、小児肝癌細胞株において変異して高発現する β カテニン遺伝子の発現抑制

実験を行い、腫瘍の増殖抑制を行うことに成功している。また、RNA 干渉により、MYCN 遺伝子発現を抑制することにも成功している。そこで本研究では、RNA 干渉を用いて、MYCN や MRP 遺伝子の発現抑制を行い、神経芽腫の薬剤耐性を減弱させることにより、神経芽腫細胞の抗癌剤感受性を高め、低用量の化学療法で効果を増強する新しい治療法を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) まず、神経芽腫を初めとする種々の小児悪性腫瘍臨床例において、種々の薬剤耐性遺伝子の発現を調べ、その発現を化学療法前後で比較することにより、化学療法による薬剤耐性出現に関連する遺伝子をスクリーニングする。

(2) 薬剤耐性に関与する遺伝子が見つければ、*in vitro* にてその遺伝子を RNA 干渉により抑制し、化学療法に対する感受性が増加するか否かを調べる。

(3) 薬剤耐性遺伝子の抑制により化学療法剤の感度が増加することが分かれば、*in vivo* にて抑制実験を行い、臨床応用が可能か否かを調べる。

3. 研究の方法

(1) まず、神経芽腫を初めとする種々の小児悪性腫瘍臨床例において、免疫染色を用いて化学療法による薬剤耐性出現に関連する遺伝子の発現をスクリーニングし、化学療法前後で発現を比較した。

(2) 対象

当科で治療を行なった小児悪性固形腫瘍のうち、化学療法の前後で腫瘍組織が得られた 24 例（神経芽腫 8 例、肝芽腫 8 例、Wilms 腫瘍 4 例、横紋筋肉腫 4 例）について検討した。原則として生検時と、化学療法後の腫瘍摘出

時の標本で検討したが、一部化学療法施行後に再発し、摘出された腫瘍についても検討した。化学療法は、概ねグループスタディなどで提唱されている標準的な治療が行なわれたが、進行症例の7例では摘出前に大量化学療法が行なわれていた。腫瘍摘出までの化学療法の投与期間は、3ヶ月未満が7例、6ヶ月未満が8例、6ヶ月以上が9例であった。

(3) 方法

薬剤耐性の発現はパラフィンブロックを用いた免疫組織化学染色（デキストラポリマー法）により検索し、一次抗体として多剤耐性遺伝子 MDR1、MRP1、LRP の遺伝子産物である P-glycoprotein, Multi-drug resistance-associated protein 1、lung resistance-related protein に対するモノクローナル抗体をそれぞれ用いた。発現の程度は腫瘍細胞のみで行い化学療法前の発現の有無、化学療法後の発現増加の有無の両方につき検討した。

4. 研究成果

(1) MDR1 の産物である PGP の発現

神経芽腫は腫瘍細胞に、Wilms 腫瘍では上皮や間質性の成分に発現がみられた。いずれも、化学療法により発現の亢進が見られた。また肝芽腫でも、化学療法後の腫瘍で発現の亢進が認められた（図1）。MDR1 の発現の結果をまとめると、化学療法前は神経芽腫8例中6例、肝芽腫8例全例、Wilms 腫瘍4例中3例、横紋筋肉腫4例中3例に発現が認められた。化学療法後は神経芽腫5例、肝芽腫4例、Wilms 腫瘍の2例、横紋筋肉腫3例において発現の亢進が認められた。

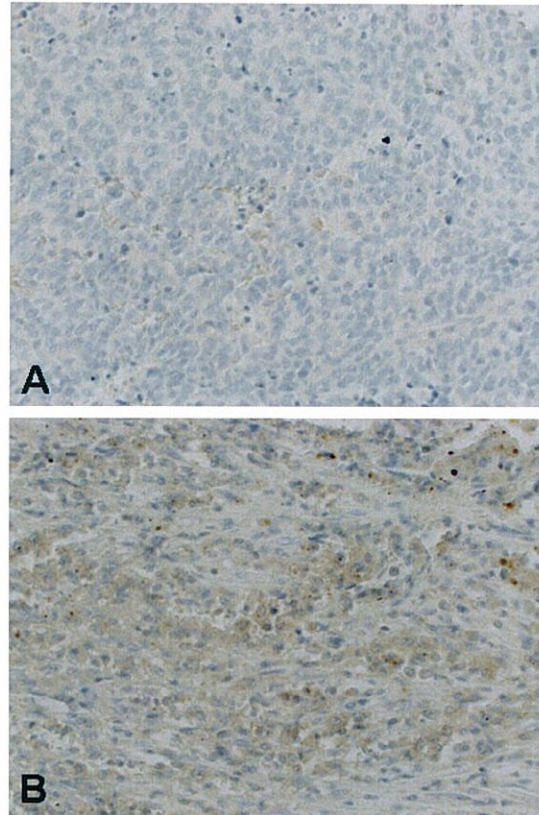


図1 肝芽腫（9ヶ月女児例）における、MDR1/P-gp の発現。A：無治療の腫瘍の生検標本、B：化学療法2コース施行後の摘出腫瘍

(2) MRP1 の発現

神経芽腫では化学療法前に発現がほとんど無く、少数の分化した細胞に発現が認められるのみ（矢印）であったが、化学療法後には散在性に発現が認められた（図2）。肝芽腫、横紋筋肉腫例でも、同様に化学療法後に誘導される症例があった。MRP1 の染色結果をまとめると、化学療法前は神経芽腫3例、肝芽腫1例に発現がみられたのみであったが、化学療法後は神経芽腫7例、肝芽腫4例、横紋筋肉腫3例において発現が認められた。Wilms 腫瘍は発現が認められなかった。

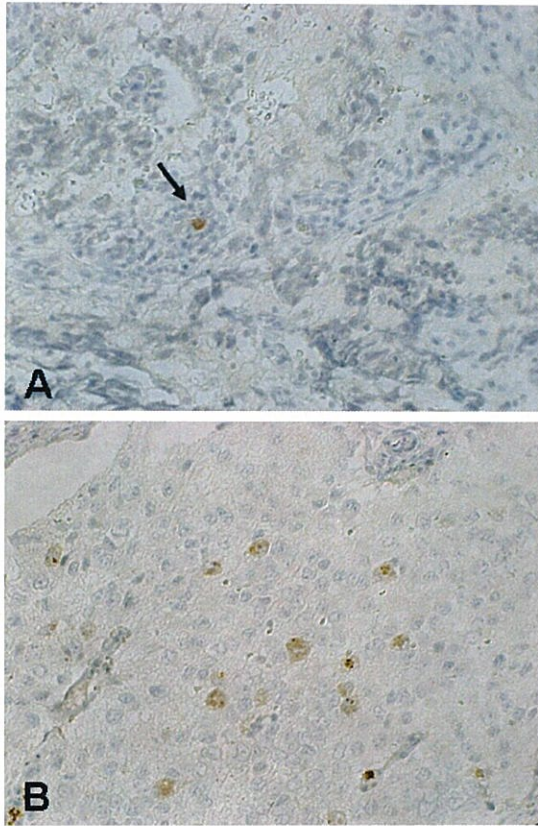


図2 神経芽腫（5 ヶ月女児）におけるMRP-1の発現。A：無治療の腫瘍の生検標本、B：化学療法3コース施行後の摘出腫瘍

（3）LRPの発現

LRPは化学療法前はいずれの腫瘍も発現が認められなかったが、化学療法後では肝芽腫の3例、Wilms腫瘍の1例で発現が認められた。図3に、化学療法後に発現が認められた肝芽腫症例の染色結果を提示する。

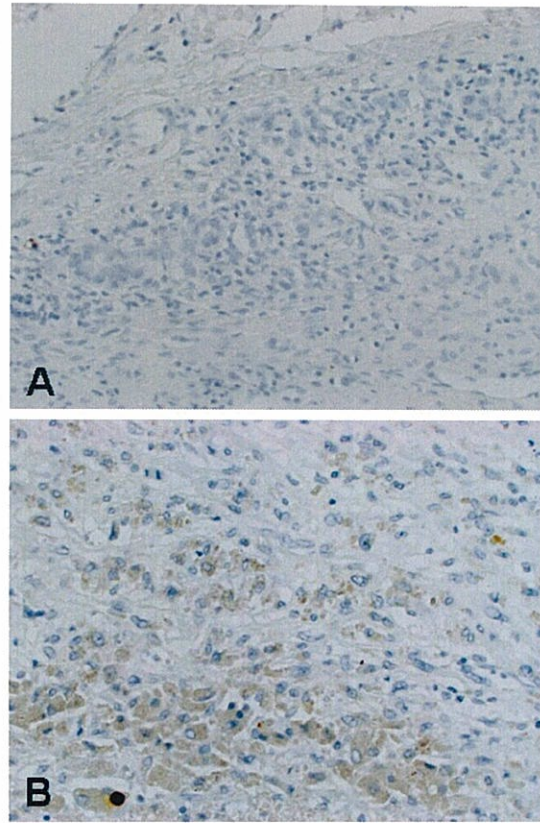


図3 肝芽腫（10歳女児例）における、LRPの発現。A：無治療の腫瘍の生検標本、B：化学療法6コース施行後の摘出腫瘍

（4）薬剤耐性遺伝子の染色結果をまとめ

化学療法前に関しては、発現が少しでも認められた症例数と割合を%で示した（表1）。また、化学療法後に関しては、発現が亢進、あるいは新たに出現した症例数と割合を%で示した（表2）。

MDR1は検討した腫瘍のすべてにおいて、高い確立で発現が認められ、また化学療法により発現が亢進した。MRP1は神経芽腫、肝芽腫で発現が認められ、Wilms腫瘍以外の腫瘍では化学療法により発現の亢進が認められた。LRPは当初は発現が認められないが、化学療法により肝芽腫とWilms腫瘍の一部で発現が認められるようになった。

表 1. 無治療の腫瘍における各薬剤耐性陽性の症例数 (%)

	MDR1/ P-gp	MRP1	LRP
神経芽腫 (8)	6 (75)	3 (38)	0 (0)
肝芽腫 (8)	8 (100)	1 (13)	0 (0)
Wilms 腫瘍 (4)	3 (75)	0 (0)	0 (0)
横紋筋肉腫 (4)	3 (75)	0 (0)	0 (0)

表 2. 各薬剤耐性陽性の発現が化学療法後に増加、あるいは新たに出現した症例数 (%)

	MDR1/ P-gp	MRP1	LRP
神経芽腫 (8)	5 (63)	7 (88)	0 (0)
肝芽腫 (8)	4 (50)	4 (50)	3 (38)
Wilms 腫瘍 (4)	2 (50)	0 (0)	2 (50)
横紋筋肉腫 (4)	3 (75)	3 (75)	0 (0)

(5) まとめ

MDR1 は検討した腫瘍の固有耐性、獲得耐性いずれにも関与すると考えられた。

MRP1 は神経芽腫、肝芽腫の固有耐性と、Wilms 腫瘍以外の腫瘍の耐性獲得に関与すると考えられた。

LRP は肝芽腫と Wilms 腫瘍の耐性獲得に関与することが示唆された。

化学療法中の薬剤耐性の成立には、種々の薬剤耐性遺伝子が同時に関与することが明らかになった。

(6) 考察と今後の展開

次に、神経芽腫細胞株において各薬剤耐性陽性を行うべく、神経芽腫細胞株を抗癌剤入りの培地で継代培養し、また in vivo の実験を行うべくヌードマウスの皮下移植腫瘍を作成した。しかし神臨床例の検討でも判明した

ように、抗癌剤により MDR1、MRP1 など種々の耐性遺伝子が同時に発現亢進するため、これらのうち一つのみを抑制しても抗癌剤の耐性の低下は得られず、期待されるような臨床効果が得られないことが考えられ、RNA 干渉による多剤耐性遺伝子抑制の治療への応用は単独では困難であることが判明した。従って化学療法はこれらの耐性遺伝子が誘導される前に短期集中的に行うことが重要であることが示唆された。今後は化学療法後に摘出した腫瘍でこれら耐性遺伝子を調べることにより、その後の治療への反応性を予測するなどの応用が考えられた。

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は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Que T, Yoneda A, Uehara S, Yamanaka H, Fukuzawa M: Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. J Pediatr Surg. 44:377-80, 2009 査読有り
- ② Tanaka N, Fukuzawa M: MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. Int J Oncol 33: 815-821, 2008 査読有り
- ③ Hashii Y, Kusafuka T, Ohta H, Yoneda A, Osugi Y, Kobayashi Y, Fukuzawa M, Hara J: A case series of children with high-risk metastatic neuroblastoma treated with a novel treatment strategy consisting of postponed primary surgery until the end of systemic chemotherapy including high-dose chemotherapy. Pediatr Hematol Oncol 25: 439-450, 2008 査読有り

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 大植孝治、米田光宏、上原秀一郎、田中夏美、山中宏晃、福澤正洋：小児悪性腫瘍における、抗癌剤治療による多剤耐性遺伝子発現の変化。第23回日本小児がん学会。2007. 12. 14-16、仙台
- ② Takaharu Oue, Akihiro Yoneda, Shuichiro Uehara, Hiroaki Yamanaka, Masahiro Fukuzawa: Increased expression of multidrug resistance-associated genes after chemotherapy in pediatric solid malignancies. 55th British Association of Pediatric Surgeons July 2-5. 2007, Salamanca, Spain
- ③ 米田光宏、奈良啓悟、大植孝治、上原秀一郎、田中夏美、山中宏晃、草深竹志、福澤正洋：神経芽腫分化誘導を目指した分子標的治療モデル。第23回日本小児がん学会。2007. 12. 14-16、仙台
- ④ 上原秀一郎、米田光宏、草深竹志、奈良啓悟、田中夏美、山中宏晃、大植孝治、福澤正洋：INSS 4期神経芽腫に対する局所遅延療法における外科治療。第44回日本小児外科学会。2007. 5. 31-6. 2、新宿
- ⑤ 田中夏美、大植孝治、米田光宏、奈良啓悟、上原秀一郎、山中宏晃、福澤正洋：神経芽腫細胞株の運動能に対する MYCN 発現抑制の効果。第23回日本小児がん学会。2007. 12. 14-16、仙台

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福澤 正洋 (FUKUZAWA MASAHIRO)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：60165272

(2) 研究分担者

大植 孝治 (OOUE TAKAHARU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：50314315

(3) 連携研究者

米田 光宏 (YONEDA AKIHIRO)
大阪府立母子保健総合医療センター・
研究員
研究者番号：30372618