

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790944
 研究課題名（和文）胆道癌における感受性マーカーに基づく GEM+TS-1 併用療法の個別化実現に向けた研究
 研究課題名（英文）In vitro Study aiming the selective GEM+S-1 combined therapy based on the sensitive marker in the biliary tract cancer
 研究代表者
 佐藤 建（ SATO KEN ）
 佐賀大学・医学部・客員研究員
 研究者番号：00448466

研究成果の概要：

胆道癌は手術時に進行例が多く、予後不良の悪性疾患である。従って有効な抗癌剤治療が予後改善には必須となってくる。現在胆道癌に使用されている抗癌剤は 5FU とジェムシタピン(GEM)が主な薬剤であるが、奏効率は必ずしも良好とは言えない。

本研究では、S-1 および GEM 療法あるいは S-1+GEM 併用療法を行うにあたって、S-1(5FU)および GEM の感受性を規定する因子の発現解析を行い、投与前に薬剤効果を予測する個別化抗癌剤治療の臨床実現にむけた基礎的実験を計画した。

まず、胆道癌細胞株 6 株を用いた in vitro 実験を行った。GEM 感受性因子である RRM1 発現は GEM 感受性と有意差を持って相関した。一方、5FU 感受性因子である TS,DPD,OPRT 発現とは相関関係を認めなかった。そこで本研究の主眼を RRM1 発現に絞り、解析を進める事とした。胆道癌で手術を行い、その後再発をきたし GEM 治療を行った症例を対象に組織中 RRM1 発現解析を行った。さらに、組織中 RRM1 発現を定量的に解析し、GEM の効果と比較・検討した。本結果は、RRM1 を指標とした GEM 個別化抗癌剤治療の実現へ繋げる重要な知見を見いだしたと思われる。

しかしながら、当初企画していた S-1 感受性因子解析は予想に反し、感受性因子との相関が得られなかった。したがって S-1+GEM 併用療法の個別化実現の基礎的知見を完全に得ることはできなかった。

今後は胆道癌組織を用いた S-1 感受性因子のタンパク解析を行う必要があると考えている

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,000,000	0	3,000,000
2008 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	30,000	3,130,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胆道癌、ジェムシタピン、S-1, RRM1, TS, OPRT, DPD, 個別化治療

1. 研究開始当初の背景

胆道癌に対する抗癌剤治療には、ジェムシタピン(GEM)および5FUが2大薬剤として臨床使用されている。しかしながら奏効率は必ずしも高いとはいえない。GEMの薬剤感受性を左右する因子として肺がん細胞株の研究より、DNA合成に關与するRRM1高発現とGEM耐性が報告され、5FU感受性では、TS高発現、DPD高発現、OPRT低発現が5FU耐性に重要であることが、種々の研究により証明されている。しかしながら、胆道癌についての研究はなされていない。

2. 研究の目的

胆道癌細胞株を用いて、RRM1とGEM感受性との相関関係を解析する。さらにTS、DPD、OPRTと5FU感受性との相関解析を行い、それぞれの感受性マーカーとしての意義を検討する。さらに、5FU+GEM併用における効果判定にそれぞれの感受性マーカーの果たす意義を検討する。

3. 研究の方法

(2007年度)

6種類の胆道癌細胞株を用いて、GEM感受性、5FU感受性をMTT法にて解析する。RRM1、TS、DPD、OPRTのRT-PCRを行い、それぞれの感受性マーカー発現量とMTTによって算出される感受性(IC50)の相関解析を行う。胆道癌にて手術後再発を来した症例12例にGEM治療を行った。この症例の切除標本を用いてRRM1の免疫組織染色を行い、RRM1発現とGEM効果の相関を解析した。

(2008年度)

胆道癌細胞株および切除標本を用いて、RRM1タンパク発現を発現の有無で評価するのではなく、発現量を定量的蛍光免疫染色法(qDFIHC)にて定量解析し、IC50および患者予後との相関解析を行った。

4. 研究成果

(2007年度) RRM1のmRNAおよびタンパク発現量とGEMに対するIC50に有意な相関関係が得られた。

下図：6種類の胆道癌細胞株におけるRRM1タンパク発現量(western blotにて測定、GEM感受性(IC50)との相関を解析した。その結果、RRM1発現量に比例してGEM耐性が上昇することが明らかとなった。

QuickTimey C2
TIFF (PackBits) 8LiEVEcEOEaEA
Ç™Ç±ÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇZÇ%Ç...ÇÖIK6vÇ-Ç AB

さらにRRM1発現をsiRNAを細胞内導入、RRM1発現を抑制し、GEM感受性の変化をMTT法にて解析した。その結果、RRM1発現をsiRNAにて抑えるとGEM感受性が増強した。この結果より、胆道癌細胞におけるRRM1発現はGEM感受性と逆相関することが示唆された。

下図：RRM1タンパク発現はRRM1 siRNA導入により抑制された。

QuickTimey C2
TIFF (PackBits) 8LiEVEcEOEaEA
Ç™Ç±ÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇZÇ%Ç...ÇÖIK6vÇ-Ç AB

下図：siRNA導入後、GEM感受性をMTTにて解析するとsiRNA導入株はGEM感受性が増強していた。

QuickTimey C2
TIFF (PackBits) 8LiEVEcEOEaEA
Ç™Ç±ÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇZÇ%Ç...ÇÖIK6vÇ-Ç AB

しかしながら、TS、DPD、OPRTのmRNA発現しかしながら、5FUの感受性マーカーであるTS、DPD、OPRT発現とIC50とは有意な相関を認めなかった。

次に胆道癌にてGEM治療を受けた患者12例を対象に、切除組織におけるRRM1タンパク発現を免疫組織染色で評価し、奏効率との相関を解析した。その結果RRM1発現が強陽性であればGEM不応性であることを明らかにした。

下表：胆道癌にて切除手術を受けた後、再発しGEM治療を行った12名の患者を対象に切除標本におけるRRM1発現を免疫染色により評価し、再発腫瘍のGEM治療効果を比較した。RRM1発現がstrongを示した症例にはPD(憎悪)を3例認めしたが、発現weak症例にはPD例を認めなかった。

expression	Strong	Weak
PR	1	4
SD	2	2
PD	3	0

2007 年度に得られた結果は、2008 年度に論文にて報告した。

(2008 年度)

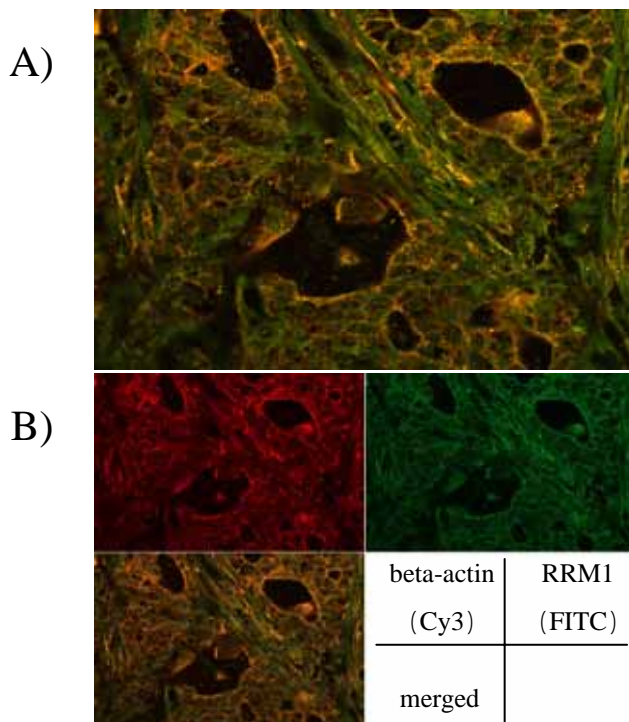
切除組織をもちい実際に RRM1 発現に応じた GEM 投与をさらに実現化することを目的に、RRM1 タンパク発現を従来の免疫組織染色法による定性解析ではなく、定量的に解析できる qDFIHC 法にて解析した。

細胞株において RRM1 mRNA 量とタンパク発現量は有意に相関しており、本法によるタンパク発現量解析が正確であることを立証した。

さらに GEM 治療を受けた再発胆道癌患者の切除癌組織における RRM1 タンパク発現量を qDFIHC 法にて算出し、患者予後との相関関係を解析したところ、RRM1 発現は予後不良の傾向を示し、RRM1 発現が GEM 耐性に働くことを示した。

下図：切除組織の定量的蛍光 2 重免疫組織染色 (qDFIHC) 法による RRM1, b-actin の 2 重免疫染色例を示す。

RRM1 発現 (green) と b-actin (red) を共焦点傾向顕微鏡にて蛍光強度を測定後、RRM1/b-actin を算出し、RRM1 発現量を決定した。



今後は、本研究で得られた知見をもとに RRM1 発現量を指標とした GEM 治療の個別化の前向き試験に繋げていきたい。また、5FU の感受性マーカーである TS, DPD, OPRT に関しては mRNA では感受性との相関は得られなかったが、qDFIHC によるタンパク発現量解析を行い、再度相関解析を行う必要があると思われる。今後は、この結果をもとに RRM1 タンパクおよび TS, DPD, OPRT タンパク発現を指標とした胆道癌 GEM+5FU 併用療法の個別化のモデル作りを計画したい。

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)

K Ohtaka, N Kohya, K Sato, Y Kitajima, T Ide, M Mitsuno, K Miyazaki. RRM1 is a possible chemoresistance marker to gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Oncology Reports* 20 (2), 279-286, 2008

[学会発表](計1件)

中村 淳、神谷尚彦、北島吉彦、佐藤 建、宮崎耕治。胆道癌における GEM 感受性マーカーの検討。日本外科学会総会。平成20年5月16日(於：長崎市)

[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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 建 (SATO KEN)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00448466

(2)研究分担者

(3)連携研究者