

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19890122
 研究課題名（和文） 肝胆膵領域悪性腫瘍の化学療法抵抗性に対するアポトーシスの役割
 研究課題名（英文） Apoptosis related chemoresistance in hepato-biliary-pancreatic cancer
 研究代表者
 小林 省吾（KOBAYASHI SHOGO）
 大阪大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：30452436

研究成果の概要：化学療法抵抗性とアポトーシスの関連性について、GEM(ゲムシタピン)と5FU系薬剤を中心に検討を行ったところ、胆道癌ではGEM抵抗性とアポトーシスが関連していることが明らかになった。これについてメカニズム解析を行い、関連候補蛋白を探った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：医歯薬学

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：癌、化学療法抵抗性、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年の抗腫瘍剤の開発により悪性腫瘍の治療成績が向上しているにもかかわらず、原発巣によっては奏効率は20%にとどまる。特に胆道系悪性腫瘍に対する化学療法には有効なものが見いだされていない。また、一度奏功したとしても、次第に抵抗性を獲得する場合もある。この化学療法抵抗性のメカニズムとしては、化学療法剤が悪性腫瘍細胞に働きかける時点で抵抗性が生じる場合と、働きかけてアポトーシスを誘導する時点で抵抗性が生じる場合に分かれると考えている。

教室では化学療法抵抗性の強い肝胆膵領域悪性腫瘍を中心に研究を進めてきたが、これらの悪性腫瘍は Pro survival pathway が亢進しており、アポトーシス抵抗性が強いということがわかって来た(Kurokawa Y Clin Cancer Res 2004, Yamamoto T Clin Cancer Res 2004, Nakamura M J Hepatol 2006, Kobayashi S Gastroenterology 2005, Kobayashi S JBC 2007)。特に研究者は胆道系悪性腫瘍細胞を用いて TRAIL 抵抗性は IL-6 を介した Pro survival signal によるとの報告をした(Kobayashi S Gastroenterology 2005)。

アポトーシスは内因性もしくは外因性ス

トレスに応答して起こる細胞死であり、ミトコンドリアを介する系とそうでない系が存在する。これまでの研究者の行ってきた研究は TRAIL, FasL を中心とした外因誘導性のアポトーシスとその抵抗性の検討であった。そして、様々な細胞増殖因子に刺激され、こうしたアポトーシス抵抗性が増強され、最終的に外因刺激のアポトーシスから回避するということを証明している。

さてその一方で、化学療法は代表的な内因性アポトーシスの誘導剤であり、そのシグナルはミトコンドリアを介して誘導されると考えられている。そこで研究者らは、「外因誘導性のアポトーシスと同様、化学療法のような内因誘導性のアポトーシスであっても、細胞内外増殖因子の刺激によりそのアポトーシス抵抗性が増強される、すなわち化学療法抵抗性はこのメカニズムによって増強する」といった仮説を立て、この研究を計画した。

2. 研究の目的

研究者は、アポトーシスと化学療法抵抗性因子の関連性に着目し、前述のように「腫瘍を pro survival に導く細胞内外因子が、アンチアポトーシスファクターを増強させることにより、化学療法による抵抗性を増強している。」という仮説を立て、それを証明するために研究を進めている。

研究の目的としては下記のように定め、研究を遂行した。

1. 癌細胞株数種（肝胆膵領域の癌細胞 8 種とそれ以外の部位の癌細胞 2 種（肺・胃））を用いて、化学療法抵抗性とアポトーシスの関連性の証明を行うことを目的とした。

2. 化学療法抵抗性関連性のアポトーシス因子（特に Bcl2 ファミリーと Caspase, IAP ファミリーに関して）と Prosurvival 細胞内外因子（特に経路として Akt/PI3K, MAPK, Stat に関して、細胞外因子として VEGF, EGF, IL6 などに関して）の同定を行うことを目的とした。

3. Prosurvival 細胞内外因子の特異的阻害剤または siRNA を用いた制御とそれによる化学療法抵抗性の失効に関する検討を行うことを目的とした。

4. これらのファクターの変化を総合し、検討を行い、メカニズムに関してその解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学療法抵抗性について、合計 9 種類の癌細胞株（肝胆膵系悪性腫瘍細胞を中心に肺癌、胃癌など）を用いて、薬剤としてゲム

シタピン(GEM)と 5FU などを用いて MTT assay を行い、IC50 を計算し、化学療法抵抗株、感受株の同定を行い、また、研究で用いるための指摘抗癌剤濃度を決定した。

(2) 同定された化学療法抵抗株と感受株についてアポトーシスアッセイを行い、化学療法抵抗性とアポトーシスとの関連性についての検討を行った。

(3) 化学療法抵抗性に関するアポトーシス関連蛋白を探るために、それぞれの細胞株について、Bcl2 ファミリー蛋白、caspase、IAP、などのアポトーシス関連蛋白の発現とそのリン酸化状況、活性を各種条件下において Immunoblotting を行い、検討を行った。

(4) 同様に細胞内外の Prosurvival signal (IL-6 stat, EGF, VEGF, NF-kappaB, CREB) の系についてそのレセプターの発現と下流の蛋白の発現とリン酸化などについて Immunoblotting を行い、候補となる prosurvival signal の同定を行った。

(5) 該当する prosurvival signal の制御を行い、化学療法抵抗性が失効するかどうかの検討を行った。

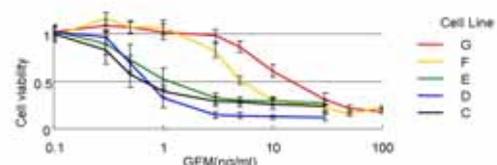
4. 研究成果

まず、肝胆膵領域の癌細胞 8 種 (HuCCT1, CCLP1, KMBC, MzChA1, KMCH1, HuH7, Miapaka, HLE) とそれ以外の臓器の癌細胞 2 種 (肺・胃/MKN28, A549) における化学療法抵抗性の検討を行った (図 1)。

1. Gem IC50 in cholangiocarcinoma cell lines (MTT assay)

Cell line	C	D	E	F	G
Gem (ng/ml)	0.5-0.9	0.7-0.9	0.7-2.1	4.8-6.0	13.4-21.6

Gem treatment 96hr



抗癌剤としてはゲムシタピン (GEM) と 5FU を用いて、評価は MTT アッセイで行った。その結果、胆道癌細胞株では 2 種類が抵抗株であり、3 種類が感受株であった。他の癌種ではほとんどが抵抗株であった。この結果に基づき、胆道癌化学療法抵抗性とアポトーシスの関連性について探ったところ、感受株では 1 種、抵抗株では両者が化学療法抵抗性との関連性が認められた。

同時に細胞株自体の蛋白発言のプロファイルとして Immunoblot による解析を行った。Bcl-2 ファミリーでは、Proapoptotic signal としての Bak, Bax に差は認められなかった。しかしながら、anti-apoptotic protein では各細胞間（抵抗株、感受株）にその発現に差が認められ、アポトーシスとの関連性も示唆された。図 2 に一例を示す。

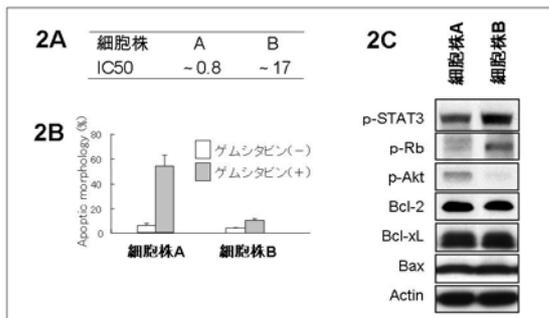


図 2 ゲムシタビン感受性の異なる胆道癌細胞株AとB(2A)はアポトーシスとの関連性があり(2B)、それはBcl2ファミリーではなく、RBやStatを介したProsurvival Pathwayの活性化と関連がある可能性がある(2C)。

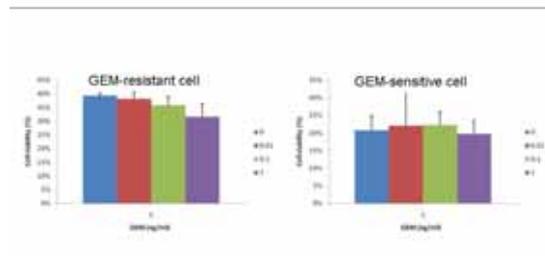
感受株としての細胞株 A は B と比較してゲムシタビンによるアポトーシス誘導が顕著であった。Immunoblot による蛋白発現の検討を行ったところ、Bcl-2 ファミリーの中では Mcl-1 の発現に差が認められた。

仮説では、こうした anti-apoptotic effect は cell survival signal により引き起こされるとしている。そこで、Immunoblot により同細胞株における cell survival signal の発現の検討を行ったところ抵抗株では pAkt ではなく、pStat, pRB などが亢進しており、これらのシグナルの化学療法抵抗性への関与が示唆された。特に、RB の関与については今後も引き続き検討を行う予定である。

またその一方では、正確には細胞増殖因子ではなく、炎症性サイトカインに属するが、胆道癌細胞では IL-6 が分泌されており、また、IL-6 レセプターが発現していること、また、IL-6 の刺激により細胞増殖が認められることから、IL-6 の auto-paracrine システムが細胞の増殖に関与しているといわれている。

そこで市販されている anti-IL-6 receptor antagonistic antibody を用いて、ゲムシタビン感受性を高めるかどうかの検討を行った(図3)。細胞株としては前述とは別の GEM の感受株と抵抗株を用いた。IL-6 receptor

のブロック下に GEM を作用させることでその反応性を検討した。まず、GEM 感受株では GEM による抗腫瘍効果の方が大きく、抗 IL-6 抗体による効果は認められなかった。次に GEM 抵抗株で同様の検討を行ったところ、抗 IL-6 抗体による GEM の抗腫瘍効果の増強が認められた。現在は、至適投与方法を探るとともに、Immunoblotting による Stat のリン酸化への影響などを検討している。



まとめると、

(1) 各種癌細胞株で、化学療法抵抗性とアポトーシスの関係、Cell survival signal の影響などの検討を行った。

(2) Bcl-2 ファミリーのうち、pro-apoptotic protein よりも anti-apoptotic protein がそれらに関与している可能性が高いことがわかった。

(3) いくつかの cell survival signal が化学療法抵抗性に影響している可能性が示唆された。

(4) また、そのうちの経路の一つとして IL6 の関与も示唆された。

今後は、これらの結果から、IL6 の化学療法抵抗性に関与するメカニズムの解析や、RB の関与について検討を行っていく予定である。これらのいくつかの Pathway での臨床応用されている薬剤があり、今後の癌に対する化学療法として新しい展開をもたらすもの考える。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

小林省吾.:胆道癌における I L 6 オート
パラクラインシステムと T R A I L 抵抗
性に関する検討.:第 1 5 回外科侵襲とサ
イトカイン研究会.:2008.12.13 (岩手)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 省吾 (KOBAYASHI SHOGO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30452436

(2)研究分担者

(3)連携研究者