

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08449

研究課題名（和文）胆道癌におけるCK2阻害薬感受性マーカーの同定と薬剤抵抗性機序の解明

研究課題名（英文）Identification of sensitization markers and elucidation of drug resistance mechanism for a CK2 inhibitor on cholangiocarcinoma

研究代表者

宮部 勝之（Miyabe, Katsuyuki）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：00543985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：SilmitasertibおよびGEM+CDDPを投与されたマウス、GEM+CDDPを投与されたマウス、コントロールのマウスより得られたxenograftからDNAを抽出しExome sequenceを行い、遺伝子変異などの違いを調べたところ、GEM+CDDPとGEM+CDDP+Silmitasertibの比較においてPGLYRP2、PCDH86などの遺伝子増幅も明らかにされた。in vitroの実験を行うため、薬剤耐性株の作成を行っていたがうまくいかず、in vivoでの検体から得られたデータをもとに解析を行い、薬剤耐性機序を明らかにしていくよう、研究を継続していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CK2阻害剤Silmitasertibの薬剤抵抗性獲得に寄与する機序を検討した。すでにSilmitasertibを投与されたサンプルおよび投与されていないサンプルとの比較をすることにより、薬剤耐性に関わる遺伝子を探り出すことができた。Silmitasertibは近年胆管癌の治療に有望な分子標的薬として注目されており、一部の胆管癌患者の予後を延長するものと期待されている。その薬剤耐性機序を探るうえでのヒントを見つけ出すことにより、本阻害剤が実際の患者に投与され、耐性となった際の次の治療戦略を考える上で、本研究が重要な意義を果たすものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Exome sequencing was performed on DNA extracted from xenografts obtained from mice treated with Silmitasertib and GEM+CDDP, mice treated with GEM+CDDP, and control mice. Differences such as genetic mutations were investigated, and gene amplification of PGLYRP2 and PCDH86 was also revealed in the comparison between GEM+CDDP and GEM+CDDP+Silmitasertib. Although attempts were made to create drug-resistant strains for in vitro experiments, they have been unsuccessful so far. Therefore, further analysis based on data obtained from in vivo specimens will be continued to elucidate the mechanism of drug resistance.

研究分野：消化器内科 胆道・膵臓分野

キーワード：胆管癌 Silmitasertib CK2阻害薬 薬剤抵抗性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Silmitasertib (CX-4945) はセリン・スレオニンキナーゼの一種である CK2 の阻害薬であり、経口摂取可能な上、CK2 subunit の ATP 結合部位に競合的に作用することで、主に PI3K/Akt pathway のリン酸化を阻害し腫瘍増殖を抑えるとともに、GEM や CDDP の耐性を司る DNA 修復酵素 MDC1 および XRCC1 のリン酸化をも阻害し、抗がん剤感受性を増強させる効果も併せ持つ(Mol Cancer Ther2012;11:994-1005, 図1)。申請者が施行した前臨床試験にて、Silmitasertib が GEM+CDDP への上乗せ効果を認めただ一方で、投薬経過中に薬剤耐性の獲得が観察された。しかし、Silmitasertib 効果予測に有用なバイオマーカーは何か、また本薬剤耐性にはどのような機序が関与しているのかは明らかにされておらず、これらの問いを解明することで次なる治療法を模索し、確立する必要があると考えた。

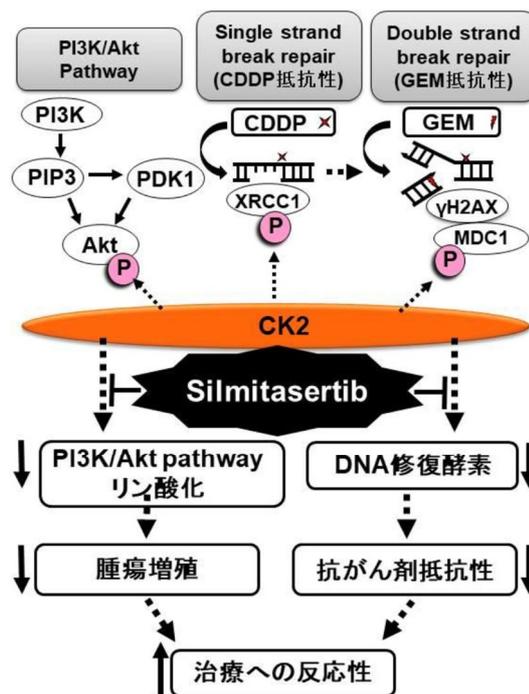


図1: Silmitasertib投与によりPI3K/Akt pathwayのリン酸化阻害と共に、DNA修復酵素のリン酸化を阻害することで抗がん剤抵抗性を減弱させ、治療への反応性を高める。

2. 研究の目的

CK2 阻害薬は肺癌、卵巣癌、白血病などで検討されてきたが、近年胆管癌においてもその有用性が指摘されるようになってきた。胆管癌における新薬 Silmitasertib の使用は腫瘍増殖を抑えるだけでなく GEM+CDDP 耐性も抑える効果が期待され、Silmitasertib 耐性機序の解明を、signal pathway の面からだけでなく、DNA 修復酵素の面からも追求することで、他疾患への応用・発展や Silmitasertib 独自の効果予測判定バイオマーカーとなりうる因子も同定可能であるとともに、シークエンスデータを用いた免疫チェックポイント阻害薬使用可否の判定への応用も期待できると考えている。

3. 研究計画

胆管癌細胞株として、CK2 蛋白高発現を示す HuCCT1 もしくは他の CK2 蛋白高発現を示す胆管細胞癌株を使用した。

(1) Xenograft を使用し次世代シーケンサーを使用することにより薬剤耐性遺伝子変異の候補を検出する。

- (2) Silmitasertib 耐性細胞株を作成する。
- (3) ピックアップされた多数の候補遺伝子異常を実際に Silmitasertib 耐性細胞株から除去することにより、薬剤感受性を回復するかを検証し・確認する。
- (4) (2)で作成した細胞株、および Silmitasertib 耐性 xenograft 上の候補遺伝子変異の存在を実際に確認する。
- (5) 胆管癌細胞株に対し、(1)から(4)で同定した薬剤耐性遺伝子を実際に導入し、Silmitasertib 耐性を評価する。
- (6) (5)で作製した胆管細胞株をヌードマウスに皮下移植し、control 群と Silmitasertib 投与群との比較にて Silmitasertib 耐性を評価する。
- (7) (2)で作成された Silmitasertib 耐性細胞株に対し、同定されたターゲット因子を制御する pathway の分子標的薬を Silmitasertib と併用投与し、追加した分子標的薬の効果を確認する。

4 . 研究成果

(1) 申請者が施行した前臨床試験(Translational Oncology 12(1): 143-153)施行時に作成された Silmitasertib 投与後と control 群の xenograft を用いた Exome sequencing を、Mayo Clinic 内にある施設に委託して施行・比較することで、薬剤耐性関連遺伝子の候補同定を実施した。

xenograft から non-human content を取り除き、まずは germline variant をピックアップ、その後 somatic variant を同定することを試みた。

Control 群、GEM+CDDP + Silmitasertib3 剤投与群から、それぞれ3検体ずつ選択肢し DNA を抽出、Exome Sequence を行った。Xenograft 作成に使用した胆管細胞株は HuCCT1 であった。

Variant 遺伝子の判定には、CAVA (Clinical Annotation of Variants) database にて impact が moderate もしくは high のもの、あるいは、ClinVar database にて pathogenic あるいは likely pathogenic と判断されている遺伝子 variant を拾い上げた(図 2)。9 検体いずれからも 600 種類以上の遺伝子、700 種類以上の variant が検出され、また検体

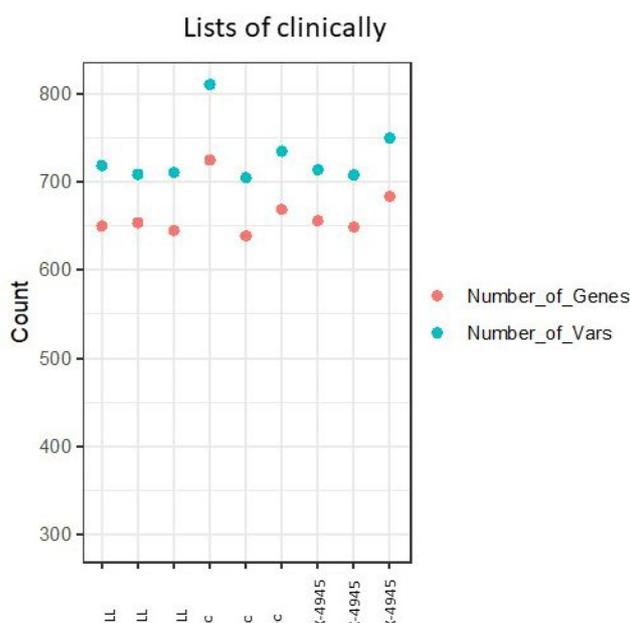


図 2 : 前臨床試験で作製された xenograft を用いて行った exome sequence にてそれぞれの検体から検出された遺伝子数と variant の数。NULL はコントロール群、g+c は Gemcitabine + Cisplatin 投与群、g+c+cx-4945 は Gemcitabine + Cisplatin+Silmitasertib 投与群。

の quality は妥当であった。

そこで、薬剤投与群において有意に高発現している pathway があるかどうかを検討したところ、Acute Phase Response Signaling のみ、Gemcitabine + Cisplatin 投与群および Gemcitabine + Cisplatin+Silmitasertib 投与群にてシグナルが増幅した傾向を認めたが、 $p < 0.05$ の有意差を持った増幅は見いだせなかった。

次にそれぞれの xenograft において、遺伝子増幅もしくは減弱のみられた遺伝子の同定を試みた。Xenograft にて遺伝子解析をする際の問題は、増幅された遺伝子が宿主であるマウスの遺伝子変異なのか、xenograft 由来の人による遺伝子変異なのかの同定が困難なことである。この問題を解決するために、R パッケージの一つである XenofilteR (BMC Bioinformatics volume 19, Article number: 366, 2018)を使用し、99%以上のマウス由来の sequence read を除去して、解析を行った。

この結果(図3)、Gemcitabine + Cisplatin 投与群と Gemcitabine + Cisplatin+Silmitasertib 投与群との比較において、Silmitasertib 投与が加わることにより遺伝子 A、遺伝子 B、遺伝子 C という3種類が増幅している一方で、遺伝子 D、遺伝子 E という2種類が減弱していることが判明した。

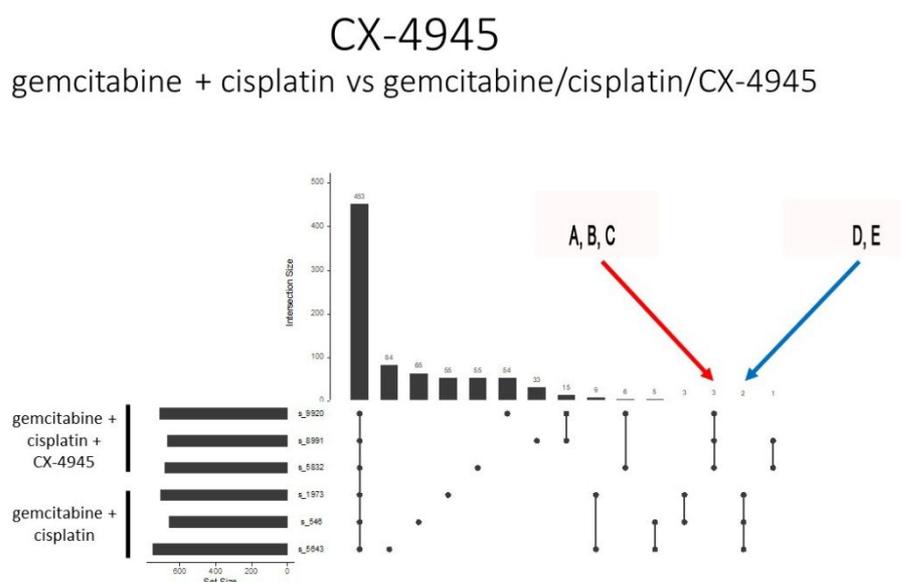


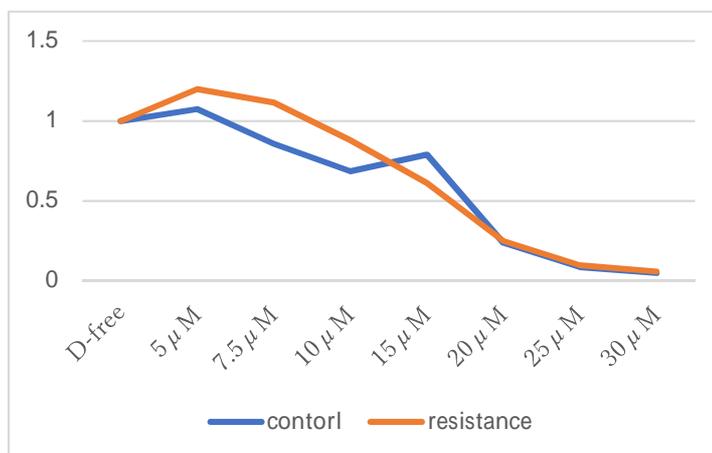
図3 : CX-4945 (Silmitasertib) 投与による遺伝子増幅・減弱の3群間比較結果

(2)CX4945(Silmitasertib)耐性株作製には遺伝子操作が容易な HuCCT1 を使用した。薬剤耐性細胞株には種々あるが、今回は我々の施設で行われている方法すなわち、各種細胞株に $0.1 \mu M$ の Silmitasertib から投与を開始後、繰り返し Silmitasertib の濃度を倍増させて細胞継代し耐性株を作成する方法を行い、薬剤耐性は cell viability assay にて確認した。

耐性株作成過程では、プレート内に細胞が confluence になった後、回収し細胞数を減ら

して新しいプレート継代、Silmitasertib 濃度を 0.1 μ M 0.2 μ M 0.4 μ M と徐々に増量していった。しかしながら、**図 4** : cell viability assay

Silmitasertib 濃度が 16 μ M 程度まで増加させると、HuCCT1 が死滅してしまい、薬剤耐性獲得株の作成に難渋した。Silmitasertib 濃度を減らして細胞増殖後継代を繰り返し、半年以上 Silmitasertib を含んだメディアウムにて培養した細胞を使用し、Silmitasertib 投与後 48 時間経過時点での cell viability assay



を行った結果が**図 4**の結果である。10 μ M 投与までは、薬剤耐性を獲得した可能性があるが、それ以上の濃度では IC50 に差がでないため、残念ながら十分な Silmitasertib 耐性株は現在のところ作成できていない状況である。したがって、上述した研究計画で、(3)、(4)、(7)は Silmitasertib 耐性株を使用する過程であるため、まだ実行できていない。今後、細胞株を変更するもしくは今まで Silmitasertib 含有メディアウムにて継代し続けた HuCCT1 細胞株を使用し、研究を行うことを予定している。

(5) 同定された遺伝子変異の内、遺伝子 A と D は RNA ポリメラーゼ の転写への関与、遺伝子 B はペプチドグリカンを不活化する作用に関連しており、遺伝子 C はカルシウム依存性細胞接着蛋白に関連しており、遺伝子 E は膜貫通輸送に関連していると考えられている。特に遺伝子 A は大腸がんの予後との関連も報告されている。このため、胆管癌細胞株 HuCCT1 もしくは CK2 蛋白高発現を示す、EGI-1、Mayo Clinic で作成された肝内胆管癌 primary cell である LIV27 を使用し、本来 A-E の変化について、樹立した Silmitasertib 耐性株を用いて発現検証のうえで合致するものを中心に Transfection 実験を行う予定であった。

(6) (5)にて Silmitasertib 耐性に関与する遺伝子を見出した後、遺伝子を導入した細胞株をマウスに皮下移植し xenograft を作成、Silmitasertib を投与することで、薬剤耐性遺伝子をもたない細胞株を皮下移植した xenograft に比較して腫瘍増殖能に変化が見られるかどうかを検討する予定であったが、*in vivo* の研究が期間内に完了しなかったために施行できていない。

(7) (6)と同様、*in vivo* の研究が期間内に完了しなかったために施行できていないものの、(1)から(6)にて同定された薬剤耐性遺伝子に対する分子標的薬を購入できればそれを Silmitasertib 耐性株に投与し、腫瘍縮小がみられるかどうかを検討できることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Asano Go, Miyabe Katsuyuki, Kato Hiroyuki, Yoshida Michihiro, Sawada Takeshi, Okamoto Yasuyuki, Sahashi Hidenori, Atsuta Naoki, Kachi Kenta, Kato Akihisa, Jinno Naruomi, Natsume Makoto, Hori Yasuki, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki, Matsuo Yoichi, Takahashi Satoru, Suzuki Hiromu, Kataoka Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 Relevance of gene mutations and methylation to the growth of pancreatic intraductal papillary mucinous neoplasms based on pyrosequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-04335-z	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 -

1. 著者名 Toyohara Tadashi, Nakazawa Takahiro, Zakharia Kais, Shimizu Shuya, Miyabe Katsuyuki, Harada Kenichi, Notohara Kenji, Yamada Tomohiro, Hayashi Katsumi, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki, Kataoka Hiromi	4. 巻 60
2. 論文標題 IgG4-related Sclerosing Cholangitis Complicated with Cholangiocarcinoma and Detected by Forkhead Box P3 Immunohistochemical Staining	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5920-20	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 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Hori Yasuki, Yoshida Michihiro, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Over-the-scope-clip treatment for perforation of the duodenum after endoscopic papillectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 VideoGIE	6. 最初と最後の頁 101 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vgie.2020.10.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe Katsuyuki, Notohara Kenji, Asano Go, Kato Akihisa, Jinno Naruomi, Natsume Makoto, Hori Yasuki, Yoshida Michihiro, Naitoh Itaru, Tsuboi Ken, Matsuo Yoichi, Ohara Hirotsuka, Hayashi Kazuki, Kataoka Hiromi	4. 巻 60
2. 論文標題 Early Detection of High-grade Biliary Intraepithelial Neoplasia (BillIN-3) in the Cystic Duct Visualized by SpyGlass DS Cholangioscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 47 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5072-20	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyohara Tadashi, Nakazawa Takahiro, Zakharia Kais, Shimizu Shuya, Miyabe Katsuyuki, Harada Kenichi, Notohara Kenji, Yamada Tomohiro, Hayashi Katsumi, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki, Kataoka Hiroki	4. 巻 60
2. 論文標題 IgG4-related Sclerosing Cholangitis Complicated with Cholangiocarcinoma and Detected by Forkhead Box P3 Immunohistochemical Staining	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5920-20	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Michihiro, Kato Akihisa, Hayashi Kazuki, Naitoh Itaru, Miyabe Katsuyuki, Hori Yasuki, Asano Go	4. 巻 51
2. 論文標題 Novel technique for intraductal cholangioscopy-assisted biliary drainage with over-the-wire microcatheter manipulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 E398 ~ E399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-0962-9628	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 -

1. 著者名 Jinno Naruomi, Hori Yasuki, Naitoh Itaru, Miyabe Katsuyuki, Yoshida Michihiro, Natsume Makoto, Kato Akihisa, Asano Go, Sano Hitoshi, Hayashi Kazuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Predictive factors for the mortality of acute pancreatitis on admission	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0221468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0221468	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 -

1. 著者名 Lavu Sravanthi, Therneau Terry M., Harmsen William S., Mara Kristin C., Wongjarupong Nicha, Hassan Mohamed, Ali Hamdi A., Antwi Samuel, Giama Nasra H., Miyabe Katsuyuki, Roberts Lewis R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of Statins on the Risk of Extrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Katsuyuki Miyabe, Vinay Chandrasekhara, Nicha Wongjarupong, Jun Chen, Stephen Johnson, Nicholas Chia, Marina Walther-Antonio, Gregory J. Gores, Mark D. Topazian, Purma C. Kashyap, Lewis R. Roberts, et al.
2. 発表標題 The role of the biliary and gut microbiome in the progression of cholangiocarcinoma and primary sclerosing cholangitis
3. 学会等名 American College of Gastroenterology Annual Meeting 2019 (国際学会)
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	吉田 道弘 (Michihiro Yoshida) (20636328)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	

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		
米国	Mayo Clinic		