

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591632

研究課題名 (和文) 膵癌のジェムシタビン効果を増強させる MMKY-01 の基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic analysis of anti-allergic agent MMKY-01, which accelerating drug sensitivity to gemcitabine in pancreatic cancer cell.

研究代表者

北島 吉彦 (KITAJIMA YOSHIHIKO)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：30234256

研究成果の概要 (和文)：代表者は、抗アレルギー薬として臨床使用されている MMKY-01 が膵臓癌および胆嚢癌のジェムシタビン感受性を増強することを見出した。本研究では、MMKY-01 がユブキチン-プロテアソームタンパク分解経路を介してジェムシタビン耐性分子 RRM1 を分解することでジェムシタビン感受性を増強させることを明らかにした。さらに、胆嚢癌細胞株を用いジェムシタビン耐性株を樹立し MMKY-01 効果につき追加解析を行った。その結果、MMKY-01 は単独でジェムシタビン耐性胆嚢癌細胞を強力にアポトーシスへと誘導した。これは MMKY-01 による TGF- β 産生阻害効果によることが推測された。

本研究は、膵癌および胆嚢癌の新規抗がん剤治療としてジェムシタビン+MMKY-01 併用療法が臨床応用可能であることを示すとともにジェムシタビン耐性克服としての MMKY-01 単独療法を推奨する基礎的知見を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The present study demonstrated that MMKY-01 accelerates drug sensitivity to gemcitabine via decreasing RRM1 expression in pancreatic and gall bladder (GB) cancer cells. The reduced RRM1 expression was derived through ubiquitin-proteasome pathway in pancreatic cancer. Further analysis revealed that MMKY-01 rendered gemcitabine resistant GB cancer cell to apoptosis. These results indicated that MMKY-01 plus gemcitabine is possibly effective to pancreatic as well as GB cancer. Especially, MMKY-01 treatment was revealed to reverse the gemcitabine resistance in GB cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：消化器外科、消化器癌の分子生物学

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：膵癌、胆嚢癌、ジェムシタビン、MMKY-01、RRM1、ユビキチン、TGF- β

1. 研究開始当初の背景

抗アレルギー剤として臨床投与されている MMKY-01 が膀胱癌細胞株 KP4 の抗がん剤ジェムシタビンへの効果を濃度依存的に増強させることを見いだした。この効果は他の抗がん剤 5FU, CPT11, タキサールには認められずジェムシタビン特異的効果と考えられた。Ribonucleotide reductase 1 (RRM1)は、DNA 合成に関与する酵素であると同時に、ジェムシタビン代謝経路に作用する。ジェムシタビンの抗がん剤作用は、中間代謝産物である dFdCDP による RRM1 阻害効果により発揮される。実際、癌細胞内 RRM1 発現量はジェムシタビン効果を左右する感受性マーカーとして小細胞肺癌で報告されている。研究代表者は、MMKY-01 の KP4 に対するジェムシタビン効果増強が、RRM1 発現を介して行われる可能性を推測した。KP4 に MMKY-01 を 0,50,100, 200 μ M 添加したところ、RRM1 発現がタンパクレベル (western blot 解析) で濃度依存的に減少した (図 1)。この結果は、MMKY-01 がジェムシタビン耐性に働く RRM1 タンパク発現を減少させたことに起因することを示唆した。研究代表者は、MMKY-01 の RRM1 タンパク発現抑制効果の機序を基礎的に解析するとともに膀胱癌の新規薬物治療モデルとしての MMKY-01+ジェムシタビン療法の in vitro 研究を計画した。

2. 研究の目的

MMKY-01 の RRM1 タンパク発現抑制により発揮されるジェムシタビン増強効果を基礎的に解析し明らかにすること。さらにヌードマウス皮下腫瘍モデルにて MMKY-01+ジェムシタビン併用療法の有効性を解析・検討する。

3. 研究の方法

- ・ Western blot 法:①膀胱癌細胞株 KP4 における RRM1 タンパク発現抑制効果を評価②複数種の膀胱癌細胞株における MMKY-01 の RRM1 抑制効果の評価
- ・ MTT アッセイ:複数種の膀胱癌細胞株における MMKY-01 のジェムシタビン増強効果の評価
- ・ アポトーシス評価: TUNEL アッセイ
- ・ ジェムシタビン耐性膀胱癌細胞株の樹立: MMKY-01 のジェムシタビン耐性克服の検討

4. 研究成果

(平成 20 年度)

- ・ KP4 細胞における MMKY-01 のジェムシタビン感受性増強がアポトーシスによることを TUNEL 法にて証明した (図 2)。
- ・ 次に、RRM1 に対する siRNA オリゴを作成し KP4 細胞にトランスフェクション後、

ジェムシタビン感受性増強を確認した。これは、MMKY-01 のジェムシタビン感受性増強効果が、MMKY-01 の RRM1 発現抑制に起因することを裏付ける解析となった。

- ・ KP4 細胞における MMKY-01 の RRM1 タンパク発現抑制は、プロテアソーム阻害剤である MG132 存在下(100 μ M, 200 μ M)にて阻害された (図 3)。これは、MMKY-01 の有する RRM1 タンパク発現抑制機序がユビキチンプロテアソーム系による分解であることを証明した。
- ・ さらに複数種の膀胱癌細胞株(PK-8, PK-1, PK-9, PK-59)においても MMKY-01 のジェムシタビン感受性増強効果を認めた。さらに Western blot 解析においてこの4細胞株における MMKY-01 の RRM1 タンパク発現抑制効果を認めた。
- ・ しかし、当初推測していた MMKY-01 の p53 発現上昇は認められなかったため、ヌードマウス実験も断念し、次年度からの研究計画の再考をおこなうこととした。

(平成 21 年度)

まず、前年度に明らかにした膀胱癌細胞での結果につき論文作成を行い、英文雑誌への投稿を開始した (最終的に 2010 Int J Oncol に accept された¹⁾。

平成21年度は、ジェムシタビンが膀胱癌と同様に臨床投与されている胆嚢癌に癌腫を変更し、異なる視点より MMKY-01+ジェムシタビン併用療法に関する in vitro 実験を計画した。この背景には、同時進行で行っていた胆嚢癌のジェムシタビン投与症例を対象とした免疫組織学的解析において、RRM1 発現が耐性に関与することを明らかにした研究に端を発している²⁾。

まず、胆嚢癌細胞株 GB-d1 よりジェムシタビン耐性株 GB-d1R を作成し、MMKY-01 に対する感受性を解析した。耐性株作成はジェムシタビン濃度を微量ずつ上昇させ、GB-d1 細胞培養を継続する手法で約半年を要した。その結果、GB-d1R は 100 μ M 濃度のジェムシタビン存在下でも生存した。また、Western blot にてジェムシタビン耐性分子である RRM1 発現を解析したところ、GB-d1R は親株 GB-d1 に比し、10,000 倍の RRM1 発現がみられ、ジェムシタビン耐性に寄与することが示唆された。

研究代表者は、ジェムシタビン耐性を獲得した GB-d1R に対し、MMKY-01 併用効果を解析したところ、予想通り MMKY-01 存在下において GB-d1R のジェムシタビンに感受性上昇をみとめた。さらに驚くべきことに、MMKY-01 の単独投与により GB-d1R は強力にアポトーシスを引き起こした。これは、MMKY-01 が胆嚢癌に対する GEM 治療耐性を克服する作用を有することが推測された。

そこで、この機序について平成22年度、さらなる解析を行うこととした。

(平成22年度実績)

まず、MMKY-01のGB-d1Rに対するアポトーシス誘導がTGF-beta添加により阻害されること、さらにはELISA法を用いてMMKY-01がGB-d1RのTGF-beta産生を抑えることを証明した。

この現象は、TGF-betaシグナルが、ゲムシタピン耐性を獲得しているGB-d1Rでは、TGF-betaシグナルが細胞死を回避する重要な因子であることを示唆した。すなわち、ゲムシタピンに耐性を示す胆嚢癌にはMMKY-01投与が有効であること、これにはMMKY-01によるTGF-beta産生抑制機序が関与している。

一方で研究代表者は、MMKY-01のGB-d1Rに対するアポトーシス誘導分子を同定する目的でGB-d1RをMMKY-01処理前後でcDNAマイクロアレイ解析を行い、MMKY-01投与により発現変化する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、MMKY-01処理によりGB-d1Rはアポトーシス関連遺伝子BIRC3やAPAF1の発現が上昇していることが明らかとなった。

これらの事実より、MMKY-01がGB-d1RのTGF-betaシグナルを遮断することによって、BIRC3やAPAF1を介してGB-d1Rに強力にアポトーシスを引き起こしている機序が示唆された。現在、これらの結果に関する論文を作成中である。

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2件)

- 1 Mayumi Mitsuno, Yoshihiko Kitajima, Kazuma Ohtaka, Keita Kai, Kazuyoshi Hashiguchi, Jun Nakamura, Masatsugu Hiraki, Hirokazu Noshiro, Kohji Miyazaki. Tranilast strongly sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine via decreasing protein expression of ribonucleotide reductase 1. *Int J Oncol*; 36: 341~349, 2010 査読有
- 2 Nakamura J, Kohya N, Kai K, Ohtaka K, Hashiguchi K, Hiraki M, Kitajima Y, Tokunaga O, Noshiro H, Miyazaki K. Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative

double-fluorescence

immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Int J Oncol*, 37:845~852,2010
査読有

[学会発表] (計6件)

- 1 橋口和義、北島吉彦、平木将紹、中村淳、能城浩和、宮崎耕治 Gemcitabine 耐性胆道癌細胞株における Tranilast の Apoptosis 誘導作用の検討 第20回日本消化器癌発生学会総会 2009.11.26-27 オリエンタルホテル広島
- 2 橋口和義、北島吉彦、平木将紹、中村淳、光野真由美、宮崎耕治 Gemcitabine 耐性胆道癌細胞株における Tranilast の Apoptosis 誘導機構についての検討 第68回日本癌学会学術総会 2009.10.1-3 パシフィコ横浜
- 3 北島吉彦、光野真由美、橋口和義、中村淳、平木将紹、大塚隆生、神谷尚彦、宮崎耕治 膵癌における Tranilast の RRM1 発現抑制効果に基づいた Tranilast+Gemcitabine(dFdC)併用療法の可能性 第19回日本消化器癌発生学会 2008.8.28-29 別府亀の井ホテル
- 4 橋口和義、光野真由美、北島吉彦、大高和真、平木将紹、中村淳、神谷尚彦、中房祐司、宮崎耕治 胆道癌細胞株における Tranilast の RRM1 発現抑制効果を紹介した Gemcitabine 感受性増強作用 第108回日本外科学会定期学術集会 2008.5.15-17 長崎ブリックホール
- 5 光野真由美、北島吉彦、平木将紹、橋口和義、中村淳、神谷尚彦、宮崎耕治 膵癌に対する RRM1 を分子標的とした Tranilast+Gemcitabine 併用療法の可能性 第108回日本外科学会定期学術集会 2008.5.15-17 長崎ブリックホール
- 6 Yoshihiko Kitajima, Mayumi Mitsuno,

Kazuyoshi Hashiguchi, Jun Nakamura,
Masatsugu Hiraki, Kohji Miyazaki
Tranilast increased the drug effect of
gemcitabine via protein degradation of
RRM1 in pancreatic cancer cells. AACR
annual meeting 2008 2008.4.12-16 San
Diego, USA

[図書] (計0件)
[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
北島 吉彦 (KITAJIMA YOSHIHIKO)
佐賀大学・医学部・客員研究員
研究者番号：30234256

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

Figures

図1 MMKY-01 は、濃度依存的に RRM1 タンパク発現を減少させる。

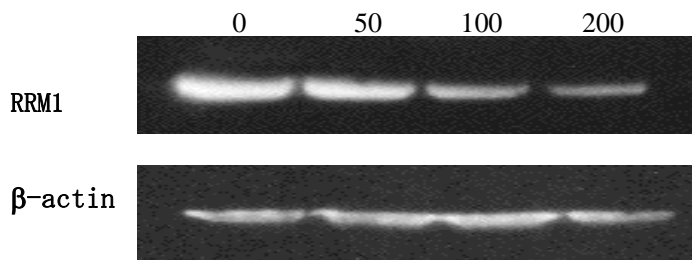


図2 MMKY-01 のジェムシタビン (GEM) 効果増強はアポトーシス誘導による。

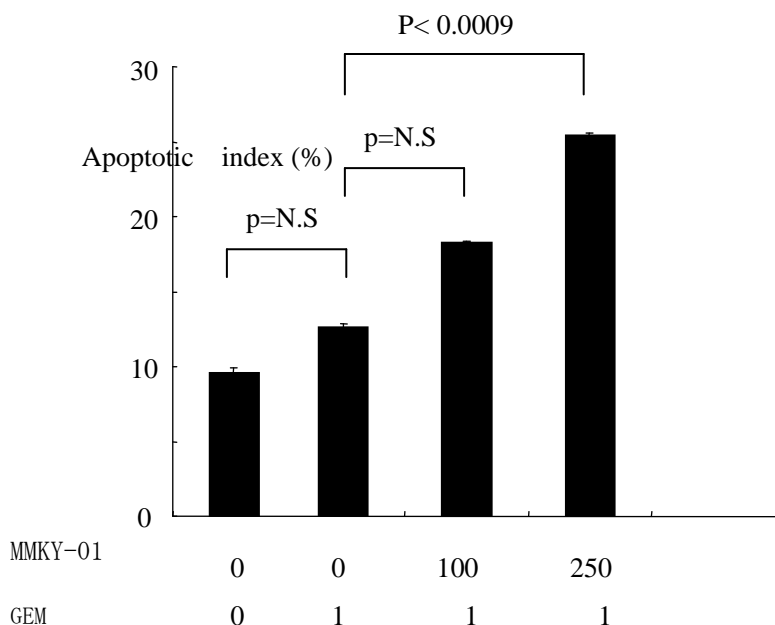


図3

MMKY-01 の RRM1 タンパク発現抑制効果は、MG132 添加により消失した。

