

平成 22 年 1 月 29 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2008~2009

課題番号:20790482

研究課題名(和文)

細胞膜銅輸送タンパク遺伝子発現を用いた白金系抗癌剤薬剤感受性予測の試み

研究課題名(英文)

Chemosensitivity prediction of platinum-containing anticancer drugs with gene expression of copper transporter on cell membrane

研究代表者

高畑 武功(TAKAHATA TAKENORI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号:20333726

研究成果の概要(和文): ATP7A、ATP7B、hCTR1を過剰発現している細胞にsiRNAを導入して遺伝子をノックダウンし薬剤を添加して感受性試験を行ったが統計的に有意な差を認めなかった。また癌患者からの癌組織および正常組織からDNAおよびRNAを抽出して解析を行ったが、残念ながら正常組織と癌組織の比較において、DNAメチル化、点突然変異、mRNA発現いずれにおいても有意な変化を見いだすことはできなかった。

研究成果の概要(英文): In cell line experiments, gene knockdown of ATP7A, ATP7B and hCTR1 by siRNA showed no statistically significant difference in chemosensitivity of cisplatin and oxaliplatin. And in clinical sample experiments, there was no significant difference between cancer tissue and normal tissue from cancer-bearing patients in DNA methylation, point mutation and mRNA expression of these copper transporter genes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード:上部消化器学(食道、胃、十二指腸)、薬剤感受性

1. 研究開始当初の背景

シスプラチンをはじめとする白金系抗癌剤は数十年前から固形腫瘍の治療に使用されてきたが腎障害、骨髄抑制、嘔気などの副作用が強く、長年にわたり類似薬の開発が進められてきた。例えばカルボプラチンは腎毒性が軽減されるも骨髄抑制が強く、ネ

ダプラチンは嘔気が弱いものの骨髄抑制は強いという特徴を持つ。オキサリプラチンは1970年代に本邦で開発されたにもかかわらず海外で臨床開発が進められた経緯を持ち、この中ではもっとも最近の2005年に保険適応となり腎障害と骨髄抑制が軽減されているのが特徴である。その適応は大腸癌に限られる一方、海外では胃癌、膵癌など

他の癌腫での臨床試験が行われ本邦は遅れをとっており、国内での研究数の増加が急務である。また、オキサリプラチンは現在世界的にも国内でも大腸癌の第一選択薬として使用されているため、使用頻度が増えるに従って臨床的に薬剤耐性が問題となりつつある。これらの薬剤は生体内では酵素による変化を受けず、物理化学的過程を経て代謝物に変換されるという薬理学的特徴を持ち代謝酵素の活性が生体内濃度や標的細胞内の殺細胞効果に影響を及ぼす他系列の薬剤とは異なる特徴を持つ。

近年、白金系薬剤耐性に細胞膜表面に存在する銅輸送タンパクが関与するという報告が出されたが、その機序は薬物を代謝して不活性化するのではなく細胞外にくみ出して細胞内濃度を下げることによって耐性を獲得するとされている。この機構を利用してくみ出しポンプを阻害もしくはくみ入れポンプを亢進させれば薬剤の細胞内濃度が上昇し耐性を克服できる可能性がある。しかし、生体内に投与可能な銅輸送タンパクに特異的な阻害剤もしくは機能亢進剤は未だに発見されていないため現時点では臨床応用の目途は立っていない。

2. 研究の目的

白金系薬剤は酵素代謝を受けないため長年その耐性機序は不明であったが、近年細胞膜表面に存在する銅輸送タンパクが関与するという報告が出された。しかし生体内に投与可能な銅輸送タンパクに特異的な阻害剤もしくは機能亢進剤は未だに発見されていないため現時点では臨床応用の目途は立っていない。そこで胃・大腸癌手術標本もしくは生検標本から DNA および RNA を抽出し、DNA メチル化および点突然変異、また mRNA の定量を行い、正常組織と癌組織の発現の違いと発現量の個人差について解析を行う。次に大腸癌患者についてはオキサリプラチンを、また胃癌患者に対してはシスプラチンを含むレジメンを投与し、遺伝子の発現パターン別に層別化を行い、その有害事象・無増悪再発期間・全生存期間などを指標にこの銅輸送タンパクの個人差が実際の治療効果に影響を与えるか否か検討する。

3. 研究の方法

ATP7A、ATP7B、hCTR1 を過剰発現している胃癌及び大腸癌培養細胞を選択し siRNA を導入して遺伝子をノックダウンした状態で、オキサリプラチンおよびシスプラチンを添

加し薬剤感受性への関与を確認する。胃癌および大腸癌の患者合計 100 人の外科的切除標本または消化管内視鏡下生検の癌組織および正常組織から DNA および RNA を抽出し、上記 3 遺伝子の DNA のメチル化や点突然変異の有無および mRNA 発現を定量する。一方、臨床面では胃癌患者には S-1 / シスプラチンを、大腸癌患者にはオキサリプラチン/レボホリナート/5-FU を投与し、定期的に CT にて効果判定を行う。規定の症例数に達したら遺伝子発現のパターン別に群分けを行い、生存期間、無増悪再発期間などについて統計学的検討を行う。遺伝子発現の違いと治療効果との関係について検討を行う。

4. 研究成果

まず *in vitro* の実験系で、胃癌及び大腸癌培養細胞の中から過去の卵巣癌細胞の報告で白金系抗癌剤薬剤感受性との関係があるとされた銅イオンくみ出しポンプの ATP7A、ATP7B、およびくみ入れポンプの hCTR1 を過剰発現している細胞を realtime-RT-PCR 法にて選択し、培地にオキサリプラチンおよびシスプラチンを添加し薬剤感受性を観察する至適濃度および至適薬剤暴露時間を決定した。次に siRNA を導入して posttranscriptional に分解して遺伝子をノックダウンする段階まで進んだが、realtime-RT-PCR 法で確認したところ mRNA 発現抑制が不十分であった。siRNA probe を変えたところ抑制が十分となった。そこで細胞に薬剤を添加して感受性試験を行ったが、予想に反して 50% 細胞増殖抑制率の値に統計的に有意な差を認めなかった。

また胃癌および大腸癌の患者からの組織標本は、患者のエントリーが当初の予定の 2 分の 1 程度にとどまったが、診療録を参照して臨床データを集積し、解析に備えた。また癌組織および正常組織から DNA および RNA を抽出してメチル化や点突然変異の有無および mRNA 発現を定量する実験系では、メチル化キットを用いた bisulfite genomic sequencing の実験系を確立していたので、DNA および mRNA を抽出し解析を行ったが、残念ながら正常組織と癌組織の比較において、DNA メチル化、点突然変異、mRNA 発現いずれにおいても有意な変化を見いだすことはできなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Isamu Okamoto, Masaki Munakata, Masaki Miyazaki, Takenori Takahata, Yasushi Takamatsu, Osamu Muto, Kazuhiko Koike, Kunihiko Ishitani, Taketo Mukaiyama, Yuh Sakata, Kazuo Tamura. Disturbance of the growth hormone-like growth factor-1 axis associated with poor performance status in patients with solid tumors, *Jpn J Clin Oncol* in press. / 査読有
- ② Hong Xin, Ruowen Sun, Masahiko Kanehira, Takenori Takahata, Jugoh Itoh, Hiroyuki Mizoguchi, Yasuo Saijo. Intratracheal delivery of CX3CL1-expressing mesenchymal stem cells to multiple lung tumors, *Mol Med*, 15(9-10): 321-327, 2009 / 査読有
- ③ Gen Yoshiya, Takenori Takahata, Naoyuki Hanada, Kazuhiro Suzuki, Atsushi Ishiguro, Masato Saito, Mutsuo Sasaki, Shinsaku Fukuda. Influence of cancer-related gene polymorphisms on clinicopathological features in colorectal cancer, *J Gastroenterol Hepatol* 23(6): 948-953, 2008 / 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① ヒト大腸癌細胞株における Keap1 プロモーター領域のメチル化: 花田直之、高畑武功、伊東重豪、孫若文、鈴木一広、鬼島宏、伊東健、福田眞作、西條康夫、第68回日本癌学会学術総会、2009.10.2 横浜
- ② 日本人悪性リンパ腫患者における臨床病

理的因子に影響する遺伝子多型の検索: 高畑武功、伊東重豪、花田直之、鈴木一広、孫若文、石黒敦、坂田優、西條康夫、第68回日本癌学会学術総会、2009.10.1 横浜

- ③ マウス肺の成長過程における肺幹細胞の動態解析: 孫若文、辛紅、高畑武功、伊東重豪、鬼島宏、貫和敏博、西條康夫、第49回日本呼吸器学会学術講演会、2009.6.12 東京
- ④ 間葉系幹細胞は生体の腫瘍増殖を促進させる: 鈴木一広、折口真人、兼平雅彦、孫若文、花田直之、高畑武功、伊東重豪、西條康夫、第67回日本癌学会学術総会、2008.10.29 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高畑 武功 (TAKAHATA TAKENORI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 20333726