

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590993

研究課題名（和文） 多剤耐性小細胞肺癌の分子標的治療

研究課題名（英文） Molecular target therapy for multidrug-resistant small cell lung cancer

研究代表者

木島 貴志（KIJIMA TAKASHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90372614

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌の難治性の原因となる多剤耐性化に深く関わる分子として癌細胞上に発現する CD9 および HER2 を同定し、これらの阻害が、前者では耐性化に伴い発現する CD9 を介した細胞外マトリックスとの接着により増強される細胞生存シグナルを損なうことにより、後者では耐性化に伴い発現する薬剤排泄ポンプ機能を直接的および HER2 阻害により間接的に抑制することで抗癌剤感受性を回復させることにより抗癌剤耐性を克服できることを見出し、これら分子の耐性克服治療標的分子としての可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Small cell lung cancer (SCLC) is highly malignant because it easily acquires multidrug resistance. We have found that CD9 and HER2 are upregulated on the cell surface of SCLC cells when they become multidrug-resistant. CD9 induced adhesion of SCLC cells to extracellular matrices (ECM) resulting in chemoresistance by augmenting anti-apoptotic signals via integrins. Inhibition of CD9 with blocking antibody or small interfering RNA induced apoptosis of chemoresistant SCLC cells. On the other hand, HER2 inhibitor lapatinib recovered the sensitivity of chemoresistant SCLC cells by inhibiting the function of drug-efflux pumps expressed on them. This inhibitory mechanism is found to include not only direct pump inhibition but also indirect mechanism through HER2 inactivation-mediated Src activation and caveolin-1 phosphorylation. These findings indicate the possibility of CD9 and HER2 as therapeutic target to overcome multidrug-resistance of SCLC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌、多剤耐性、分子標的治療、CD9、HER2

1. 研究開始当初の背景
癌死亡原因の第1位である肺癌の約20%を占める小細胞肺癌(SCLC)は、最も予後不良な組

織型である。その最大の原因は、初回抗癌剤治療にはよく反応するものの容易に多剤耐性(MDR)を獲得し再発するという独特の生物

学的特性にある。現在、再発 SCLC に対する有効な治療法の報告は確立されていない。それ故、SCLC の予後の改善に寄与し得る新しい分子標的治療法の開発が待ち望まれる。

(1) 細胞外マトリックス (ECM) への接着により誘導される薬剤耐性 (cell adhesion mediated drug resistance; CAM-DR) は、SCLC の抗癌剤耐性獲得機序において重要である (Nature Med 5: 662-8, 1999)。すなわち、SCLC 細胞ほとんどに発現する $\beta 1$ インテグリンと ECM の結合により惹起される生存シグナルが、抗癌剤によるアポトーシスを回避させる。我々は、インテグリンの働きを補強する分子 CD9 が、抗癌剤未暴露の SCLC 細胞株で普遍的に低下していることを見出した (Oncogene 22: 674-87, 2003)。

(2) HER2 は進展型 SCLC の予後不良因子であり、欧米人では約 10% に発現している (Int J Cancer 92: 474-9, 2001) が、日本人についての報告はない。乳癌や非小細胞肺癌では、抗癌剤耐性になると発現する薬剤排泄ポンプ (ABCB1, ABCG2) 機能を、HER2 阻害剤 lapatinib や EGFR 阻害剤 gefitinib HER2 や EGFR 発現の有無に関係なく阻害し、抗癌剤感受性を回復させることが報告されているが、いずれも臨床的に到達不可能な高濃度においてである。

2. 研究の目的

CD9 や HER2 が SCLC の抗癌剤耐性に関与しているかを明らかにし、これら分子の耐性機序における役割を分子生物学的に解析し、耐性克服の治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) CD9 を標的とした耐性克服の検討

① CD9 の発現を長期抗癌剤暴露により樹立した抗癌剤耐性 SCLC 株と感受性親株で解析する。

② CD9 発現耐性株の ECM (フィブロネクチン) への接着が増強するかどうかを検討する。

③ CD9 発現耐性株のフィブロネクチン上での細胞運動能をケモカイン CXCL12 存在の有無の条件下で time-lapse video microscopy にて検討する。

④ 抗 CD9 抗体 (ALB6) による阻害または siRNA による CD9 ノックダウンが、耐性細胞株のアポトーシスを誘導できるかどうかを cell death detection assay にて検討する。

⑤ siRNA による CD9 ノックダウンが耐性細胞株のアポトーシスを誘導できるかどうかを MTT assay にて検討する。

(2) HER2 を標的とした耐性克服の検討

① HER2 の発現を種々の SCLC 株で検討する。

② HER2 阻害剤 lapatinib が耐性株の抗癌剤感受性を回復できるかどうかを CCK-8 assay を用いて検討する。

③ 耐性株における ABCB1 と ABCG2 の発現を免疫ブロッティングにて確認する。

④ Lapatinib の薬剤排泄ポンプ機能阻害効果を rhodamine (ABCB1) と Hoechst (ABCG2) の排泄を指標に解析する。

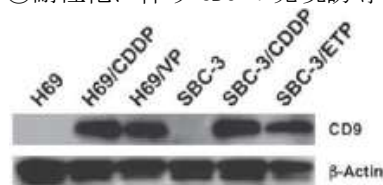
⑤ HER2 阻害を介した lapatinib のポンプ機能阻害機序の有無を siRNA による HER2 ノックダウンにより評価し、その経路に関わる分子を免疫沈降法やリン酸化抗体を用いた免疫プロットにて同定する。

⑥ In vivo で lapatinib が抗癌剤耐性を克服できるかどうかをヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討する。

4. 研究成果

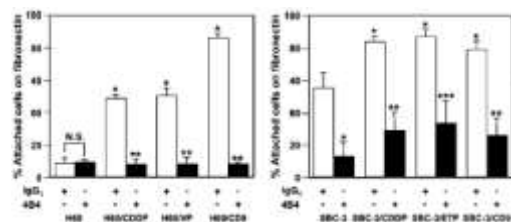
(1) CD9 を標的とした耐性克服の検討

① 耐性化に伴う CD9 の発現誘導



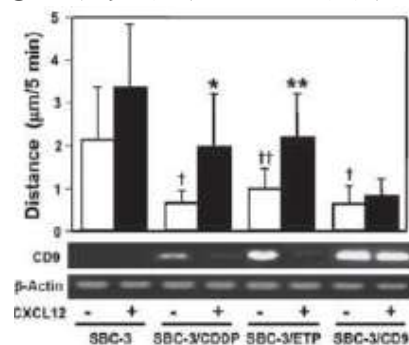
Etoposide (VP-16) 耐性株 (H69/VP, SBC-3/ETP) および cisplatin (CDDP) 耐性株 H69/CDDP, SBC-3/CDDP においてのみ CD9 が発現していた。

② 耐性株の ECM への接着増強



耐性株において接着が著明に増強 (□) し、 $\beta 1$ インテグリン抗体 4B4 によりその効果が阻害 (■) された。H69/CD9, SBC-3/CD9 は H69, SBC-3 に CD9 を遺伝子導入により強制発現させた陽性コントロール。

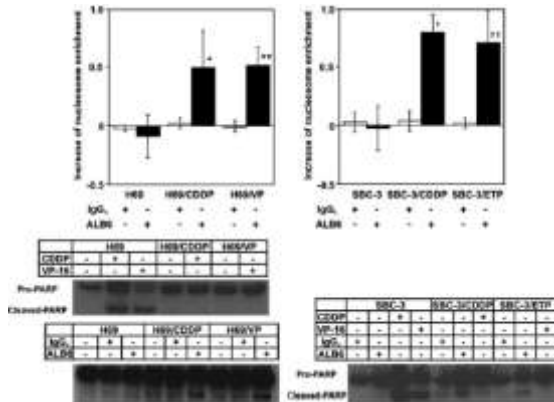
③ CD9 発現耐性株の細胞運動能低下



耐性株および SBC-3/CD9 ではフィブロネク

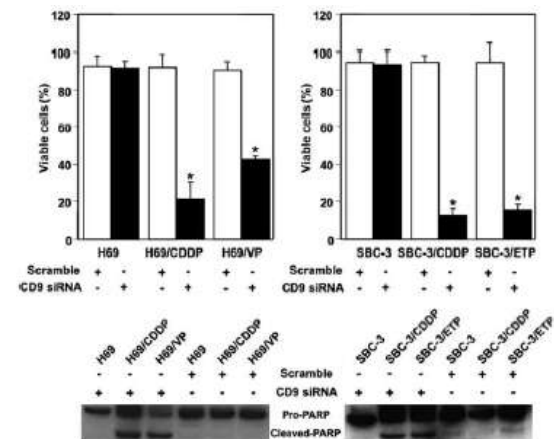
チン上での細胞運動が著明に低下した(□)が、ケモカイン CXCL12 の存在下では SBC-3/CD9 以外の株で運動能が回復(■)した。

④抗 CD9 抗体による耐性株選択的アポトーシス誘導



抗 CD9 抗体 (ALB6) は耐性株選択的 PARP の切断を伴う細胞死を誘導した。

⑤CD9 ノックダウンによる耐性株選択的アポトーシス誘導

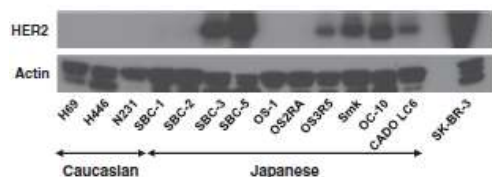


siRNA による CD9 ノックダウンは耐性株選択的に PARP の切断を伴う細胞死を誘導した。

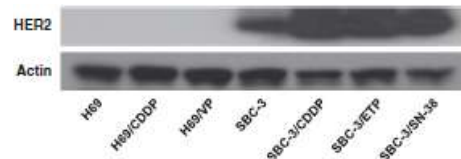
以上の結果から、CD9 は抗癌剤耐性化とともに、SCLC 細胞上に発現が増強し、β1 インテグリンを介した ECM への接着を強固にすることにより、CAM-DR 機序を増強すること、CD9 の選択的阻害が耐性株にアポトーシスを誘導できることが明らかとなった。

(2) HER2 を標的とした耐性克服の検討

①SCLC における HER2 発現の人種差と耐性化に伴う発現増強

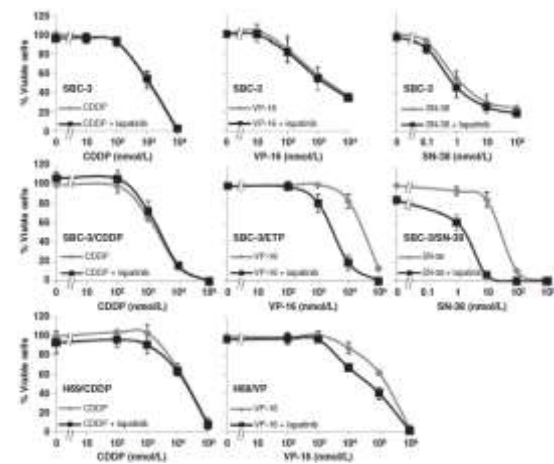


HER2 は、caucasian 由来 SCLC 株には発現を認めなかったが (0/3)、日本人由来株では高頻度に発現を認め (6/10)、人種差の可能性を示唆した。SK-BR-3 は HER2 陽性コントロールの乳癌細胞株。



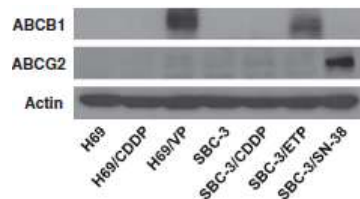
もともと HER2 陽性の SBC-3 細胞由来耐性株においてのみ、発現の増強を認めた。SBC-3/SN-38 は irinotecan (CPT-11) 耐性株。

②Lapatinib による耐性株の感受性回復



Lapatinib は、単独ではいずれの細胞株においても増殖抑制効果を発揮しなかったが (data not shown)、SBC-3/ETP および SBC-3/SN-38 において著明に、H69/VP においても有意に薬剤感受性を回復させた。

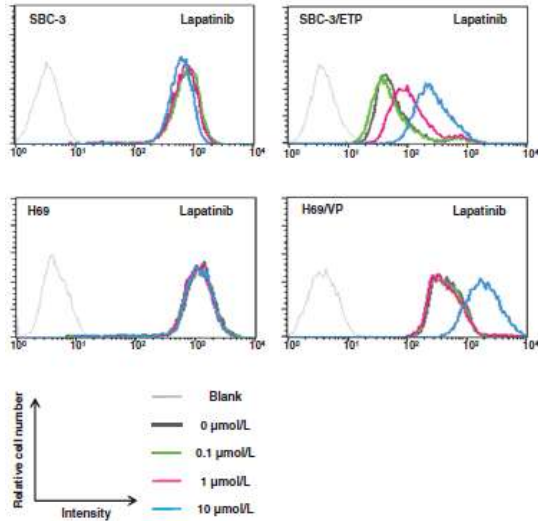
③耐性株における薬剤排泄ポンプの発現



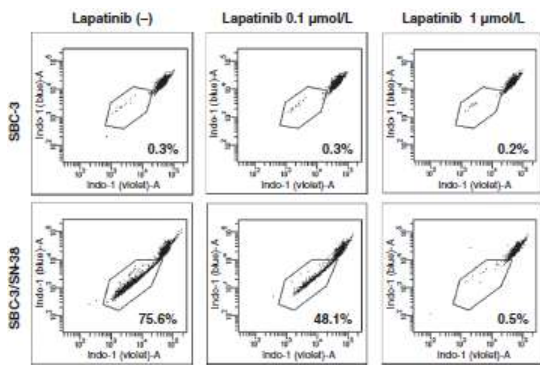
Etoposide 耐性株 (H69/VP, SBC-3/ETP) では ABCB1 が、irinotecan 耐性株 (SBC-3/SN-38) では ABCG2 が発現していた。

②③の結果から、lapatinib は薬剤排泄ポンプを発現し耐性化した SCLC 細胞株の感受性を回復させ、その効果は HER2 発現株でより著明に見られることがわかった。

④Lapatinibの薬剤排泄ポンプ機能阻害

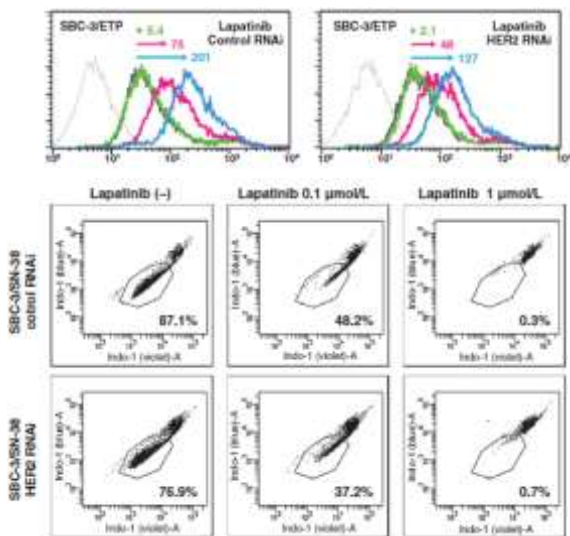


LapatinibによるABCB1のポンプ機能阻害効果は、HER2陽性株(SBC-3/ETP)では臨床的に到達可能な低濃度(1 μM)で発現したが、HER2陰性株(H69/VP)では高濃度(10 μM)でしか発現しなかった。



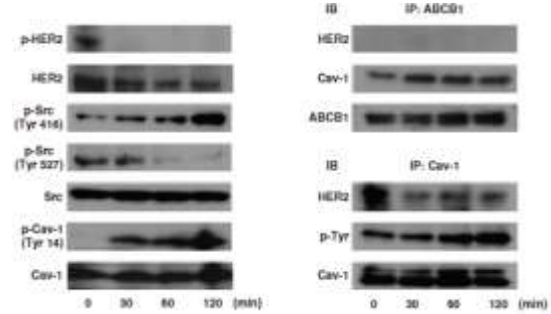
一方、LapatinibはABCG2のポンプ機能を低濃度(1 μM)でほぼ完全に阻害した。

⑤Lapatinibの薬剤排泄ポンプ機能阻害におけるHER2の関与

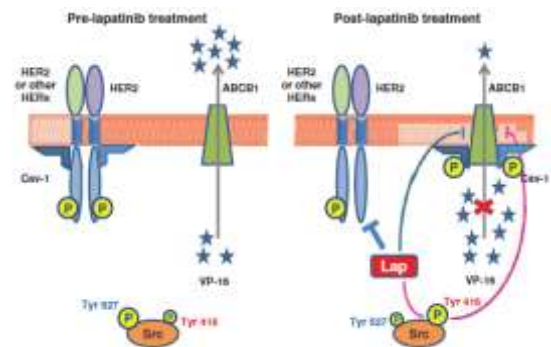


HER2をノックダウンすることにより、SBC-3/ETPにおけるlapatinibのABCB1阻害効果は減弱したが、SBC-3/SN-38におけるABCG2の阻害効果は影響を受けなかった。

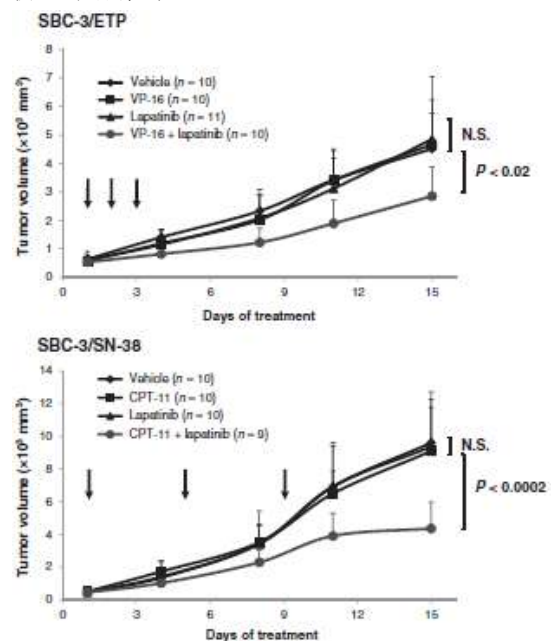
このことより、ABCB1阻害に関しては、HER2阻害を介した経路が存在することが示唆された。



LapatinibによるHER2阻害は、Srcの活性化(Tyr 416のリン酸化とTyr 527の脱リン酸化)およびcaveolin-1(Cav-1)のリン酸化を誘導し、Cav-1のHER2からの解離とABCB1への結合増強をもたらした。シエーマを下図に示す。



⑥In vivoにおけるlapatinibと抗癌剤の併用治療効果



ヌードマウスの皮下に接種した耐性株の腫瘍は、抗癌剤単独治療群または lapatinib 単独治療群では増殖を続けたが、両者の併用群においてのみ有意に縮小した。

以上の結果から、HER2 は日本人の SCLC に高率に発現している可能性がある(人種差?) こと、抗癌剤耐性化に伴いその発現が増強すること、HER2 阻害剤 lapatinib による HER2 シグナル抑制のみでは耐性が克服できないことがわかった。しかし、Lapatinib は耐性株に新たに発現する薬剤排出ポンプの機能を阻害することで、もとの抗癌剤に対する感受性を回復させること、特に ABCB1 阻害においては HER2 阻害を介した経路が存在することが今回新たにわかった。Lapatinib と抗癌剤の併用治療の SCLC における耐性克服の可能性が示唆された。

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 南 俊行, 木島貴志, 大谷安司, 河面 聡 他、HER2 as therapeutic target for overcoming ATP-binding cassette transporter-mediated chemoresistance in small cell lung cancer、Molecular Cancer Therapeutics、査読有、Vol. 11(4)、(2012)、830-841

② 河面 聡, 木島貴志, 大谷安司, 南 俊行 他、Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemo-resistance in small cell lung cancer、Cancer Research、査読有、Vol. 70(20)、(2010)、8025-8035

[学会発表] (計3件)

① 南 俊行, 木島貴志, 大谷安司, 河面 聡 他、HER2 陽性抗癌剤耐性小細胞肺癌における Lapatinib の ABC トランスポーター阻害効果、第 70 回 日本癌学会学術総会、2011. 10. 5、名古屋

② 南 俊行, 木島貴志, 大谷安司 他、小細胞肺癌の抗癌剤耐性における CD9 の関与と治療標的としての可能性、第 68 回 日本癌学会学術総会、2009.10.1、横浜

③ 大谷安司, 河面 聡, 南 俊行, 木島貴志 他、小細胞肺癌の抗癌剤耐性における CD9 の関与と治療標的としての可能性、第 13 回 日本がん分子標的治療学会学術集会、2009. 6. 26、徳島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木島 貴志 (KIJIMA TAKASHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90372614

(2) 研究協力者

大谷 安司 (OTANI YASUSHI)
大阪大学・医学部付属病院・医員

南 俊行 (MINAMI TOSHIYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・院生