

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08735

研究課題名(和文) バイオマーカーおよびプロテアソーム阻害剤を用いた新たなイリノテカン療法の開発

研究課題名(英文) Development of a Novel Irinotecan Therapy Using Biomarkers and Proteasome Inhibitors

研究代表者

安藤 幸滋 (ANDO, Koji)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20608864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌治療に用いられる topoisomerase I 阻害剤であるイリノテカンの新たな治療法開発を行った。イリノテカンの感受性バイオマーカーとして topol-pS10抗体を作成し、免疫染色によりイリノテカン感受性が予測できるか検討を行った。胃癌及び大腸癌275例の切除検体を用いて topol-pS10による免疫染色を行い、感度82-87%、精度70%、陽性反応的中率71-82%、陰性反応的中率70-87%であり、topol-pS10はイリノテカン感受性バイオマーカーとなりうることを証明した。また、プロテアソーム阻害剤を用いて、イリノテカンの効果を上げることを細胞実験で証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではイリノテカンの感受性バイオマーカー開発およびイリノテカンを用いた新たな治療法開発を行った。我々が開発した topol-pS10抗体を用いた免疫組織化学染色にてイリノテカン効果を予測することができることを証明した。また、プロテアソーム阻害剤を用いることでイリノテカン効果が増強することも証明した。イリノテカンは消化器癌治療によく用いられる抗がん剤である。本研究により多くの消化器癌患者の助けとなることが考えられる。現在、マウスを用いた in vivo の実験を行っておりこれが成功すれば臨床研究を行う方針である。

研究成果の概要(英文)：We conducted the development of a new therapeutic approach for irinotecan, a topoisomerase I inhibitor used in the treatment of gastrointestinal cancers. We created an anti-topol-pS10 antibody as a sensitivity biomarker for irinotecan and investigated whether irinotecan sensitivity could be predicted through immunostaining. Immunostaining using topol-pS10 was performed on resected specimens from 275 cases of gastric and colorectal cancer, revealing a sensitivity of 82-87%, an accuracy of 70%, a positive predictive value of 71-82%, and a negative predictive value of 70-87%. This confirmed that topol-pS10 could serve as a biomarker for irinotecan sensitivity. Furthermore, using proteasome inhibitors, we demonstrated in cell experiments that the efficacy of irinotecan could be enhanced.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 胃癌 イリノテカン プロテアソーム阻害剤

1. 研究開始当初の背景

大腸癌においては、術後補助化学療法や切除不能進行大腸癌、再発大腸癌に対するがん薬物療法など、多くの場面で抗癌剤が用いられている。イリノテカン[®]は FOLFIRI 療法や FOLFOXIRI 療法などで用いられるが、イリノテカンに不応となる患者も多く、この詳細なメカニズム(抗癌剤への耐性メカニズム)ははっきりわかっていない。

イリノテカンは topoI を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する(*Clin. Cancer Res.*,1995)。また、イリノテカンは投与後に topoI が分解される場合では抗腫瘍効果が低いことが報告されている(*Cancer Res.* 2001, *Oncotarget*, 2017)。我々はこの topo I 分解の分子メカニズムを詳細に検討し、報告した(*Oncotarget*, 2017)。このメカニズムとしてはイリノテカン投与後の DNA-PK による topo I-S10 残基のリン酸化、BRCA1-BARD1 によるリン酸化 topoI のユビキチン化および分解である。イリノテカン投与後に topoI が分解される細胞株ではイリノテカン耐性となっている(*Oncotarget*, 2017)。我々はこの topoI-S10 残基のリン酸化を表す抗体を作成した(topoI-pS10)。この抗体を用いた免疫組織化学染色はイリノテカン感受性とよく相関した。TopoI-pS10 陰性症例はイリノテカンに感受性があり、陽性症例は感受性がない。また、TopoI 分解はユビキチンプロテアソーム経路により行われるため、プロテアソーム阻害剤との併用にてイリノテカンの効果が増強することが期待される。本研究では我々が開発した topoI-pS10 抗体及びプロテアソーム阻害剤を用いて、イリノテカンを用いた新たなそして効果的な治療戦略を開発する。

2. 研究の目的

本研究ではイリノテカン感受性を我々が開発した topoI-pS10 抗体を用いて検討する。TopoI-pS10 陰性症例はイリノテカン感受性を示し、イリノテカンの投与濃度をどこまで下げても効果が出るかを考察する。これにより効果はあるが、副作用を減らすことができると考える。また、topoI-pS10 陽性症例ではイリノテカン耐性となるため、プロテアソーム阻害剤を併用することでイリノテカンの効果を上げる戦略を行う。

3. 研究の方法

本研究では以下の三部に分けて細胞株、臨床検体及びマウスを用いた検討を行う。

topoI-pS10 抗体を用いた免疫組織化学染色法によるイリノテカン感受性の予測検討

イリノテカン感受性群におけるイリノテカン濃度の調整検討

イリノテカン耐性群におけるプロテアソーム阻害剤とイリノテカンの相乗効果の検討

これら三つの基礎的検討を加えて、我々が提唱する「イリノテカン効果があると認められる患者には低用量のイリノテカン治療、効果がないと認められる患者にはプロテアソーム阻害剤併用療法」が正しいのか、検証する。

4. 研究成果

topoI-pS10 抗体を用いた免疫組織化学染色法によるイリノテカン感受性の予測検討

治療としてイリノテカンを用いた胃癌・大腸癌切除検体および生検検体を持ちいて topoI-pS10 抗体を用いて免疫染色を行った。イリノテカン効果と topoI-pS10 発現の検討を行った。胃癌検体は 99 例、大腸癌検体は 176 例を用いた。胃癌では感度 82.4%、精度 70%、陽性反応的中率 82.4%、陰性反応的中率は 70%であった(右表)。大腸癌では感度 87.5%、精度 70%、陽性反応的中率 70.7%、陰性反応的中率が 87%であった(右表)。この結果、topoI-pS10 陽性例ではイリノテカンの効果がなく、陰性例ではイリノテカンの効果が期待できることが示唆された。本研究結果は Clin Colorectal Cancer 誌に発表された(Ando K et al. Clin Colorectal Cancer. 2021 20(2):e129-e138)。

Characteristic	GC (N = 79), Training Set	GC (N = 27), Validation Set	CRC (N = 176), Validation Cohorts
Threshold	35%	35%	40%
Operating characteristics			
NPV	42.3% (24-62)	70.0% (35-92)	87.0% (77-93)
PPV	92.5% (81-98)	82.4% (56-95)	70.7% (61-79)
Sensitivity	76.6% (64-86)	82.4% (56-95)	87.5% (78-94)
Specificity	68.8% (41-88)	70.0% (35-92)	70.0% (59-79)
Positive response rate			
Sensitive group (below threshold)	42.3% (24-62)	70.0% (35-92)	87.0% (77-93)
Resistant group (above threshold)	7.6% (2-19)	17.6% (5-44)	29.3% (21-39)

イリノテカン感受性群におけるイリノテカン濃度の調整検討

イリノテカン耐性群におけるプロテアソーム阻害剤とイリノテカンの相乗効果の検討

本研究課題では主に について検討を行った。プロテアソーム阻害剤によるイリノテカン増強効果を検討した。

1. 大腸癌細胞株における topoI 分解の検討

3種類の大腸癌細胞株 (HCT116, HCT15, DLD-1) を用いて検討を行った。これらの3株のうち、HCT116 はイリノテカン感受性を示した。これらの細胞にイリノテカン代謝産物である SN-38 を添加したところ、HCT116 では topoI の分解を認めなかったが、HCT15, DLD-1 株では SN-38 の添加後経時的に topoI 分解を認めた。topoI 分解とイリノテカン感受性の相関が確認できた。

2. DLD-1 株におけるプロテアソーム阻害剤とイリノテカン感受性の検討

SN-38 耐性株である DLD-1 について検討を行った。SN-38 とともにプロテアソーム阻害剤であるイキサゾミブ (IXA) を用いると topoI 分解が抑制された (図1)。また、IXA を加えると、SN-38 の殺細胞効果が高まった (図2)。

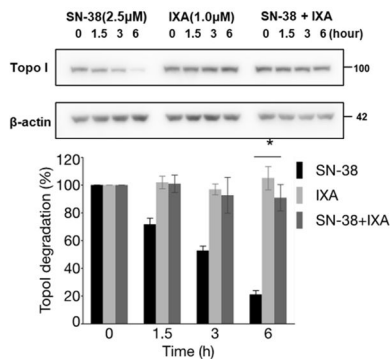


図1. IXA 併用での topoI 分解

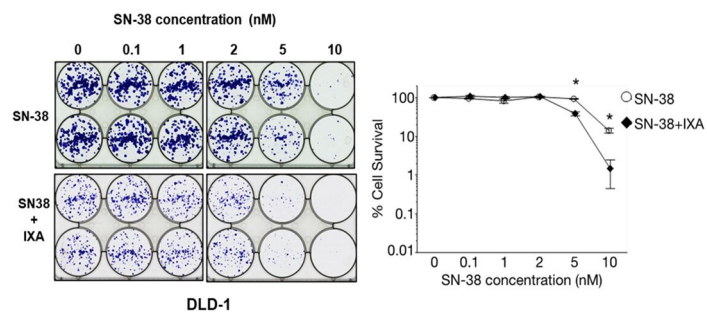


図2. SN-38 と IXA の殺細胞効果

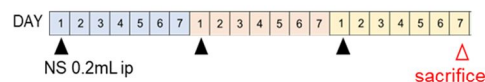
3. ヌードマウスにおける検討

現在、ヌードマウスを用いた検討を行っている。

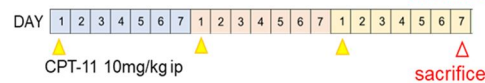
方法：

1. 両側季肋下にDLD-1 1.0×10^6 ずつ皮下注射し、0.5 cm になるまで増大させる。
2. 5グループに分類し(コントロール、IXA単剤、IRI単剤、IXA + IRI 6時間後)、腫瘍サイズと体重を3回/週ずつ測定
3. 薬剤投与21日後に腫瘍サイズ・重量測定、免疫染色でTopo-Iの染色度合いを評価

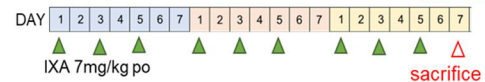
①コントロール: vehicle n=2



②CPT-11: 10mg/kg day1 ip n=3



③IXA: 7mg/kg 3 times/week po n=3



④CPT-11 + IXA: ②+③ n=3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ando K, Ozonoff A, Lee SY, Voisine M, Parker JT, Nakanishi R, Nishimura S, Yang J, Grace Z, Tran B, Diefenbach T.J., Maehara Y, Yasui H, Irino T, Salgia R, Terashima M, Gibbs P, Ramanathan R.K., Oki E, Mori M, Kulke M, Hartshorn K, Bharti A	4. 巻 20
2. 論文標題 Multicohort Retrospective Validation of a Predictive Biomarker for Topoisomerase I Inhibitors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Colorectal Cancer	6. 最初と最後の頁 e129 ~ e138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clcc.2020.11.005	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	沖 英次 (OKI Eiji) (70380392)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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
---------	---------