

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 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591435

研究課題名（和文）

薬剤耐性腫瘍に対する標的分子抑制ベクターによる抗腫瘍剤増感療法

研究課題名（英文）

Combined therapy using drug resistant relative molecular-suppressing vector and anticancer drug

研究代表者

劉 大革（LIU DAGE）

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30314941

研究成果の概要（和文）：

本邦の非小細胞肺癌の約3分の2は進行期癌で、治療成績は未だ不良である。そのため、進行期肺癌に対する新治療戦略の開発が急務である。これまでの研究から、様々な抗腫瘍剤標的分子の腫瘍内過剰発現が、その抗腫瘍剤の耐性に関与することが報告されている。その中で最新の我々の研究から、抗腫瘍剤標的分子が遺伝子治療のターゲットとなり、抗腫瘍剤標的分子発現抑制ベクターにより抗腫瘍剤の感受性を獲得しうるということが判明してきた。そこで我々は薬剤耐性の進行期癌の治療として、抗腫瘍剤関連分子の発現抑制ベクターと抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。我々は臨床応用可能な shRNA 発現ベクターを、導入効率の高いアデノウイルスベクターで作製し、癌細胞株での RNA interference (RNAi) 実験後、実験動物（担癌ヌードマウス）で標的分子抑制ベクターと抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。22年度には、抗腫瘍剤標的分子に合成 siRNA による遺伝子治療実験を実施し、siRNA のノックダウン効率を評価した。これにより得られた最適な siRNA 配列とループ配列を含む shRNA 配列をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現プラスミドベクターの作成を完了した。23年度には、22年度の研究に基づき COS-TPC 法で shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製した。24年度にはさらに、抗腫瘍剤標的分子（RRM1, TUBB4）の高発現癌細胞株に対して、作製した shRNA 発現アデノウイルスベクターのノックダウン効率の評価し。実験動物（担癌ヌードマウス）で標的分子抑制ベクターと抗がん剤の併用実験を行い遺伝子治療の可能性を確認した。また、国内外の学会発表に通じて抗腫瘍剤標的分子をターゲットとした発現抑制ベクターによる癌遺伝子治療が、進行期癌における新治療戦略となりうることを積極的に発信した。

研究成果の概要（英文）：

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 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：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：

非小細胞肺癌，薬剤耐性，抗腫瘍剤増感法，抑制ベクター，shRNA，進行期肺癌。

1. 研究開始当初の背景

進行期肺癌の治療向上には、有効な抗腫瘍剤による化学療法は重要で、抗腫瘍剤標的分子に基づく個別化化学療法を我々の臨床実用している (Future Ocol 2:289-99,2006).5-Fu 標的分子 thymidylate synthase (TS)の発現が少ない腫瘍が 5-FU 感受性であることを我々は示し(Br J Cancer 95:607-15, 2006), EGFR チロシンキナーゼ拮抗剤に感受性である EGFR 変異腫瘍の検出プロトコールも確率した (Oncol Rep 15:1503-05).しかし, TS 低発現または EGFR 変異の腫瘍は肺癌全体の約 30%しかなく、多くの進行期肺癌には更なる治療戦略が必要である。そこで、我々は 5-FU 耐性腫瘍に対する新療法として、TS 抑制ベクターによる 5-FU 増感遺伝子治療を研究した。その結果、担癌ノードマウスの実験で、TS 高発現である 5-FU 耐性腫瘍に強い抗腫瘍効果を示すことを認めた(2009 AACR, #3792)。つまり、抗腫瘍剤標的分子の抑制ベクターをその抗腫瘍剤と併用すると、本来薬剤耐性であった腫瘍に対して抗腫瘍効果が示された。この我々の成果から、抗腫瘍剤標的分子をターゲットとした発現抑制ベクターにより癌遺伝子治療が進行癌における新治療戦略となりうる事が明らかとなった。同様な薬剤耐性の機序として、ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) の腫瘍内過剰発現が gemcitabine 耐性に (Clin Cancer Res 10:1318-25, 2004), class III β -tubulin (TUBB4) の腫瘍内過剰発現が Taxane 系抗腫瘍剤に耐性に関与することが報告されている (Mol Cancer Ther 4:2001-7, 2005)。

2. 研究の目的

本邦の非小細胞肺癌の約 3 分の 2 は進行期癌で、治療成績はまだ不良である。そのため、進行期肺癌に対する新治療戦略の開発は急務である。これまでの研究から、様々な抗腫瘍剤標的分子の腫瘍内過剰発現が、その抗癌剤の耐性に関連することを報告されている。その中で最新の我々の研究から、抗腫瘍剤標的分子が遺伝子治療のターゲットとなり、抗腫瘍剤標的分子発現抑制ベクターにより抗腫瘍剤の感受性を獲得しうる事が判明してきた。そこで我々は薬剤耐性の進行期肺癌の治療として、抗腫瘍剤関連分子の発現抑制ベクターと抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。我々は臨床応用可能な shRNA 発現ベクターを導入高率の高いアデノウイルスベクター作製し、癌細胞株での RNA interference (RNAi) 実験後、実験動物(担癌ヌードマウス)で標的分子抑制ベクターと抗腫瘍剤の併用療法による化学・遺伝子治療の研究を行う。

3. 研究の方法

非小細胞肺癌細胞株を用いて、抗腫瘍剤標的分子として、gemcitabine の標的分子である ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1), Taxane 系抗腫瘍剤に関する class III β -tubulin (TUBB4)などを対象とする。

これらの標的分子に対してそれぞれの発現抑制ベクターを、shRNA 発現アデノウイルスベクターで作成し、臨床実用できるレベルまでで精製する。まず癌細胞株の実験で、ベクターによる標的分子の発現抑制効果と、対応する抗腫瘍剤との併用療法(RRM1 抑制ベクターと gemcitabine の併用; TUBB4 抑制ベクターと Taxane 系抗腫瘍剤の併用)による薬剤耐性腫瘍細胞における抗腫瘍効果を評価する。そこで我々は進行期肺癌に対する新治療戦略を開発し、

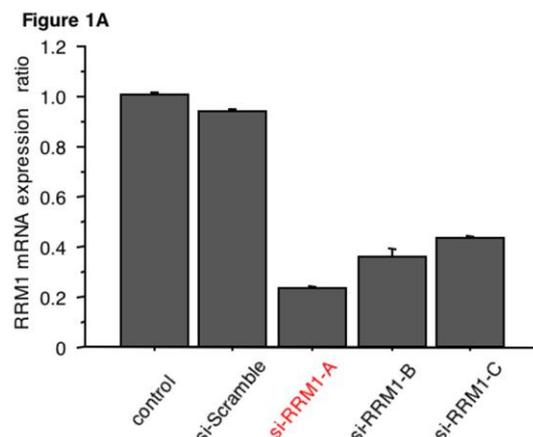
4. 研究成果

1). 22年度には、抗腫瘍剤標的分子に合成 siRNA による遺伝子治療実験を実施し、siRNA のノックダウン効率を評価した。これにより得られた最適な siRNA 配列とループ配列を含む shRNA 配列をプラスミドベクターに組み込み、shRNA 発現プラスミドベクターの作成を完了した(Figure 1)。

2). 22年度の研究に基づき COS-TPC 法で shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製した。また、非小細胞肺癌における RRM1 と class III β -tubulin の腫瘍内過剰発現は非小細胞肺癌における予後不良因子であることを証明した(第 28 回日本呼吸器外科学会総会, 2011; STS 48th Annual Meeting, 2012)。

3). 24年度にはさらに、抗腫瘍剤標的分子 RRM1 の高発現癌細胞株に対して、作製した shRNA 発現アデノウイルスベクターのノックダウン効率の評価し(Figure 2) in vitro で評価し(Figure 3), 標的分子抑制ベクターと抗がん剤の併用実験を行い、遺伝子治療の可能性を確認した (Figure 4)。また、実験動物(担癌ヌードマウス)で標的分子抑制ベクターの遺伝子治療の可能性を確認した(Figure 5)。

図



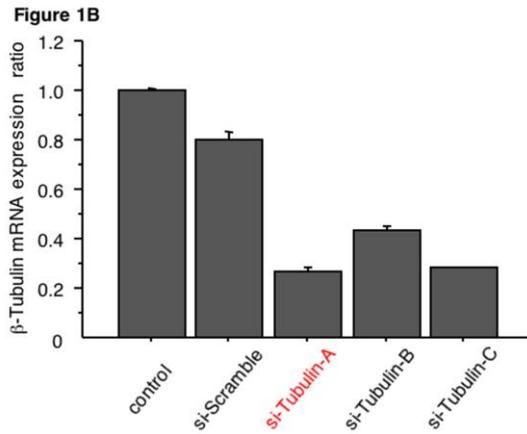


Figure 1. Gene expressions in lung carcinoma A549 cells after transfection of small interfering RNAs (siRNAs) targeting RRM1 (A) and β -tubulin (B).

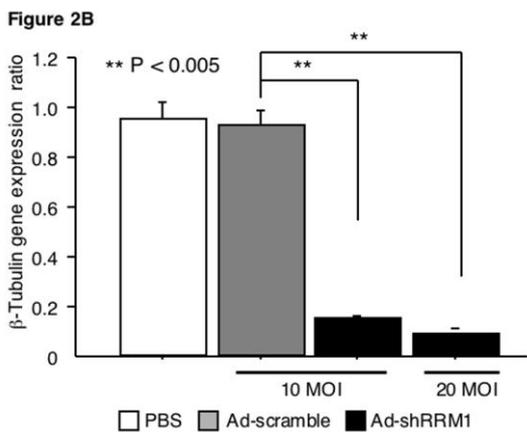
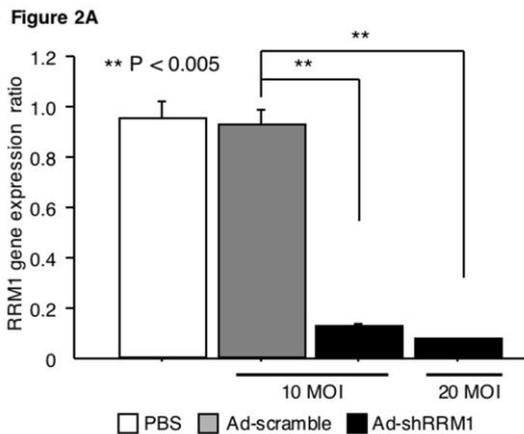


Figure 2. Gene expressions in RRM1-overexpressing human tumour cells after transduction with adenoviral vectors. (A) WRRM1 gene expressions in lung carcinoma A549 cells, (B) β -tubulin gene expressions in head and neck carcinoma A549 cells. Analyses were performed at 72 h after transduction with adenoviral

vectors at a multiplicity of infection MOI of 20. MOI, multiplicity of infection.

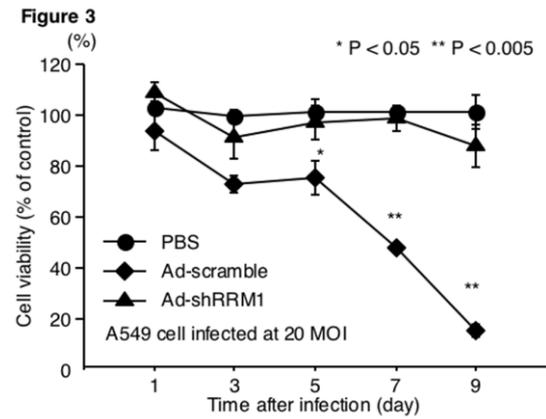


Figure 3. Cell viability evaluated by MTT assay after transduction with adenoviral vectors, in comparison to scramble vector in A549 cells.

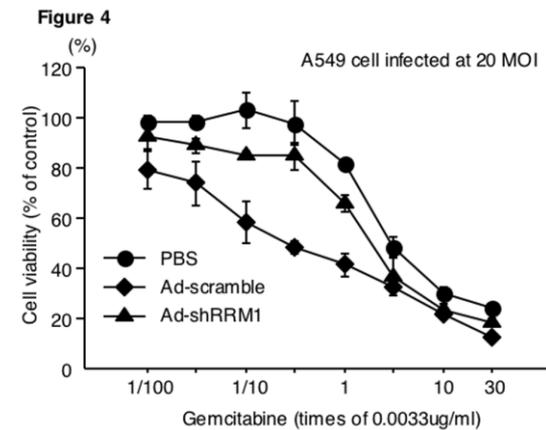


Figure 4. Cell viability evaluated by MTT assay after transduction with adenoviral vectors, in combination with gemcitabine in A549 cells.

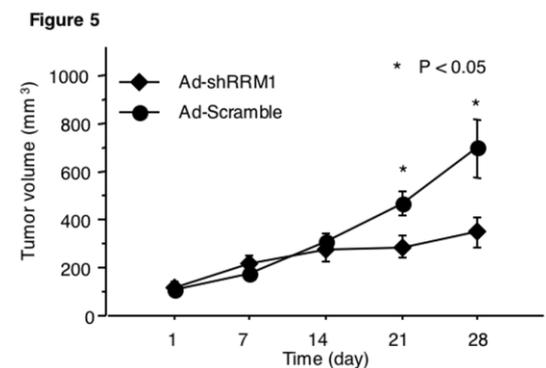


Figure 5. Tumour volumes of RRM1-overexpressing A549 xenografts in nude mice.

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 5 件)

1. Nakashima N, Huang CL, Liu D, Ueno M, Yokomise H. Intratumoral Wnt1 expression affects survivin gene expression in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol*. 2010, 9:687-694.
2. Kadota K, Huang CL, Liu D, Yokomise H, Haba R, Wada H. Combined therapy with a thymidylate synthase-inhibiting vector and S-1 has effective antitumor activity against 5-FU-resistant tumors. *Int J Oncol*. 2011;38(2):355-63.
3. Liu D, Kadota K, Ueno M, Nakashima N, Yokomise H, Huang CL. Adenoviral vector expressing short hairpin RNA targeting Wnt2B has an effective antitumour activity against Wnt2B2-overexpressing tumours. *Eur J Cancer*. 2012 ;48(8):1208-18
4. Nakashima N, Liu D, Huang CL, Ueno M, Zhang X, Yokomise H. Wnt3 gene expression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2012;76(2):228-34.
5. Yokomise H, Liu D, Chang S, Go T, Ishikawa S, Misaki N, Nakashima N. Biomarkers as prognostic factors for cN2 or 3 non-small cell lung cancer treated by induction chemoradiotherapy and surgery. *Anticancer Res*. 2013;33(3):1107-15.

[学会発表] (計 7 件)

1. 劉大革、垂水晋太郎、松浦奈都美、中島成泰、張性洙、三伯幸、吳哲彦、石川真也、黃政龍、横見瀬裕保。非小細胞肺癌における Wnt2B の c-Myc 発現誘導とその臨床意義。第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 23 日 大阪国際会議場 (大阪府)。
2. 松浦奈都美、中島成泰、垂水晋太郎、張性洙、三崎伯幸、劉大革、吳哲彦、石川真也、横見瀬裕保。術後抗癌剤治療を行った pN2 肺癌症例における腫瘍内 ERCC1、Class III β tubulin 発現と予後に関する検討。第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011 年 5 月 13 日 別府ビーコンプラザ。
3. 劉大革、垂水晋太郎、松浦奈都美、中島成泰、張性洙、三伯幸、吳哲彦、石川真也、黃政龍、横見瀬裕保。肺腺癌術後症例におけ

るバイオマーカーの検索及び予後。第 28 回日本呼吸器外科学会総会 2011 年 5 月 13 日 別府ビーコンプラザ。

4. 劉大革、黃政龍、中島成泰、新居和人、石川真也、横見瀬裕保。Wnt2B-suppressing adenoviral vector has a significant antitumor activity against Wnt2B-overexpressing tumors. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋。

5. Yokomise H, Liu D, Chang SS, Goto T, Ishikawa S, Misaki N, Nakashima N. Biomarkers as Prognostic Factors for cN2, 3 Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Induction Chemoradiotherapy and Surgery. STS 48th Annual Meeting 2012 年 1 月 30 日 Fort Lauderdale, FL, USA.

6. 劉大革、新居和人、張霞、徳永義昌、中島成泰、石川真也、横見瀬裕保。非小細胞肺癌における新規 p53 標的遺伝子 DNA polymerase γ (PolH) 発現の臨床意義。第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 09 月 19 日 札幌市。

7. 劉大革、中島成泰、新居和人、松浦奈津美、笠井由隆、後藤正司、垂水晋太郎、張性洙、石川真也、吳哲彦、黃政龍、横見瀬裕保。肺腺癌術後症例におけるバイオマーカーの検索及び術後治療効果との関連。第 112 回日本外科学会定期学術集会 2012 年 04 月 13 日 千葉県、幕張メッセ。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

劉大革 (LIU DAGU)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：30314941

(2) 研究分担者

横見瀬裕保 (YOKOMISE HIROYASU)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：80231728

(3) 連携研究者

上野正樹 (UENO MASAKI)
香川大学・医学部・助教授
研究者番号：30322267