

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591156

研究課題名(和文)葉酸代謝拮抗薬のバイオマーカーの探索

研究課題名(英文)The predictive biomarkers for antifolate anticancer drugs

研究代表者

小栗 鉄也(Oguri, Tetsuya)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60363925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：樹立したペメトレキシド(MTA)耐性肺癌細胞株において、ゲムシタピンやAra-C細胞内活性や代謝関わる因子の発現が変化し、感受性が高めることを示した。

MTAの効果予測因子として、ターゲットであるthymidylate synthase (TS)と薬剤排出ポンプABCC11の検討を行った。肺癌細胞株や臨床検体を用いてTSの遺伝子増幅がMTA治療の効果予測マーカーになる可能性を示した。ABCC11は多型による発現の違いに着目し、強制発現株を樹立したところ、高発現株Hela-538G(V5)でMTAやmethotrexateの耐性亢進を認めた。現在臨床肺癌検体での効果との関連について検討中である。

研究成果の概要(英文)：We found that the mechanisms of the synergistic interaction of pemetrexed (MTA) and cytotoxic nucleoside analogues are multifactorial, and that the chemotherapeutic activity of the combination of MTA and cytotoxic nucleoside analogues is synergistic with regard to the alteration of metabolic molecules.

In a search for biomarkers for study of the efficacy of MTA treatment, we examined the thymidylate synthase (TS) copy number in NSCLC cell lines and in clinical NSCLC samples treated with MTA with platinum drugs.

Significant correlation was found between the TS copy number and the sensitivity for MTA in both lung cancer cell lines and clinical NSCLC samples. Our results suggest that TS copy number could be a predictive biomarker for MTA.

We also focus on ABCC11 polymorphism 538G>A, and established cell lines expressing human ABCC11, one carrying allele G and another carrying allele A. Moreover we now examine the relationship between ABCC11 polymorphism and resistance to MTA clinically.

研究分野：医歯薬系

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：肺癌 ペメトレキシド ABCトランスポーター 遺伝子多型 thymidylate synthase 予測バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

Pemetrexed (MTA)やMethotrexate (MTX)などの葉酸代謝拮抗薬は肺癌や血液腫瘍に用いられているが、その効果予測マーカーは明らかとなっていない。以前肺癌のMTA耐性株を用いた実験から、MTAの耐性株で薬剤のターゲットであるthymidylate synthase (TS)の高発現や、薬剤排出ポンプABCトランスポーターであるABCC11の高発現を認めた。このため葉酸代謝拮抗薬の効果予測因子としてTSやABCC11の可能性を中心に検討した。またMTAの耐性株において、同じ代謝拮抗薬であるcytotoxic nucleoside analogueのgemcitabine (GEM)やcytosine arabinoside (Ara-C)の感受性が親株に比べ高いことも見いだした。このため、この機序についても検討をおこなった。

2. 研究の目的

葉酸代謝拮抗薬、特にMTAにおいて、効果予測因子として、TSやABCC11の役割を検討する。また化学療法としてのMTAとGEMやAra-Cの併用療法の有用性とその機序について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) MTAとGEMやAra-Cの併用療法の有用性とその機序

樹立したMTA耐性肺癌細胞株と親株におけるGEMやAra-Cの殺細胞効果をMTS assayを用いて検討する。またGEMやAra-Cの細胞内代謝に関わるdeoxycytidine kinase(dCK)やribonucleoside reductase subunit M1(RRM1)、薬剤の取り込み・排出に関わるhuman equilibrative nucleoside transporter 1(hENT1)やmultidrug resistance protein 5(ABCC5)の遺伝子発現についてreal-time PCRにより検討を行った。さらに白血病細胞株K562にMTA2.5nMを12時間曝露し、Ara-Cの感受性変化とdCK、RRM1、hENT1、ABCC5の遺伝子変化を検討した。

(2) MTA感受性規定因子としてのTS遺伝子増幅の検討

MTA耐性肺癌細胞株において、ターゲット遺伝子であるTSの発現上昇が耐性機序の1つであることを以前に示している。今回はTSの遺伝子増幅(コピー数)とMTAの効果との関連を調べるために、非小細胞非扁平上皮癌の肺癌細胞株および診断時に得られた肺癌組織からマイクロダイセクションにより切り出した肺癌細胞を用いてDNAを抽出し、real-time PCR法を用いて検討をおこなった。細胞株についてはMTAの殺細胞効果をMTS assayを用いて検討し、臨床検体については

一次化学療法として行われたプラチナ製剤とMTAの併用療法の治療効果を判定し、TS遺伝子コピー数との関連を調べた。

(3) MTA感受性規定因子としてのABCC11遺伝子多型の検討

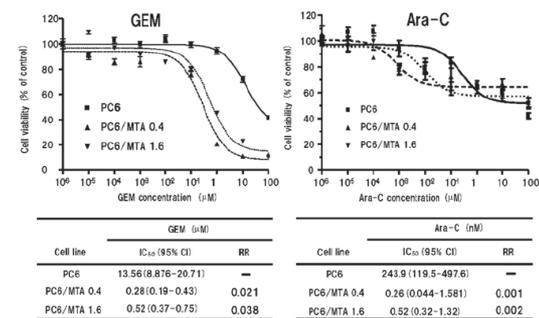
MTA耐性肺癌細胞株において、以前ABCC11遺伝子の上昇を確認し、MTA耐性へ関与していることを確認しているが、ABCC11は一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP, 538G>A)を有しており、この多型の違いによりMTA感受性の違いがあることも確認した。このため前立腺cDNAを鋳型としてヒトABCC11遺伝子(538G)とABCC11遺伝子(538A)を作成し、ベクターpcDNA3.1/V5-Hisへ組み込み、HeLa細胞へtransfectionすることにより、ABCC11SNPの強制発現細胞株HeLa-538G(V5)とHeLa-538A(V5)の樹立を行った。この樹立細胞でMTAやmethotrexate(MTX)の殺細胞効果をMTS assayを用いて検討を行い、またFPIA法により細胞内MTX濃度の変化を調べる。

またB+期または術後再発の一次化学療法としてプラチナ製剤とMTAの併用療法がおこなわれる非小細胞非扁平上皮癌患者より採取した血液サンプルからDNAを抽出し、taqman PCR法によりABCC11遺伝子の538塩基の多型を調べ、その治療効果との関連を調べる。

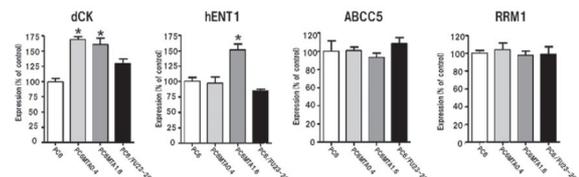
4. 研究成果

(1) MTAとGEMやAra-Cの併用療法の有用性とその機序

MTA耐性株(PC6/MTA0.4, PC6/MTA1.6)においてGEMやAra-Cの耐性は、親株PC-6と比較し低下していた。



MTA耐性株と親株においてdCK、RRM1、hENT1、ABCC5の遺伝子変化を検討したところ、耐性株でdCKとhENT1遺伝子の発現上昇を認めましたが、RRM1、ABCC5遺伝子発現には変化を認めなかった。

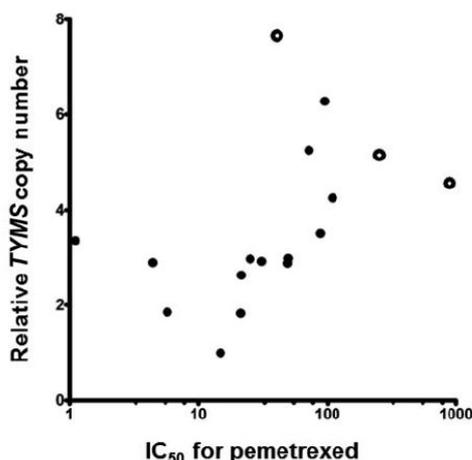


さらに白血病細胞株 K562 に MTA 2.5 nM を 12 時間曝露し、Ara-C の耐性変化と dCK、RRM1、hENT1、ABCC5 の遺伝子変化を検討したところ、K562 の Ara-C に対する耐性は MTA 曝露で低下し、dCK、hENT1 遺伝子発現の上昇ならびに RRM1、ABCC の遺伝子発現の低下を認めた。

以上の結果より MTA が cytotoxic nucleoside analogue の細胞内代謝に影響し、その殺細胞効果を高める可能性を明らかにし、臨床応用としての MTA 併用療法のあらたな展開につながるものと考えられた。

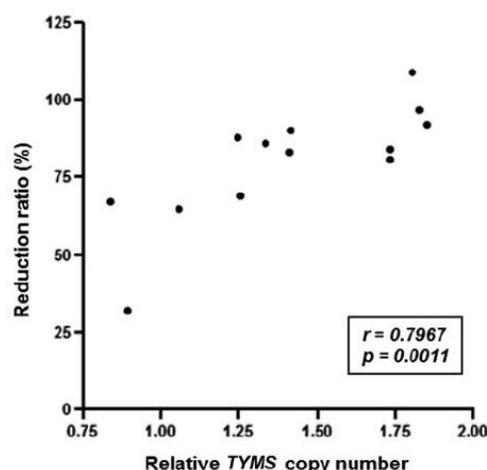
## (2) MTA 感受性規定因子としての TS 遺伝子増幅の検討

肺癌17細胞株(腺癌細胞14株と扁平上皮細胞3株)においてTS (TYMS) 遺伝子増幅(コピー数)を検討したところ、腺癌細胞株では扁平上皮癌と比較し、TS遺伝子コピー数は有意に低下していた。そこでMTA感受性とTS遺伝子コピー数との関連を調べたところ、肺癌細胞17株でTSコピー数とMTA感受性の間に有意な相関( $r=0.6814$ ,  $p=0.0026$ )を認めた。腺癌14細胞株だけでも有意な相関( $r=0.6747$ ,  $p=0.0081$ )を認めた。



次に 25 症例の肺癌診断時に得られた肺癌組織を用いて、マイクロダイセクションにより切り出した肺癌細胞を切り出し、DNA を抽出して、TS 遺伝子コピー数を調べた。用いた肺癌組織は、11 例の肺扁平上皮癌と 14 例の肺腺癌症例で、14 例の肺腺癌症例はすべてプラチナ製剤と MTA の併用療法を一次治療として受けていた。

細胞株と同様に肺癌検体においてもTS遺伝子コピー数を検討したところ、扁平上皮癌に比べ腺癌で有意に低下していた。腺癌症例において、計測可能病変が存在した13例において、治療の腫瘍縮小効果とTS遺伝子コピー数の関連を検討したところ、腫瘍の縮小率とTS遺伝子コピー数との間に有意な相関関係( $r=0.7967$ ,  $p=0.0011$ )を認めた。



以上の結果より TS 遺伝子コピー数は MTA 感受性と相関を認め、臨床でのプラチナ併用 MTA 治療における効果予測因子になり得る可能性を示した。

## (3) MTA 感受性規定因子としての ABCC11 遺伝子多型の検討

前立腺 cDNA を鋳型としてヒト ABCC11 遺伝子 (538G) と ABCC11 遺伝子 (538A) を作成し、ベクター-pcDNA3.1/V5-Hisへ組み込み、HeLa 細胞へ transfection し ABCC11SNP の強制発現細胞株 HeLa-538G(V5) と HeLa-538A(V5) を樹立した。

これら 2 つの ABCC11 遺伝子強制発現細胞株 HeLa-538G(V5) と HeLa-538A(V5) および親株において、MTA に対する殺細胞効果を比較したところ、HeLa-538G(V5) は親株と比較して約 28 倍の耐性を有していたのに対し、HeLa-538A(V5) は親株と同等であった。さらに MTX においても、HeLa-538G(V5) は親株と比較し約 8 倍の耐性を示したが、HeLa-538A(V5) は親株と同等であった。MTX2 時間曝露後の MTX 細胞内濃度を検討したところ、HeLa-538G(V5) は HeLa-538A(V5) や親株と比較し、有意に MTX の細胞内濃度の低下を認めた。以上の結果から ABCC11 遺伝子多型の違いにより、癌細胞内での葉酸代謝拮抗薬の濃度低下とその効果の違いが生じることが示された。

現在非小細胞非扁平上皮肺癌症例で一次治療としてプラチナ製剤と MTA の併用療法で治療を受けた症例で、治療効果と ABCC11 遺伝子多型との関連について、症例蓄積し今後検討予定である。

## 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)

Kasai D, Ozasa H, Oguri T, Miyazaki M,

Uemura T, Takakuwa O, Kunii E, Ohkubo H, Maeno K, Niimi A. Thymidylate Synthase gene copy number as a predictive marker for response to pemetrexed treatment in lung adenocarcinoma. Anticancer Res 33:1935-1940 2013. 査読有  
DOI: なし

Oguri-T, Ozasa H, Uemura T, Takakuwa O, Kunii E, Kasai D, Ohkubo H, Miyazaki M, Maeno K, Sato S. Preclinical rationale for synergistic interaction of pemetrexed and cytotoxic nucleoside analogues. Oncol Lett 4:571-575, 2012. 査読有  
DOI: 10.3892/ol.2012.773

〔学会発表〕(計4件)

笠井大嗣、小栗鉄也、小笹裕晃、上村剛大、國井英治、高桑修、大久保仁嗣、宮崎幹規、前野健、佐藤滋樹、新実彰男 Thymidylate synthase gene copy number as a predictive marker for response to pemetrexed treatment in lung adenocarcinoma. 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日~21日 東京

Uemura T, Oguri T, Ozasa H, Kasai D, Kunii E, Miyazaki M, Takakuwa O, Ohkubo H, Miyazaki M, Maeno K, Sato S A SNP538(G>A) in ABCC11/MRP8 determines sensitivity for antimetabolites. 103th Annual Meeting of American Association of Cancer Research 2012年3月31日-4月4日 Chicago, USA

Kasai D, Oguri T, Ozasa H, Uemura T, Kunii E, Miyazaki M, Takakuwa O, Ohkubo H, Miyazaki M, Maeno K, Sato S. Significance of thymidylate synthase copy numbers for resistance to pemetrexed in lung cancer. 103th Annual Meeting of American Association of Cancer Research 2012年3月31日-4月4日 Chicago, USA

笠井大嗣、小栗鉄也、小笹裕晃、上村剛大、高桑修、國井英治、大久保久嗣、宮崎幹規、前野健、中村敦、佐藤滋樹  
Pemetrexed 治療効果予測因子としてのTS 遺伝子増幅の有用性についての基礎的検討 第52回日本肺癌学会2011年11月3日 - 4日 大阪

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小栗 鉄也 (OGURI, Tetsuya)  
名古屋市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号: 60363925