

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 5 日現在

機関番号：12501  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659936  
 研究課題名（和文）アルドースケトース還元酵素による抗癌剤多剤耐性機構を阻害した新規強化化学療法  
 研究課題名（英文）Development of enhancement chemotherapy by overcoming an anti-cancer resistant mechanism of AKR1C family  
 研究代表者  
 椎葉 正史（SHIIBA MASASHI）  
 千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
 研究者番号：20301096

研究成果の概要（和文）：抗癌剤耐性株で高発現している遺伝子をマイクロアレイ解析にて検索し、AKR1C 遺伝子群に注目した。siRNA による AKR1C 抑制により、CDDP と 5-FU 耐性が減少することを見つけ、AKR1C 阻害剤であるメフェナム酸による AKR1C 遺伝子抑制でも同様の結果を得た。in vitro の結果を踏まえ in vivo 実験を行ったところ、抗癌剤耐性株を接種したマウスに CDDP や 5-FU と併用してメフェナム酸と投与したところ腫瘍の増殖が抑制された。CDDP、5-FU とメフェナム酸の併用療法の毒性試験も in vitro, in vivo で行い毒性が低く、臨床応用可能であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using microarray analysis, AKR1C family were up-regulated in all CDDP-resistant cell lines compared with CDDP-sensitive cell lines. We treated the chemoresistant cells with AKR1C siRNA or specific AKR1C inhibitor, mefenamic acid. In vivo, the antitumor growth effect of the combination therapy of mefenamic acid and CDDP/5-FU was greater than that with either mefenamic acid alone or CDDP/5-FU alone. In conclusion, combination CDDP and 5-FU chemotherapy with mefenamic acid might be a great therapeutic system for chemoresistant OSCC. Toxicity of combination therapy of CDDP/5-FU and mefenamic acid was evaluated in vitro and in vivo, resulting in the recognition of the safety for the clinical application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アルドースケトース還元酵素、口腔癌、マイクロアレイ解析、抗癌剤多剤耐性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

抗癌剤治療は近年長足の進歩を遂げたが、抗癌剤が初期治療時から効かない症例や、最初は効果があっても抗癌剤が効かなくなる症例にしばしば遭遇する。もし、現在の治療法で得られるよりも長期に抗癌剤の効果をj得ることができたなら、社会にとって大きな利益となる。このためには抗癌剤の耐性を克服することが必須である。本研究は遺伝子治

療のような高価で煩雑な手続きや、特定の施設でしかできない治療法ではなく、安価で特別な手続きが不要で、世界中どんな医療機関でも使用可能な薬剤を用いた抗癌剤との併用療法による薬剤耐性の克服法を開発するものである。

## 2. 研究の目的

シスプラチン耐性は頭頸部扁平上皮癌治

療の主要な障壁である。この耐性の分子生物学的メカニズムを明らかにするため、我々はシスプラチン感受性扁平上皮癌細胞株とシスプラチン耐性扁平上皮癌細胞株をマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを行い、シスプラチン耐性株においてaldo-keto reductase 1C (AKR1C) の発現上昇を確認した。本研究では、マウスを用いた前臨床試験までを行い、数種類ある AKR 阻害剤による抗癌剤耐性克服能を評価し、各種薬剤に最適な AKR 阻害剤の種類と濃度、投与スケジュールを明らかにし、AKR 阻害剤による抗癌剤耐性の克服による強化化学療法を開発することを目的としている。

### 3. 研究の方法

過去の研究において確立された CDDP 耐性株と親株を用いて以下の実験を行う。

- (1) *in vitro* において、数種類の AKR 阻害剤と各種抗癌剤 (CDDP, CBDCA, Neda, L-OHP などの白金系抗癌剤, 5-FU, タキサン系抗癌剤) との最適な組み合わせを検討する。
- (2) *in vitro* において、各組み合わせに対する至適濃度を明らかにする。
- (3) 同様な検討をマウス移植癌に対して *in vivo* で行う。 *in vivo* において、投与スケジュールを検討し、最適な治療スケジュールを求める。

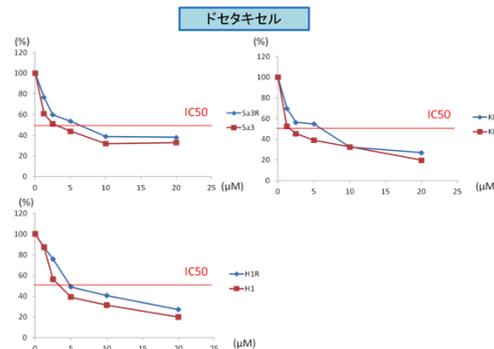
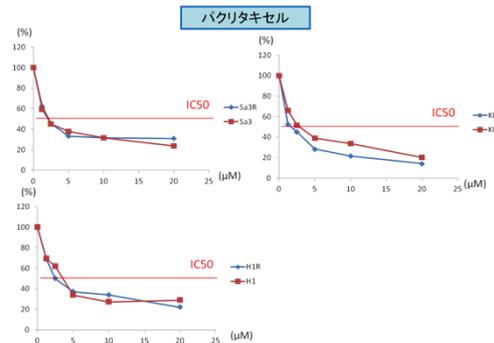
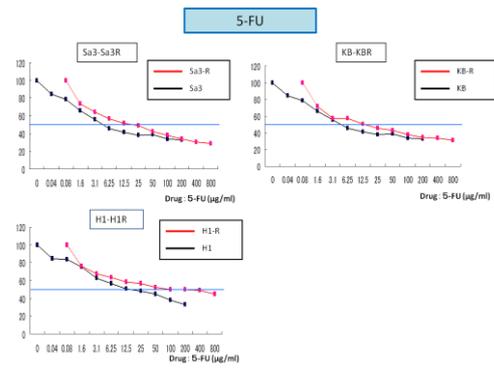
### 4. 研究成果

我々は AKR1C 遺伝子が多くの抗癌剤耐性癌腫において高発現していること明らかにした。

Gene Name	H1-R/H1	Sa3-R/Sa3	KB-R/KB
AKR1C1	9.08	3.51	2.73
AKR1C2	8.95	3.73	8.54
AKR1C3	3.18	3.93	2.91
AKR1C4	8.25	2.06	8.45
CA2	2.17	2.75	5.10
CRIP2	3.10	2.17	4.47
GRN	2.80	2.20	2.25

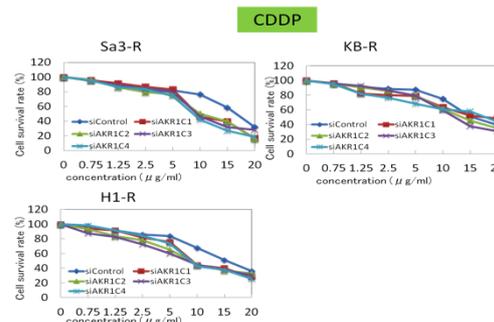
(抗癌剤耐性株 : H1-R, Sa3-R, KB-R 親株 : H1, Sa3, KB)

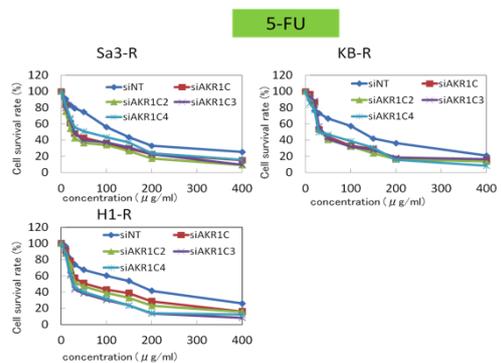
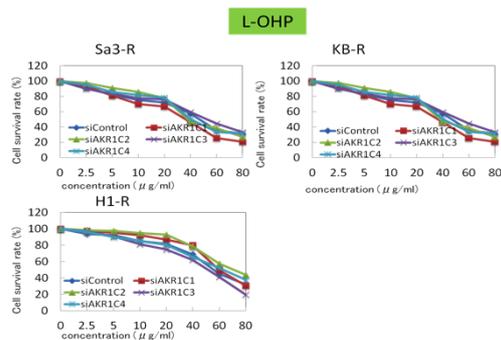
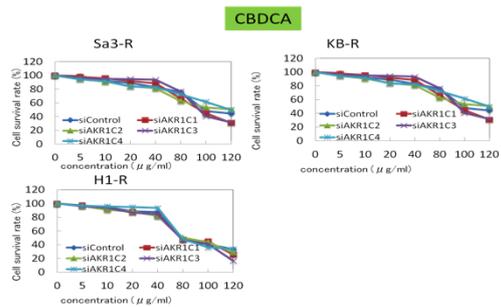
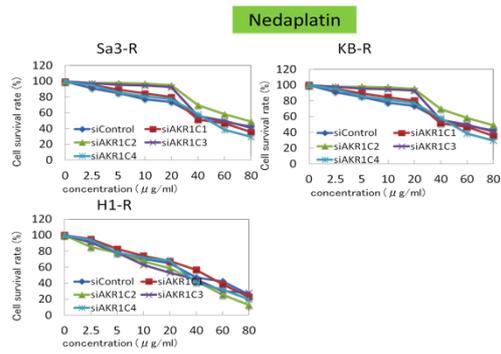
我々は、当科で保有している CDDP 耐性株が、CDDP を含む白金系抗癌剤に耐性であることを過去に報告している (Cross-resistance of platinum derivatives in H1-R, acisplatin-resistant cell line, *Oncol Rep.* 2008 Feb;21(2):443-9) が、今回フツ化ピリミジン系抗癌剤、タキサン系抗癌剤に耐性であるかをまず確認した。



その結果、フルオロウラシル(5-FU)に対して CDDP 耐性株が耐性を示すことが明らかになった。タキサン系抗癌剤に関しては明らかではなかった。

これらの結果を踏まえ、白金系抗癌剤 (CDDP, Neda, CBDCA, L-OHP) と 5-FU 耐性には AKR1C 遺伝子が関与している可能性を考え、siRNA にて AKR1C を阻害し、抗癌剤耐性の変化を観察した。





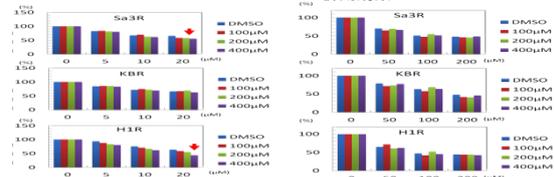
CDDP と 5-FU に関して、AKR1C 遺伝子を抑制すると抗腫瘍剤耐性株における抗腫瘍剤耐性が、減少することがわかった。これらの結果から AKR1C が CDDP と 5-FU の耐性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

AKR1C の阻害剤が NSAIDs であることは過去に報告されている (Byrns MC, et al. Chem Biol Interact 178, 2009)。その中でも特にメフェナム酸が AKR1C ファミリー全てに対し

て抑制効果を持つことから、メフェナム酸を用いて AKR1C を阻害し抗腫瘍剤の効果がどう変化するかを観察した。

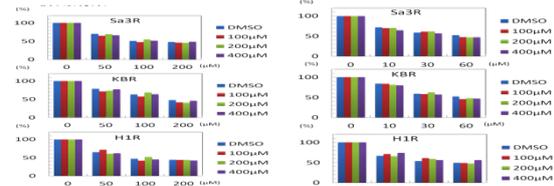
メフェナム酸と CDDP の併用効果

メフェナム酸と CBDCA の併用効果

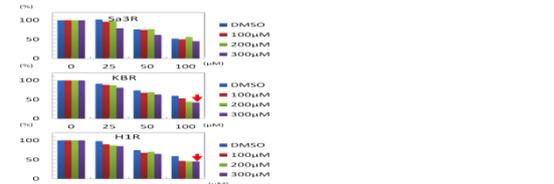


メフェナム酸と L-OHP の併用効果

メフェナム酸と Nedaplatin の併用効果



メフェナム酸と 5-FU の併用効果

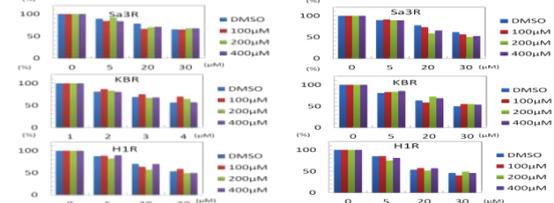


CDDP と 5-FU において、メフェナム酸による AKR1C タンパク質阻害効果により、siRNA の結果と同様に、抗腫瘍剤耐性株の抗腫瘍剤耐性が減弱することが確認できた。CDDP 以外の白金系抗腫瘍剤では、抗腫瘍剤耐性の減少は見られず、これは siRNA 結果に矛盾しなかった。

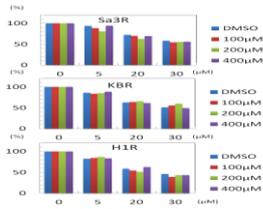
AKR1C 阻害剤として報告されている NSAIDs にはメフェナム酸、プロピオン酸、サリチル酸、アリール酢酸などがある。報告によればメフェナム酸が最も AKR1C ファミリーを抑制する効果があるとされているが、我々の実験系において最も効果がある阻害剤を明らかにするため、プロピオン酸、サリチル酸、アリール酢酸と各種抗腫瘍剤の併用効果を調べた。

プロピオン酸と CDDP 併用効果

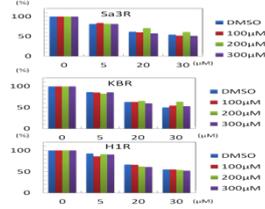
プロピオン酸と CBDCA 併用効果



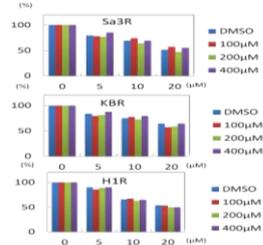
プロピオン酸とL-OHP 併用効果



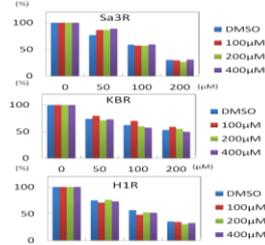
プロピオン酸と Nedaplain 併用効果



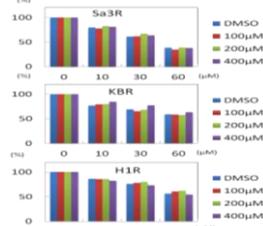
サリチル酸と CDDP 併用効果



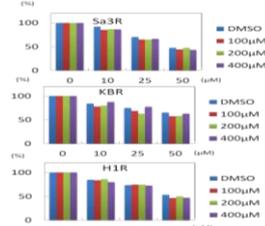
サリチル酸と CBDCA 併用効果



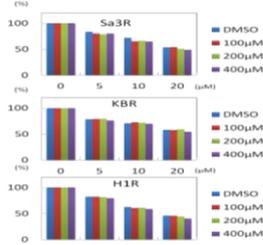
サリチル酸と Nedaplatin 併用効果



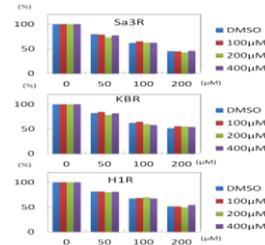
サリチル酸と L-OHP 併用効果



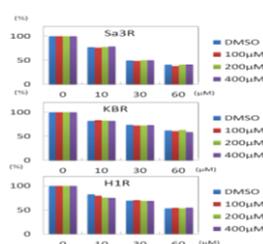
アリール酢酸と CDDP 併用効果



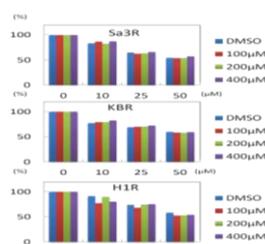
アリール酢酸と CBDCA 併用効果



アリール酢酸と Nedaplatin 併用効果

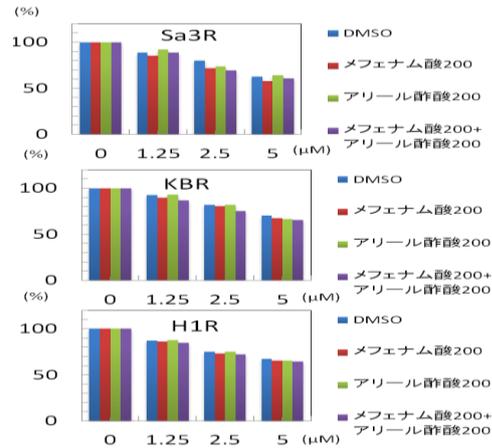


アリール酢酸と L-OHP 併用効果



プロピオン酸、サリチル酸、アリール酢酸と各種抗癌剤では、抗癌剤耐性抑制効果は明らかではなかった。アリール酢酸とCDDP併用では抗癌剤耐性抑制の傾向が見られたが有意差はなかった。

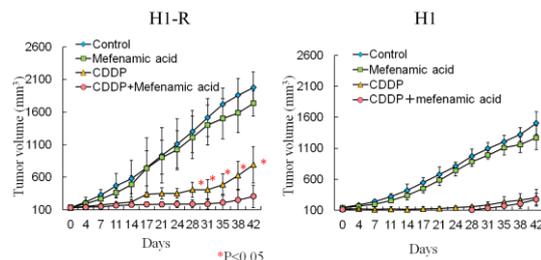
2剤併用(アリール酢酸+メフェナム酸)とCDDP



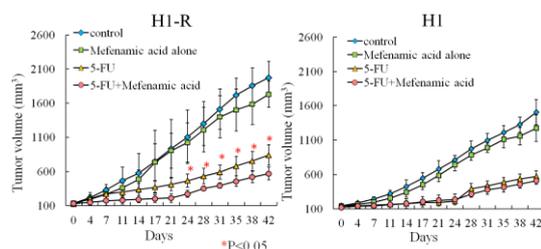
アリール酢酸とメフェナム酸を併用したときの、CDDP耐性抑制の変化を調べたが、メフェナム酸単独以上の耐性克服能はなかった。このことから、AKRIC阻害剤としてメフェナム酸が最も効果的であることがわかった。

これらの結果は、メフェナム酸を用いてAKRICを阻害すると、CDDPや5-FU耐性癌腫に対しても、効果的な抗癌剤治療を行えることを意味している。in vitroの結果を踏まえてin vivoにおいても同様の結果が得られるか検討した。ヌードマウスに抗癌剤耐性株と親株を接種し、メフェナム酸を与える系と与えない系、さらにCDDPまたは5-FUを与える系と与えない系にわけ実験を行った。

ヌードマウスに対してCDDP、メフェナム酸を投与した際の腫瘍体積の推移



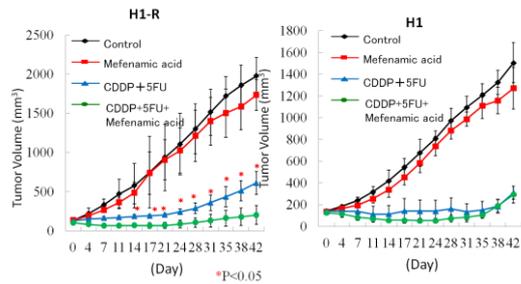
ヌードマウスに対して5-FU、メフェナム酸を投与した際の腫瘍体積の推移



CDDPと5-FUともに耐性株を接種した系にメフェナム酸と抗癌剤を併用すると、抗癌剤の効果が増強した。親株ではそのような効果は見られなかった。この結果はin vitroの結果と一致した。臨床においてCDDPと5-FU

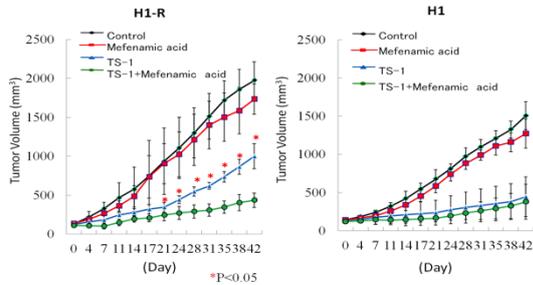
はしばしば併用されるが、CDDP と 5-FU、メフェナム酸を併用することを考え、その系での確認も行った。

ヌードマウスに対してCDDP、5FU、メフェナム酸を投与した際の腫瘍体積の推移



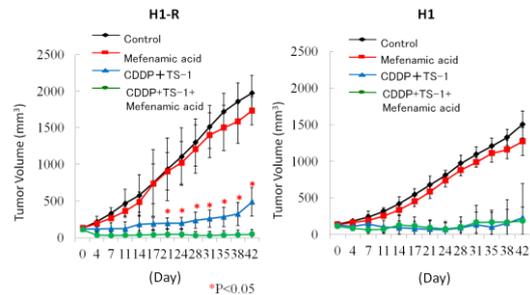
その結果 CDDP と 5-FU 併用時にメフェナム酸を投与すると、やはり抗癌剤の効果が増強することが確認できた。

ヌードマウスに対してTS-1、メフェナム酸を投与した際の腫瘍体積の推移



5-FU 耐性がメフェナム酸投与によって抑制されることがわかったため、口腔癌治療で多用される経口薬、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム (TS-1) でも同様の傾向が見られるか in vivo で検討した。その結果、耐性株の TS-1 耐性はメフェナム酸投与によって抑制されることが確認できた。

ヌードマウスに対してCDDP、TS-1、メフェナム酸を投与した際の腫瘍体積の推移



また、CDDP と TS-1 併用時におけるメフェナム酸投与も、耐性株でのその耐性を抑制する結果を得られた。

以上の結果から、CDDP、5-FU 耐性癌腫において AKR1C 遺伝子は耐性機構に重要な役割を果たし、それを阻害することで抗癌剤耐性が克服されることが明らかになった。今後新しい治療システムとしてさらなる治験を得るため、臨床試験を行う予定である。

## 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)

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎葉 正史 (SHIIBA MASASHI)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20301096

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：