

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：87701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461703

研究課題名(和文) 有棘細胞癌・乳房外パジェット病における新規化学療法レジメンの確立と個別化への応用

研究課題名(英文) Establishment and individualization of new chemotherapy regimen in squamous cell carcinoma and extramammary Paget's disease

研究代表者

松下 茂人 (Matsushita, Shigeto)

独立行政法人国立病院機構鹿児島医療センター(臨床研究部)・その他部局等・医長

研究者番号：30380778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：有棘細胞癌(SCC)、乳房外パジェット病(EMPD)は、進行すると遠隔転移を来し致命的となるが症例が少なく、化学療法の臨床第II相試験が皆無である。化学療法の効果や機序に関する基礎・臨床研究が望まれる。近年、進行期SCC・EMPDに、フッ化ピリミジン系抗がん剤の5FUやS-1の有用性が報告されている。チミジンホスホリラーゼ(TP)はフッ化ピリミジン系の代謝酵素でありTPによる5FUの抗腫瘍効果の増強作用のメカニズムを基礎的に評価して臨床応用が可能か検討した。TPが発現した進行期EMPDにフッ化ピリミジン系抗がん剤+タキサン系抗がん剤の効果が認められており臨床的な有用性を詳細に検討した。

研究成果の概要(英文)：Advanced cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) and extramammary Paget's disease (EMPD) develop to distant metastases and show poor prognosis. Because the number of advanced cSCC and EMPD is limited, no randomized clinical phase II trials has been performed. Recent reports show the effectiveness of fluoropyrimidine, 5-fluorouracil (5FU) and S-1, a drug containing a 5FU derivative against metastatic cSCC and EMPD. Thymidine phosphorylase (TP) is known to be a metabolic enzyme of fluoropyrimidine. We previously demonstrated that TP increased the anti-cancer effect of 5FU in vitro study. We also reported the dramatic effect of S-1 and taxane combination chemotherapy in a patient with TP-expressing advanced EMPD.

In this study, we evaluated the molecular basis of increased sensitivity of fluoropyrimidine in TP-expressing tumors, and we also confirmed the effectiveness and progression-free survival time of S-1 and taxane combination chemotherapy for metastatic EMPD.

研究分野：皮膚科学

キーワード：有棘細胞癌 乳房外パジェット病 チミジンホスホリラーゼ フッ化ピリミジン系抗がん剤 タキサン系抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

皮膚がんの中で有棘細胞癌 (SCC)、乳房外パジェット病 (EMPD) は、進行すると遠隔転移を来し致命的となる。これらの皮膚がんはがん化学療法の対象となる症例が少ないためランダム化比較試験はおろか、臨床第 II 相試験も皆無である。こういった臨床試験の早期進展のためにも、化学療法の効果や機序に関する信用性の高い基礎研究が望まれる。近年、進行期 SCC・EMPD の転移巣に対して、フッ化ピリミジン系抗がん剤である 5FU やそのプロドラッグである S-1 の効果が期待できる報告が散見されている。

一方、チミジンホスホリラーゼ (TP) はフッ化ピリミジン系抗がん剤の代謝酵素で、SCC をはじめ多くの上皮系腫瘍で発現が亢進している。我々はこれまでに、5FU による抗腫瘍効果を TP が増強し、TP を介した 5FU の血管新生抑制作用に thrombospondin-1 の発現が関わることを *in vitro* の研究で明らかにした。

さらに、遠隔転移した進行期 EMPD に対してフッ化ピリミジン系抗がん剤と併せて、タキサン系抗がん剤が使用され、その効果が認められることが報告されている。進行期 EMPD に対するフッ化ピリミジン系抗がん剤 + タキサン系抗がん剤併用療法における有効性について検討することが望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、フッ化ピリミジン系抗がん剤治療での TP の関与の解明を行い、フッ化ピリミジン系抗がん剤治療の効果予測因子を同定して、新規化学療法レジメンの確立と個別化への応用を目指すことを目的としたものである。また、遠隔転移した進行期 EMPD に対してフッ化ピリミジン系抗がん剤と併せて、タキサン系抗がん剤が使用されており、その有効性について臨床の面から評価した。

3. 研究の方法

1) ヒトがん細胞株 KB/CV 細胞と TP を強制発現させた KB/TP 細胞に 5FU を加えて培養し 5FU の感受性を MTT アッセイ法で解析した。

2) 複数のがん細胞株 (ACHN、KB-3-1、HepG2、MCF-7、S1、SW620、U937、Yumoto) の TP の発現をイムノプロット法で解析した。

3) TP の発現が認められたがん細胞株に TP 阻害剤を加え 5FU に対する感受性試験 (MTT アッセイ) を行った。

4) TP の発現を制御する転写因子の同定は、標的遺伝子特異的な siRNA を用いてその転写因子を抑制した後、RT-PCR 法およびイムノプロット法により、TP の発現量を調べた。

5) 臨床応用および臨床効果については、フッ化ピリミジン系抗がん剤 S-1 + タキサン系抗がん剤 Docetaxel 併用療法を 6 例の進行期 EMPD 患者で行い、奏効性や無増悪生存期間について検討した。

4. 研究成果

ヒトがん細胞株 KB/CV 細胞と TP を強制発現させた KB/TP 細胞に 5FU を加えて培養し MTT アッセイを実施したところ、TP 発現細胞は 5FU に対し感受性を示した。また、複数のがん細胞株 (ACHN、KB-3-1、HepG2、MCF-7、S1、SW620、U937、Yumoto) の TP の発現をイムノプロット法で解析したところ、ヒト由来乳がん細胞株である MCF-7 に TP の発現が認められた。TP の発現が認められた MCF-7 細胞株に TP 阻害剤 (TPI) を加え 5FU に対する感受性試験 (MTT アッセイ) を行ったところ、TPI によって 5FU の感受性の低下が認められた。さらに、TP のプロモーター領域には、6 個の Sp1、STAT1 の結合領域である gamma-activated sequences (GAS)、interferon stimulated response element (ISRE) が確認されている。そこで、Sp1 特異的な siRNA を用いてその転写因子を抑制した後、TP の発現を RT-PCR 法およびイムノ

ロット法で調べたところ、Sp1 の発現を抑制することで、TP の発現も抑制された。この結果から TP の発現は Sp1 によって制御されていることが明らかとなった。

遠隔転移した進行期 EMPD に対してフッ化ピリミジン系抗がん剤と併せて、タキサン系抗がん剤が使用され、その効果が認められている。TP はタキサン系抗がん剤によって誘導されるという報告から、進行期 EMPD に対するフッ化ピリミジン系抗がん剤 + タキサン系抗がん剤併用療法について検討した。6 例の進行期 EMPD での奏効率は 83.3%(PR5 例)、疾患制御率は 100%(PR5 例、SD1 例)であり、さらに全生存期間中央値 9 ヶ月であり、EMPD に対する既存のがん化学療法に比べて高い奏効性・疾患制御性を示した。

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 13 件)

Yoshino K, Fujisawa Y, Kiyohara Y, Kadono T, Murata Y, Uhara H, Hatta N, Uchi H, Matsushita S, Takenouchi T, Hayashi T, Ohara K. Usefulness of docetaxel as first-line chemotherapy for metastatic extramammary Paget's disease. *J Dermatol*. 査読有, 43, 2016, 633-637.

DOI: 10.1111/1346-8138.13200.

Fujisawa Y, Yoshino K, Kiyohara Y, Kadono T, Murata Y, Uhara H, Hatta N, Uchi H, Matsushita S, Takenouchi T, Hayashi T, Fujimoto M, Ohara K. The role of sentinel lymph node biopsy in the management of invasive extramammary Paget's disease: Multi-center, retrospective study of 151 patients. *J Dermatol Sci*. 査読有, 79, 2015, 38-42.

DOI: 10.1016/j.jderm.2015.03.014.
Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D, Matsushita S, Fujii K, Fukushima S, Shibayama Y, Hatta N, Takenouchi T, Uehara J, Okuyama R, Yamazaki N, Uhara H. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci*. 査読有, 80, 2015,

33-37.

DOI: 10.1016/j.jderm.2015.07.012.
Otsuka A, Dreier J, Nägeli M, Cheng P, Lehmann H, Felderer L, Frew I, Matsushita S, Levesque MP, and Dummer R. Hedgehog pathway inhibitors promote adaptive immune responses in Basal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 査読有, 21, 2015, 1289-1297.

DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2110.

Matsushita S, Krähenbühl L, Otsuka A, Mihic-Probst D, Cheng P, Dummer R, Goldinger SM. Histological evaluation of a "residual" metastasis after ipilimumab therapy in a patient with advanced melanoma. *J Dermatol*. 査読有, 42, 2015, 927-928.

DOI: 10.1111/1346-8138.12964.

Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y, Tabata S, Ikeda R, Kawahara K, Tsujikawa K, Chijiwa K, Yamada K, Akiyama S, Pérez-Torras S, Pastor-Anglada M, Furukawa T, Takeda Y. Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 127, 2015, 319-325.

DOI: 10.1016/j.jphs.2015.01.006.

Ikeda R, Nishizawa Y, Tajitsu Y, Minami K, Mataka H, Masuda S, Furukawa T, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y. Regulation of major vault protein expression by upstream stimulating factor 1 in SW620 human colon cancer cells. *Oncol Rep*. 査読有, 31, 2014, 197-201.

DOI: 10.3892/or.2013.2818.

Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, Yamada K, Soga T, Furukawa T, Akiyama S. Thymidine phosphorylase activates NF B and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells. *Oncotarget*. 査読有, 5, 2014, 10473-10485.

DOI: 10.18632/oncotarget.2242.

Wang J, Ikeda R, Che X F, Ooyama A, Yamamoto M, Furukawa T, Hasui K, Zheng C L, Tajitsu Y, Oka T, Tabata S, Nishizawa Y, Eizuru Y, Akiyama S. VEGF expression is augmented by hypoxia-induced PGIS in human fibroblasts. *Int J Oncol*. 査読有, 43, 2013, 746-754.

DOI: 10.3892/ijo.2013.1994.

Ikeda R, Tabata S, Tajitsu Y, Nishizawa Y, Minami K, Furukawa T,

Yamamoto M, Shinsato Y, Akiyama S, Yamada K, Takeda Y. Molecular basis for the regulation of hypoxia-inducible factor-1 levels by 2-deoxy-D-ribose. *Oncol Rep.* 査読有, 30, 2013, 1444-1448.

DOI: 10.3892/or.2013.2572.

Tajitsu Y, Ikeda R, Nishizawa Y, Mataka H, Che X F, Sumizawa T, Nitta M, Yamaguchi T, Yamamoto M, Tabata S, Akiyama S, Yamada K, Furukawa T, Takeda Y. Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells. *Int J Mol Med.* 査読有, 32, 2013, 703-708.

DOI: 10.3892/ijmm.2013.1428.

Tamai M, Matsushita S, Miyahara H, Imuta N, Ikeda R, Kawai K, Nishi J, Sakamoto A, Shigihara T, Kanekura T. Antimicrobial effect of an ultrasonic levitation washer disinfectant with silver electrolysis and ozone oxidation on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Dermatol.* 査読有, 40, 2013, 1020-1026.

DOI: 10.1111/1346-8138.12327.

Matsushita S, Hatanaka M, Katsue H, Kawai K, Kanekura T. Possible Effectiveness of Lymph Node Dissection in Patients with Extramammary Paget's Disease. *J Dermatol.* 査読有, 40, 2013, 574-575.

DOI: 10.1111/1346-8138.12173.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 茂人 (Matsushita, Shigeto)

独立行政法人国立病院機構鹿児島医療センター (臨床研究部)・その他部局等・医長

研究者番号：30380778

(2) 研究分担者

金蔵 拓郎 (Kanekura, Takuro)

鹿児島大学・歯学域医学系・教授

研究者番号：70177509

池田 龍二 (Ikeda, Ryuji)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院
・准教授

研究者番号：50398278

(3) 連携研究者

()

研究者番号：