

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461159

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫のペメトレキセド耐性を克服する新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new clinical cure to overcome pemetrexed tolerance for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

清水 英治 (SHIMIZU, EIJI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50187449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫の化学療法としてペメトレキセドが用いられているが、ペメトレキセドによる耐性化が問題となっている。そこで、我々は、ペメトレキセド耐性細胞株を作成し、耐性化に関与する分子を明らかにし、ペメトレキセド耐性を克服する新たな治療法の探索を行った。その結果、耐性化にはAktの発現量の増大が関与していることを発見した。そして、耐性化の克服治療法としては、ペメトレキセドとBEZ235を併用することにより有意な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pemetrexed is used as chemotherapy of the malignant pleural mesothelioma, however, the resistance for pemetrexed is now increasing problem. Therefore, we made pemetrexed-resistant cell lines. Using these cell lines, we searched for the resistant related molecules and pathways and a new clinical cure to overcome pemetrexed resistance. As a result, we found that increasment of the expression of Akt in resistant cell lines. Finally, for a conquest cure for the resistance, we demonstrated that the combination therapy of pemetrexed and BEZ235 has significant antitumor effect for the pemetrexed resistant cell lines, and that this combination is potential promising therapy to overcome pemetrexed resistance in malignant pleural mesothelioma.

研究分野：医歯薬学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 ペメトレキセド 臨床呼吸器学

### 1. 研究開始当初の背景

胸膜中皮腫は胸膜原発の悪性腫瘍である。アスベスト暴露後40年前後の潜伏期を経て発病するため、国内での使用が禁止された後もその患者数は増加している。ペメトレキセドは悪性胸膜中皮腫に対する化学療法剤であり、臨床Ⅲ相試験の結果からシスプラチンとペメトレキセドの併用が標準的とされている。中間生存期間は12ヶ月と満足すべきものではない。この理由として治療経過中にペメトレキセドの化学療法剤に対する耐性が出現し、効果が減弱することが考えられる。耐性を獲得した患者には十分かつ有効な治療方法が存在しない。そこで、耐性を克服するための、新しい治療法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

ペメトレキセド感受性の胸膜中皮腫細胞株に、ペメトレキセド長期暴露により耐性細胞株を樹立した。このペメトレキセド耐性胸膜中皮腫細胞株を用いて、その遺伝子発現プロファイルを親細胞株と比較することにより、ペメトレキセド耐性を付与する分子を明らかにし、これを制御する分子を用いることによるペメトレキセド耐性克服治療方法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ペメトレキセド耐性中皮腫細胞株を用いた耐性機序の解明

ペメトレキセド感受性の親細胞株と、この細胞にペメトレキセドを低濃度より徐々に濃度を上げていき約1年継代培養を繰り返して樹立した耐性細胞株を用いて、DNAマイクロアレイによる網羅的発現遺伝子比較を行った。2細胞株間で遺伝子発現量の変化のあった遺伝子群について定量的PCR法とウェスタンブロット法を行い、その結果を検証し、2細胞株間で発現量が異なる分子と、それを含むシグナル伝達経路がペメトレキセド耐性に関わる遺伝子候補を発見した。

(2) 耐性機序の分子阻害によるペメトレキセド耐性克服分子標的治療

発見したペメトレキセド耐性に関わる分子、分子経路が、それらの阻害剤による細胞増殖能をWST-8により測定した。また、ペメトレキセドと分子阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果を測定した。

(3) ペメトレキセド耐性克服治療法の in vivo による検討

胸膜中皮腫細胞を、NK細胞を持つマウス胸腔へ移植したマウスモデルを用いて、耐性関連分子阻害剤によるペメトレキセド耐性克服効果を in vivo で検討した。

### 4. 研究成果

(1) 親株の胸膜中皮腫細胞株とペメトレキセド耐性細胞株のDNAマイクロアレイを行った結果、耐性細胞株のEGFRの発現は抑制し

ていたが、PI3KおよびGPCRの発現は増加していた。次に、これらの分子およびその下流系分子のタンパク質発現量をウェスタンブロット法により確認した結果、親株と比べてペメトレキセド耐性細胞株のAktおよびmTOR下流系のp70S6KとS6の発現量が増加していた。これらの結果から、ペメトレキセド耐性化に関わる分子は、PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路分子であることを発見した。これらの分子が活性化されていることにより、細胞増殖が維持されていることが判明した。

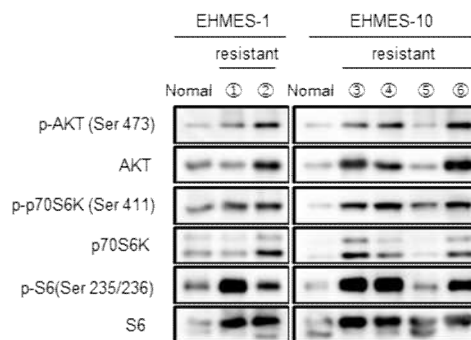


図1 親株とペメトレキセド耐性細胞株における関与分子のタンパク質発現量 (ローディングコントロール:  $\beta$ -actin)

(2) 発見したペメトレキセド耐性に関わるPI3Kとその下流系分子であるAkt、mTORの阻害剤による細胞増殖能をWST-8により測定した。その結果、親株と比べて細胞増殖抑制に変化はなかった。しかし、ペメトレキセドと阻害剤との併用による細胞増殖能を測定した結果、PI3KとmTOR阻害剤であるBEZ235との併用効果を認めた。

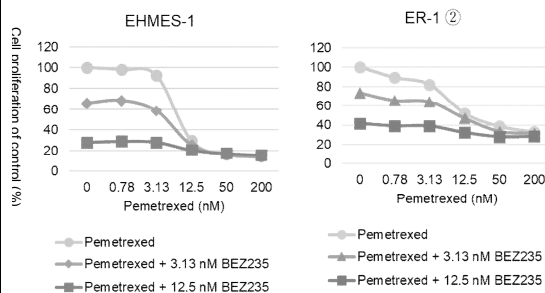


図2 中皮腫細胞の親株と耐性細胞株におけるペメトレキセドとBEZ235との併用による細胞増殖抑制効果

(3) 親細胞とペメトレキセド耐性細胞を移植したマウスモデルに、PI3KとmTOR阻害剤であるBEZ235投与による抗腫瘍効果を確認した。

### 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10件)

- ① Funaki Y, Hasegawa Y, Okazaki R, Yamasaki A, Sueda Y, Yamamoto A, Yanai M, Fukushima T, Harada T, Makino H,

- Shimizu E. Resolvin E1 Inhibits Osteoclastogenesis and Bone Resorption by Suppressing IL-17-induced RANKL Expression in Osteoblasts and RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *Yonago Acta Med.* 2018 Mar 28;61(1):8-18. eCollection 2018 Mar. 査読有  
<http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/Repository/metadata/5536>
- ② Akamatsu Y, Morishita S, Okamoto R, Okada K, Kitaura T, Miyake N, Yamaguchi K, Nakamoto M, Shimohiro H, Takata M, Yamasaki A, Burioka N, Shimizu E. Evaluation of antigen-positive toxin-negative enzyme immunoassay results for the diagnosis of toxigenic *Clostridium difficile* infection. *J Med Invest.* 2018;65(1.2):131-135. 査読有 DOI: 10.2152/jmi.65.131.
- ③ Izumi H, Igishi T, Yamasaki A, Takeda K, Yanai M, Tanaka N, Sakamoto T, Nishii-Ito S, Touge H, Kodani M, Matsumoto S, Kawasaki Y, Shimizu E. Development of fever following first administration of zoledronate as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients with bone metastases. *Mol Clin Oncol.* 2017 Dec;7(6):1000-1004. 査読有 DOI: 10.3892/mco.2017.1447. Epub 2017 Oct 10.
- ④ Sakamoto T, Yamasaki A, Funaki Y, Harada T, Okazaki R, Hasegawa Y, Sueda Y, Fukushima T, Morita M, Yamamoto A, Kodani M, Shimizu E. An onion farmer with a case of hypersensitivity pneumonitis caused by *Aspergillus niger*. *Respir Med Case Rep.* 2017 Dec 8;23:60-62. 査読有 DOI:10.1016/j.rmcr.2017.12.002. eCollection 2018.
- ⑤ Izumi H, Kodani M, Matsumoto S, Kawasaki Y, Igishi T, Shimizu E. A case of lung abscess successfully treated by transbronchial drainage using a guide sheath. *Respirol Case Rep.* 2017 Mar 24;5(3):e00228. 査読有 DOI:10.1002/rcr2.228. eCollection 2017 May.
- ⑥ Fukushima T, Yamasaki A, Harada T, Chikumi H, Watanabe M, Okazaki R, Takata M, Hasegawa Y, Kurai J, Yanai M, Yamamoto A, Sueda Y, Halayko AJ, Shimizu E.  $\gamma$ -Tocotrienol Inhibits TGF- $\beta$  1-Induced Contractile Phenotype Expression of Human Airway Smooth Muscle Cells. *Yonago Acta Med.* 2017 Mar 9;60(1):16-23. eCollection 2017 Mar. 査読有  
<http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/Repository/metadata/5352>
- ⑦ Yanai M, Makino H, Ping B, Takeda K, Tanaka N, Sakamoto T, Yamaguchi K, Kodani M, Yamasaki A, Igishi T, Shimizu E. DNA-PK Inhibition by NU7441 Enhances Chemosensitivity to Topoisomerase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells by Blocking DNA Damage Repair. *Yonago Acta Med.* 2017 Mar 9;60(1):9-15. eCollection 2017 Mar. 査読有  
<http://repository.lib.tottori-u.ac.jp/Repository/metadata/5425>
- ⑧ Takeda K, Yamasaki A, Igishi T, Kawasaki Y, Ito-Nishii S, Izumi H, Sakamoto T, Touge H, Kodani M, Makino H, Yanai M, Tanaka N, Matsumoto S, Araki K, Nakamura H, Shimizu E. Frequency of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Smokers with Lung Cancer Without Pulmonary Emphysema. *Anticancer Res.* 2017 Feb;37(2):765-771. 査読有  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179328>
- ⑨ Izumi H, Kurai J, Kodani M, Watanabe M, Yamamoto A, Nanba E, Adachi K, Igishi T, Shimizu E. A novel SLC34A2 mutation in a patient with pulmonary alveolar microlithiasis. *Hum Genome Var.* 2017 Jan 26;4:16047. 査読有 DOI: 10.1038/hgv.2016.47. eCollection 2017.
- ⑩ Touge H, Tomita K, Yamasaki A, Shimizu E. A case of proteinase 3 anti-neutrophil cytoplasmic antibody (PR3-ANCA) positive/IgG4-related lung disease. *Respir Med Case Rep.* 2017 Jan 6;20:92-94. 査読有 DOI:10.1016/j.rmcr.2017.01.001. eCollection 2017.
- [学会発表] (計5件)
- ① 武田賢一、桑本聡史、田原誉敏、田中那津美、矢内正晶、小谷昌広、牧野晴彦、山口耕介、坂本智宏、清水英治、SMARCA4-deficient thoracic sarcoma に対して放射線治療が奏功した1例、第26回日本がん転移学会学術集会、2017年7月27日、大阪府大阪市

- ② 田中那津美、武田賢一、矢内正晶、牧野晴彦、泉大樹、井岸正、清水英治、Nivolumab で治療した非小細胞肺癌患者の中樞神経系転移、第 26 回日本がん転移学会学術集会、2017 年 7 月 27 日、大阪府大阪市
- ③ 岡崎亮太、長谷川泰之、舟木佳弘、末田悠里子、原田智也、山崎章、清水英治、滑膜線維芽細胞における  $\omega$ -3 系脂肪酸由来抗炎症脂質メディエーターの抗炎症効果や RANKL 発現抑制効果についての検討、第 61 回日本リウマチ学会学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡県福岡市
- ④ 末田悠里子、原田智也、舟木佳弘、岡崎亮太、長谷川泰之、山崎章、清水英治、トシリズマブ投与後にマクロファージ活性化症候群を発症し、自然軽快した成人発症ステイル病の 1 例、第 61 回日本リウマチ学会学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡県福岡市
- ⑤ 舟木佳弘、長谷川泰之、末田悠里子、原田智也、岡崎亮太、山崎章、清水英治、骨芽細胞における Resolvin E1 の PGE2 産生抑制効果とその機序についての検討、第 61 回日本リウマチ学会学術集会、2017 年 4 月 20 日、福岡県福岡市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 英治 (SHIMIZU, Eiji)  
鳥取大学・医学部医学科・教授  
研究者番号：50187449

### (2) 研究分担者

千酌 浩樹 (CHIKUMI, Hiroki)  
鳥取大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90283994

高田 美也子 (TAKATA, Miyako)  
鳥取大学・医学部・プロジェクト研究員  
研究者番号：50523643

### (3) 連携研究者

山口 耕介 (YAMAGUCHI, Kousuke)  
鳥取大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：60529402

三宅 直美 (MIYAKE, Naomi)  
鳥取大学・医学部・特任教員  
研究者番号：90747205