

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860097

研究課題名(和文) プラチナ製剤の時間薬物療法の有用性と機序解明：DNA修復因子とDNA中プラチナ量

研究課題名(英文) Identification of responsible factors of dosing time-dependent effects of cisplatin

研究代表者

岡崎 史泰 (Okazaki, Fumiyasu)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教

研究者番号：20610348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シスプラチンの時間薬物療法は抗腫瘍効果を増大させることが既報で確認されているが、薬物動態学的側面及び薬力学的側面からもその原因因子が明らかとなっていない。本研究では、その原因因子を解明することを目的に研究を行った。その結果、シスプラチンの抗腫瘍効果は、薬力学的因子であるシスプラチン耐性に関与するSSRP1と二量体を形成するSPT16によって投薬時刻の違いによる抗腫瘍効果変動することが確認された。本検討により、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響は、薬力学的因子が関与していることを確認し、スプラチンの至適投薬タイミングの指標因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：Previous reports suggested that chronomodulated chemotherapy using cisplatin improve anticancer effects, but the responsible factors remain unclear in pharmacokinetics and pharmacodynamics study. The purpose of this study is to identify the responsible factors of dosing time-dependent effects of cisplatin. SPT16, which dimerizes with SSRP1 involved in cisplatin resistance, influences dosing time-dependent effects of cisplatin in pharmacodynamics study. On the other hand, the pharmacokinetics study showed no significant difference. This study suggested that pharmacodynamics factors influence dosing time-dependent effects of cisplatin, and identified the responsible factor to determine the property dosing time of cisplatin.

研究分野：時間薬理

キーワード：時間薬理 体内時計

## 1. 研究開始当初の背景

約 24 時間周期の転写因子の発現量を指標にした指摘投薬がタイミングの設定により、がん時間薬物療法というより効果的な薬物療法が提示されている。時間薬物療法とは、約 24 時間を周期とする日周リズムを考慮し、ある特定の時間帯に薬を投薬することで薬効を最大・副作用を最小にする薬物療法である。投薬時刻を設定することで既存の薬のポテンシャルを引き出すことが可能であるため、時間薬物療法は新薬の開発期間を必要とせず、臨床に応用しやすい薬物療法である。日周リズムは、睡眠、体温、行動リズムなど約 24 時間を周期とする生理機能であり、視交叉上核に存在する時計遺伝子によって制御されている。時計遺伝子は、転写促進因子と転写抑制因子からなる遺伝子群であり、フィードバックループ機構によって日周リズムを制御している。この時計遺伝子は、がん細胞にも存在し、抗がん剤に対する感受性に日内変動を与えている。現在までに、抗がん剤の薬力学や薬物動態に関わる遺伝子が時計遺伝子に制御されており、がん時間薬物療法が有効であることが明らかになっている。

シスプラチンは抗がん剤のプラチナ製剤の代表的な薬剤として様々な研究が行われている。これまでに、時間薬物療法の観点からも研究が行われており、シスプラチンの時間薬物療法の有用性が確認されている。しかし、シスプラチンの時間薬物療法に関する抗腫瘍効果および副作用の影響のメカニズムに対し、薬物動態学的側面から検討が行われてきたが、投薬時刻の設定によるプラチナ製剤の血中濃度に差が無いと報告されている。一方、ラジカルスカベンジャーのグルタチオンやメタロチオネンが、プラチナ製剤の感受性に影響を与える因子として発見されているが、抗腫瘍効果や副作用に対する投薬時刻の影響について重要な因子として同定されていない。

プラチナ系抗がん剤の薬物動態学的研究について、申請者は、一般的に使用されている原子吸光法ではなく、より高感度の ICP-MS を用いた研究を行っている。プラチナ系抗がん剤は、DNA に結合することで DNA 複製を阻害し、アポトーシスを誘導する。原子吸光法では、DNA に結合しているプラチナ量を測定することはできないが、ICP-MS では高感度であるため可能である。そこで、本研究では既存の腫瘍組織全体プラチナ量を測定するのではなく、DNA 中のプラチナ量を測定する。

一方、薬力学的側面では分子生物学の発展によりプラチナ製剤の感受性に影響を与える因子として、DNA 修復（ヌクレオチド除去修復）に関与する因子の structure specific recognition protein 1 (SSRP1)

に注目が集まっている。シスプラチンが DNA に結合すると、DNA の構造が歪むと考えられており、この歪みを SSRP1 が認識しアポトーシスへと誘導することが確認されている。また同様に、プラチナ製剤の感受性に影響を与える因子として DNA-PK や RPA2 も挙げられている。これら SSRP1 をはじめ、本研究で注目する因子は、投薬時刻の設定によるプラチナ製剤の抗腫瘍効果および副作用に関する因子として重要な働きを担うと考えられる。

そこで、本研究では、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について薬物動態学的側面及び薬力学的側面から検討を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について下記の 3 点について検討を行う。

- I. シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響
- II. 薬物動態学的側面からの検討
- III. 薬力学的側面から検討

## 3. 研究の方法

### (1) 腫瘍組織中シスプラチン薬力学因子の日周リズムの検討

明暗周期条件下（明期 7:00-19:00）で 1 週間以上飼育した腫瘍移植マウスを作製して、腫瘍組織を 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 に採取した。採取した腫瘍組織から mRNA を抽出して、SSRP1、DNA-PK、RPA2、SPT16 発現量を qRT-PCR 法を用い測定した。なお内部標準には  $\beta$ -actin を用いた。

### (2) 腫瘍核内タンパク質中 SPT16 タンパク質発現量

腫瘍移植マウスから腫瘍組織を 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 1:00, 5:00 に採取した。採取した腫瘍組織から核内タンパク質を抽出して、SPT16 タンパク質発現量を Western blot 法を用い測定した。なお、内部標準には Na,K-ATPase を用いた。

### (3) 細胞増殖に対する SPT16 機能の影響

培養細胞に SPT16 siRNA をトランスフェクションした後、シスプラチンを暴露させた。その後、細胞増殖を MTT assay を用い、SPT16 によるシスプラチン感受性の影響を測定した。

### (4) シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響

腫瘍移植マウスを作製し、SPT16 タンパク質発現量が高い時刻と低い時刻のいずれかにシスプラチンを投薬した。抗腫瘍効果につ

いて、腫瘍径を経日的に測定した。

#### (5) シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす薬物動態学的検討

腫瘍移植マウスを作製し、抗腫瘍効果が高い時刻と低い時刻のいずれかにシスプラチンを投薬した。投薬後経時的に血液及び腫瘍を採取した。採取した血液から血清を採取し、ICP-MS を用いて血清中プラチナ量を測定した。また、腫瘍から DNA を抽出し、腫瘍 DNA 中プラチナ量を ICP-MS を用いて測定した。

#### (6) SPT16 発現量に及ぼす時計遺伝子の影響

培養細胞に、時計遺伝子 (Clock, Bmal1, Dbp, Rora) および時計遺伝子と同様に日周リズムが存在し標的遺伝子の発現量に日周リズムを発信させることが知られている c-myc の si RNA をトランスフェクションした後、mRNA を抽出する。各種因子をノックダウンさせた細胞中 SPT16 発現量を qRT-PCR を用い、測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 腫瘍組織中シスプラチン薬力学因子の日周リズムの検討

当初、シスプラチンの感受性に影響を与える薬力学的因子のターゲットとして SSRP1 と DNA-PK、RPA2 に着目し、腫瘍組織中 mRNA 発現量を qRT-PCR 法を用い測定した。その結果、SSRP1 と DNA-PK、RPA2 いずれも日周リズムが存在しなかった。SSRP1 は SPT16 と二量体を形成することで、シスプラチンによる DNA の歪みを認識しアポトーシスに導くことが確認されている。SSRP1 mRNA 発現量に日周リズムが確認されなかったことから、SPT16 mRNA 発現量を測定した結果、日周リズムがあることが確認された。

#### (2) 腫瘍核内タンパク質中 SPT16 タンパク質発現量

SSRP1 と SPT16 の二量体は核内で、その機能を発揮する。また、タンパク質レベルで SPT16 は機能することから、腫瘍核内タンパク質中の SPT16 タンパク質発現量を測定した。その結果、mRNA と同様に日周リズムが存在し、SPT16 は転写レベルで日周リズムが制御されていることが確認された。またこの結果から、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響の検討に対して、投薬時刻を設定した。

#### (3) 細胞増殖に対する SPT16 機能の影響

シスプラチンの抗腫瘍効果に SPT16 が影響するか検討するため、SPT16 をノックダウンさせた細胞にシスプラチンを暴露させ、その増殖能(シスプラチンの感受性)を MTT assay を用いて測定した。その結果、SPT16 ノックダウンにより、シスプラチンの細胞増殖率が 30-40%低下した。つまり、シスプラチンの抗腫瘍効果が SPT16 により制御される可能性が

確認された。この結果から、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について、SPT16 を介した薬力学的影響が考えられた。

#### (4) シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響

これまでの結果から、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について、SPT16 を介した薬力学的影響が関与していることが示唆されたことから、SPT16 タンパク質発現量が高い時間帯と低い時間帯のいずれかにシスプラチンを投薬し、経日的に腫瘍径を測定した。その結果、シスプラチン投薬群は、非投薬群と比較し腫瘍径が低下しており腫瘍効果が確認された。さらに、SPT16 発現量が高い時刻にシスプラチンを投薬する群と比較し、低い時刻に投薬する群は、約 50%腫瘍径が低下することが確認された。この結果から、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響は SPT16 を介した薬力学的影響があることが示唆された。

#### (5) シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす薬物動態学的検討

シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について、SPT16 を介した薬力学的影響が関与していることが確認されたが、薬物動態学的影響がないか確認するため、血中プラチナ量および腫瘍組織中プラチナ量(薬物動態学的影響について)を測定した。なお、プラチナ系抗がん剤の作用部位である DNA 中プラチナ量を測定するため原子吸光法ではなく、より感度の高い ICP-MS を用い測定した。血中プラチナ量および腫瘍 DNA 中プラチナ量について、投薬時刻の違いによる有意な差は確認されなかった。以上の結果から、シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響は薬物動態学的影響ではなく薬力学的影響であることが示唆された。

#### (6) SPT16 発現量に及ぼす時計遺伝子の影響

シスプラチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響は SPT16 の日周リズムによるものであることが確認されたが、その制御因子を解明するため、時計遺伝子または時計遺伝子と同様に日周リズムが存在し標的遺伝子の発現量に日周リズムを発信させることが知られている c-myc をノックダウンさせ、SPT16 発現量を測定した。その結果、Clock 及び Bmal1, Dbp, Rora など転写促進系の時計遺伝子は SPT16 発現量に影響を与えなかったが、c-myc は SPT16 発現量を制御することが確認された。

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

該当無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡崎 史泰 (OKAZAKI, Fumiyasu)

富山大学大学院 医学薬学研究部 (薬学)

助教

医療薬学研究室

研究者番号：20610348

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：