

Predictive Markers of chemosensitivity to antitumor nucleosides in solid cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Endo, Yoshio メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034730

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



研究成果報告書

研究課題

臨床効果を的確に予測する抗腫瘍性ヌクレオシドの
薬剤感受性規定因子

課題番号 17590118

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金

((基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 遠藤 良夫
金沢大学がん研究所助教授

金沢大学附属図書館



1300-04394-6

様 式 C-18

〈研究組織〉

研究代表者：遠藤 良夫 （金沢大学がん研究所助教授）

研究分担者：佐々木琢磨 （愛知学院大学薬学部教授）

〈交付決定額（配分額）〉

（金額：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 17 年度	2,100,000	0	2,100,000
平成 18 年度	1,000,000	0	1,000,000
総 計	3,100,000	0	3,100,000

〈研究発表〉

（１）学会誌等

Yonemura Y, Endo Y, Obata T, Sasaki T. Recent advances in the treatment of peritoneal dissemination of gastrointestinal cancers by nucleoside antimetabolites. Cancer Sci. 2007 Jan;98(1): 11-18. Epub 2006 Oct 17.

（２）学会発表

1. 遠藤 良夫、小幡 徹、村田 大悟、佐々木 琢磨： 3'-エチニルヌクレオシドに対する薬剤感受性および耐性化関連因子としてのヌクレオシドトランスポーターの意義. 第 9 回がん分子標的治療研究会総会. 国立京都国際会館（京都）、2005 年 7 月 1 日
2. 遠藤良夫、小幡 徹、村田大悟、佐々木琢磨：抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの耐性化機序. 第 64 回日本がん学会学術総会. 札幌プリンスホテル国際館パミール（札幌）2005 年 9 月 14 日
3. Endo Y, Obata T, Nomura M, Fukushima M, Yamada Y, Matsuda A, Sasaki T: Development of an Antitumor Adenosine Analog 3'-Ethynyladenosine. XVII International Roundtable on Nucleosides,

Nucleotides and Nucleic Acids. Bern, Switzerland, September 3-7, 2006.

4. 遠藤良夫、小幡徹、川上和之、山崎聡子、佐々木琢磨: 抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの代謝関連酵素の発現と感受性予測マーカーとしての意義. 第 65 回日本がん学会学術総会. パシフィコ横浜 (横浜) 2006 年 9 月 30 日

(3) 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

〈研究成果〉

1. 目的

近年の分子標的治療薬の研究・開発の成功により、非小細胞肺癌や乳がん患者の QOL が改善されつつある。これは、がん細胞に特異的な分子を標的とした分子標的治療薬の多大な功績である。しかし、これらの恩恵にあずかる患者は全体の 10～30% 程度であり、多くは従来の化学療法剤を用いた治療を行っているのが現状である。また、従来の薬剤の多くに見られる強力な殺細胞作用はがん治療においては、非常に魅力的な効果である。従来の化学療法剤においても、抗腫瘍効果や副作用の発現に分子標的治療薬と同じように標的となる分子が存在している。P 糖蛋白質の発現による多剤耐性化現象、植物アルカロイドにおける β -チューブリン、UDP-グルクロン酸抱合酵素の SNP によるイリノテカンの副作用発現などである。これらの標的分子を詳細に調べ、個々の患者に応じた適切な薬剤

選択・投与量などを薬剤治療前に知ることが出来れば (テーラーメイド治療)、抗腫瘍効果の増大や副作用の軽減 (QOL の改善) といった、分子標的治療薬に引けを取らない効果が期待できると思われる。そこで、我々は現在開発中の抗腫瘍性ヌクレオシド、

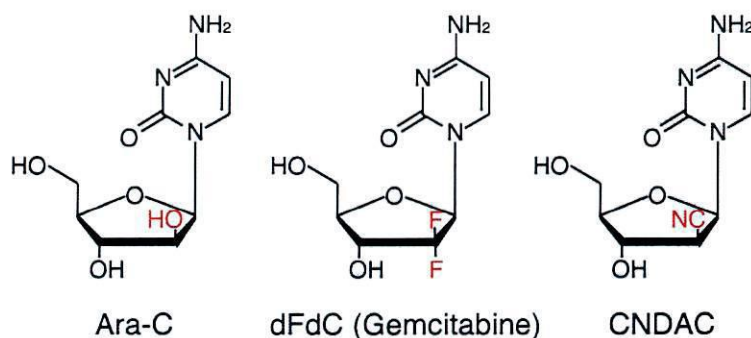


Fig.1 抗腫瘍性2'-デオキシシチジン誘導体の化学構造

CNDAC、1-(2-C-cyano-2-deoxy-1-β-D-arabino-pentofuranosyl) cytosine (米国にて臨床試験中)、肺がん、膀胱がんおよび胆道がんの治療薬であるゲムシタビン (dFdC) の臨床効果を的確に予測できる感受性規定因子の研究を企画した (Fig. 1)。これらの薬剤は造血器およびリンパ系腫瘍の治療薬として用いられているシタラビン (Ara-C) と同様に 2'-デオキシシチジン誘導体であり、核酸代謝拮抗剤に分類される。従って、いずれも類似した代謝活性化経路を有している (Fig. 2)。CDAC や dFdC 含む 2'-デオキシシチジン誘導体は細胞膜上に存在するヌクレオシドトランスポーター (NT) により細胞内に輸送される。NT にはナトリウムイオン依存性の能動輸送と非依存性の促進拡散の存

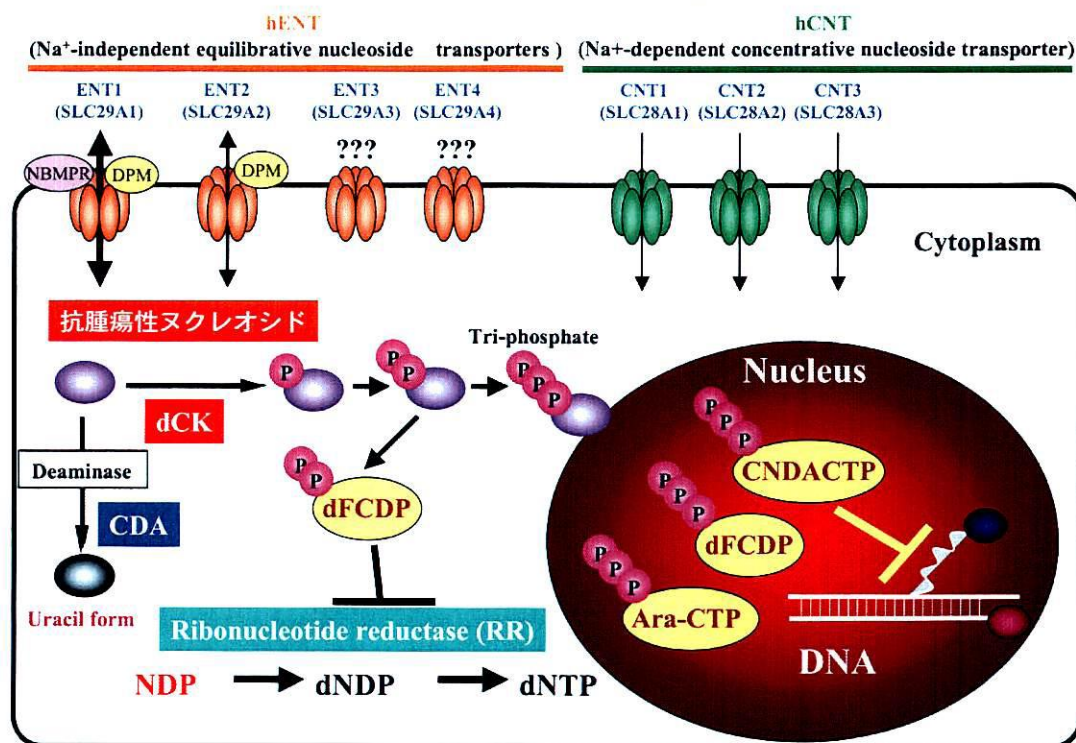


Fig. 2 2'-デオキシシチジン誘導体の代謝経路と作用機序

在が知られており、中でも促進拡散輸送担体の一つである ENT1 (SLC29A1/es) は、がん細胞を含む多くの臓器、細胞で発現が見られ、抗腫瘍性ヌクレオシドの細胞内移行を規定する重要な因子と考えられる。細胞内ではデオキシシチジンキナーゼ (dCK) によりモノリン酸体となった後、さらに酵素的リン酸化を受けトリリン酸体 (活性型) となる。CDAC と dFdC のトリリン酸体である CNDACTP と dFdCTP は DNA ポリメラーゼを阻害することにより DNA 合成阻害作用を発揮する。また、dFdC は DNA ポリメラーゼ阻

害作用の他にも、リボヌクレオチドレダクターゼ (RR) に対する阻害作用が知られ、dFdC に対する耐性細胞では RR の発現亢進が耐性化に関与することが報告されている。RR には RRM1 と RRM2 の 2 つのサブユニットが存在するが、dFdC は RRM1 に特異的に結合することで不可逆的に RRM1 を失活させると考えられている。その一方、Ara-C や dFdC はいずれも脱アミノ化酵素であるシチジンデアミナーゼ (CDA) の基質になりやすく、抗腫瘍活性を示さない 1-β-D-arabinofuranosyluracil (Ara-U) や 2',2'-difluorodeoxyuridine (dFdU) に代謝されることがよく知られている。CDA に関しては、活性あるいは、タンパクの発現は 2'-デオキシシチジン誘導体の感受性と相関しないとする研究報告がなされているが、CDA 発現ベクターを用いて強制発現させた細胞では、Ara-C や dFdC に対する抵抗性が亢進することから、CDA を過剰発現している場合には dCK と同様に重要な感受性規定因子となることが考えられる。CNDAC は Ara-C や dFdC と比較すると、CDA の基質になりにくいものの、反応時間が長くなれば最終的にはほとんどがウラシル体に代謝される。従って、これらの薬剤の抗腫瘍活性においては、dCK、CDA、NT や RR 等の核酸代謝関連タンパク間の発現バランスが重要な鍵になっている。そこで、本研究では治療目的で切除された臨床検体を用いて核酸代謝関連タンパクの発現量を測定し、コラーゲンゲルマトリクスを用いた薬剤感受性試験法 (CGM 法) における CNDAC および dFdC に対する感受性との関連性を比較解析し、感受性予測マーカーとしての意義を検討した。

2. 方法

1) 抗体作成

各種核酸代謝関連因子 (dCK、CDA、ENT1) の臨床組織検体中での発現量を検討するための特異的抗体は市販されておらず独自に作成したものをを用いた。RRM1 に対するマウスモノクローナル抗体は BioMedTek (UMEA, SWEDEN) より購入した。β-Actin モノクローナル抗体、β-tubulin モノクローナル抗体は SIGMA 社より購入した。

2) タンパク発現量の解析

ウェスタンブロットの常法に従い電気泳動後、タンパクを polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜に転写した。CDA、dCK、RRM1、β-actin および β-tubulin に対する一次抗体を反応させた後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体 [anti-rabbit Ig, horseradish Peroxidase linked F(ab')₂ fragment (from donkey) または anti-mouse Ig, horseradish Peroxidase

linked F(ab')₂ fragment (from sheep) , Amersham Biosciences] を反応させ、ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) を用いて、目的のタンパクを検出した。タンパク発現量は、ウェスタンブロット法により検出されたシグナルの強度（密度）を NIH Image を用いて解析することにより、数値化した。各核酸代謝酵素の発現量は内部標準として用いた β -actin の発現量により補正した。

3) *In vitro* 薬剤感受性試験

In vitro における細胞増殖阻害作用試験は、Carmichael らの方法に従い、生細胞のコハク酸脱水酵素の還元法を指標とする 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)法を用いた。種々の濃度（最終薬物濃度の 20 倍）の薬剤溶液を 96-well プレートに分注した後、細胞懸濁液を加え、72 時間培養した。培養終了後、MTT 試薬 (SIGMA) を含む PBS(-)溶液を各ウェルに加え、さらに 4 時間培養した。培地を吸引除去した後 DMSO を 200 μ L 加え、生成した MTT フォルマザンを溶解し、イムノリーダー（日本インターメッド社、東京）を用いて 540 nm における吸光度を測定し、細胞増殖抑制率を算出した。各薬剤濃度における細胞増殖抑制率を片対数用紙にプロットし、用量作用曲線を作成することで 50%細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)を求めた。

4) 臨床検体に対する抗がん剤感受性試験（コラーゲングルマトリックスを用いた感受性試験）

治療目的で切除されたがん組織に対する薬剤感受性試験は、ブタ皮膚由来のスポンジ状コラーゲングルマトリックス（スポンゴスタン、Health Design Industries, Rochester, NY)を用いる 3 次元初代培養法(CGM 法)を用いて行った。詳細には、切除されたがん組織を細切し、牛血清含有培地にて膨潤させたコラーゲングルマトリクス上に静置した。その後、種々の抗がん剤を最大血中濃度の 10 倍量を添加した。37°C で 7 日間培養後、MTT 試薬とともにコラゲナーゼ溶液を添加して 4 時間の追加培養で MTT ホルマザンの生成と支持体のコラーゲングルマトリクスを溶解した。培地を除去後、生成した MTT ホルマザンを DMSO で溶解し、吸光度を測定した。本研究計画において使用する臨床検体は治療目的で切除されたがん組織を用いており、がん患者に口頭と文章による説明、承諾による十分なインフォームドコンセントを行い、所定様式を用いた抗がん剤感受性試験、がん

細胞の生化学的因子の検査等に関する承諾書に同意を頂いた。コラーゲンゲルマトリックスを用いた感受性試験については、供与施設の依頼により当研究室内で行われたものであり、薬剤感受性試験の結果は担当医師に速やかに提供し、治療計画に役立てている。

3. 結果

平成17年度は dCK、CDA および RRM1 に対する特異抗体を用いて、22種のヒト腫瘍細胞ならびに抗腫瘍性ヌクレオシド耐性ヒト胃癌細胞、臨床肺癌組織 19 検体におけるタンパク発現量をウェスタンブロット法により解析し、MTT 法あるいは CGM 法による薬剤感受性試験における CNDAC、dFdC および Ara-C に対する感受性との統計学的な比較検討を行った。

胃癌細胞 6 種 (MKN-28、NUGC-3、TMK-1、MKN-7、MKN-45、KKLS)、大腸がん細胞 6 種 (Colo320DM、HT-29、SW-620、HCT-15、SW-48、LS174T)、肺がん細胞 5 種 (PC-10、Lu-65、PC-3、PC-9、SBC-3)、前立腺がん細胞

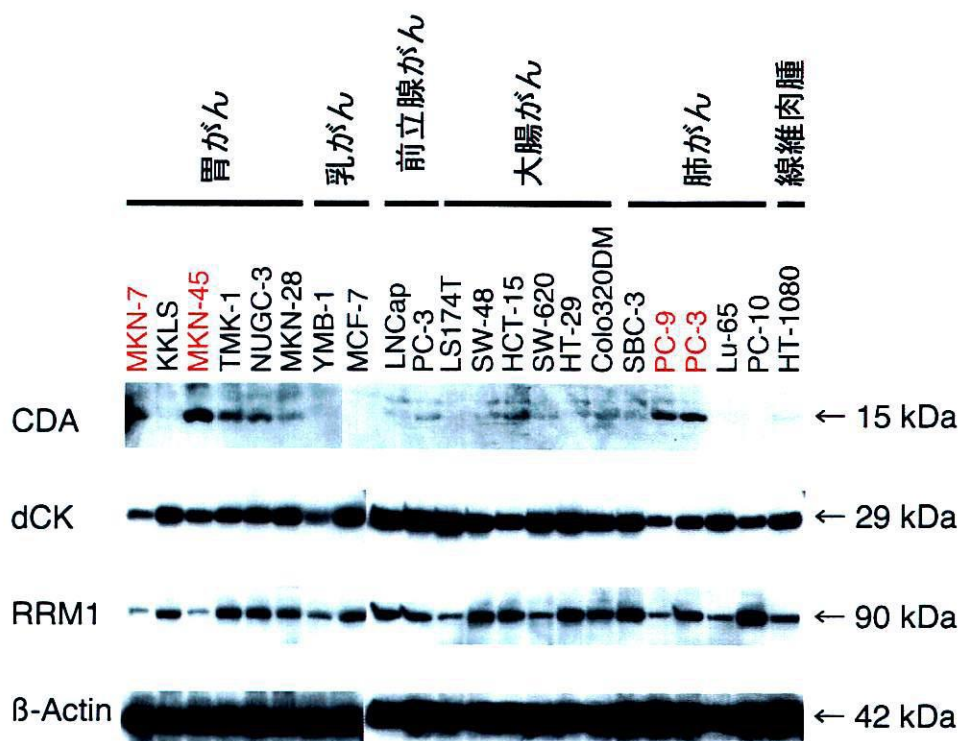


Fig. 3 22種のヒトがん細胞における核酸代謝酵素タンパク発現

2 種 (PC-3、LNCap)、乳がん細胞 2 種 (MCF-7、YMB-1)、ヒト線維肉腫細胞

胞1種 (HT-1080) より抽出したタンパクを用いてウェスタンブロット法により、CDA、dCK、RRM1 の発現を解析した。その結果、胃がん細胞の中では MKN-7 と MKN-45 の2株において CDA の強発現を認めたが、KKLS は CDA を発現していなかった。また、肺がん細胞では PC-3 と PC-9 が CDA を強発現し、PC-10 と Lu-65 では CDA は検出されなかった。一方、大腸がん細胞では LS174T を除く5株で CDA の発現が認められたが、CDA を強発現する細胞はなかった。解析を行った2種の乳がん細胞についてはいずれも CDA タンパクは検出されず、胃がんや大腸がんなどの消化器系がん細胞に CDA が高頻度に発現する傾向が認められた。dCK (約 29 kDa) と RRM1 (約 90 kDa) は、発現量に差はあるが、全ての細胞でそれらのタンパク発現が確認された (Fig. 3)。

Cell line	Origin	In vitro chemosensitivity assay						Protein level (AU)		
		CNDAC		Ara-C		dFdC		CDA	dCK	RRM1
		IC ₅₀ (μM)	Response	IC ₅₀ (μM)	Response	IC ₅₀ (μM)	Response			
KKLS	Stomach	1.091	H	0.609	H	0.023	H	0.000	0.708	0.435
MKN-28	Stomach	1.030	H	0.140	H	0.010	H	0.209	0.779	0.558
MKN-45	Stomach	1.398	H	0.780	L	0.010	H	0.740	0.665	0.346
MKN-7	Stomach	11.639	L	1.236	L	0.051	H	0.511	0.434	0.254
NUGC-3	Stomach	0.159	H	0.470	H	0.037	H	0.303	0.776	0.603
TMK-1	Stomach	0.944	H	0.445	H	0.117	L	0.403	0.766	0.621
LNCap	Prostate	3.693	L	1.724	L	0.287	L	0.125	1.103	0.803
PC-3	Prostate	2.949	L	0.211	H	0.010	H	0.139	0.971	0.623
Colo320DM	Colon	0.226	H	0.523	H	0.032	H	0.151	0.816	0.837
HCT-15	Colon	0.502	H	0.333	H	0.052	H	0.266	0.760	0.818
HT-29	Colon	0.936	H	0.583	H	0.041	H	0.129	0.929	0.876
LS174T	Colon	0.770	H	0.382	H	0.010	H	0.000	1.002	0.490
SW-48	Colon	0.256	H	0.140	H	0.010	H	0.072	0.874	0.868
SW-620	Colon	1.237	H	0.185	H	0.010	H	0.158	0.845	0.669
MCF-7	Breast	0.156	H	0.423	H	0.058	H	0.000	0.840	0.573
YMB-1	Breast	13.810	L	1.339	L	0.086	L	0.000	0.665	0.455
Lu-65	Lung	0.979	H	0.483	H	0.053	H	0.000	0.649	0.597
PC-10	Lung	6.107	L	0.573	H	0.455	L	0.000	0.477	0.867
PC-3	Lung	0.779	H	1.224	L	0.101	L	0.460	0.509	0.677
PC-9	Lung	1.225	H	0.948	L	0.028	H	0.375	0.441	0.539
SBC-3	Lung	0.216	H	0.140	H	0.010	H	0.141	0.655	0.768
HT-1080	Sarcoma	0.370	H	0.447	H	0.075	L	0.091	0.509	0.505
Mean		2.29		0.61		0.07		0.19	0.74	0.63
Cut-off line*		2.43		0.64		0.08				

*各薬剤のIC₅₀値の平均値に6%を加算した値

Table 1 ヒト腫瘍細胞の薬剤感受性と核酸代謝酵素のタンパク発現量の比較

22 種類のヒト腫瘍細胞を用い、CNDAC、dFdC および Ara-C に対する感受性を MTT 法により評価した。各薬剤における IC₅₀ 値の平均から cut-off 値を設定し、低感受性と高感受性に分類し、感受性の評価を行った結果、大腸がんでは6株中4株 (Colo320DM、HT-29、HCT-15、SW-48) が、すべての2'-デオキシシチジン誘導体に対して高感受性を示した。また、胃がんにおい

ても6株中半数の3株(MKN-28、NUGC-3、KKLS)がすべての2'-デオキシシチジン誘導体に対して高感受性を示し、消化器系のがん細胞は2'-デオキシシチジン誘導体に対して高感受性を示す傾向が認められた。肺がんでは6株中2株(Lu-65、SBC-3)が同様にすべての2'-デオキシシチジン誘導体に対して高感受性を示した。一方、前立腺がん細胞 LNCap と乳がん細胞 YMB-1 は、全ての薬剤に低感受性を示した (Table 1)。前立腺がん細胞の2株はいずれも CNDAC に低感受性を示したが、他の3薬剤に対する感受性は相反するものであった。薬剤感受性については、各組織間における統計学的な関連性 (Kruskal-Wallis 検定) は見られなかった。

ヒト腫瘍細胞における核酸代謝酵素 (CDA、dCK、RRM1) のタンパクをウェスタンブロット法により検出し、NIH Image を用いてシグナル強度を解析することにより、発現量を数値化した。各核酸代謝酵素の発現量は内部標準として用いた β -actin の発現量により補正した。ヒト腫瘍細胞における各核酸代謝酵素のタンパク発現量、2'-デオキシシチジン誘導体に対する IC₅₀ 値、核酸代謝酵素間における発現量比を基に各因子間の相関性を解析した結果を Table 2 に示した。Ara-C の IC₅₀ 値は CDA (正の相関)、dCK (負)、dCK/CDA 比 (負) および

CDA/dCK 比 (正)

と有意な相関性を示した。さらに、CNDAC の IC₅₀ 値と dCK タンパク量においても有意な負の相関が認められた (相関係数 -0.452、 $p = 0.0444$)。dFdC の IC₅₀ 値は RRM1/dCK 比と正の相関性が認められ、RRM1 発現が dCK に比較し高い場合、低

Factor	CNDAC		Ara-C		dFdC	
	Coefficient	p value	Coefficient	p value	Coefficient	p value
DMDC	.242	.3086	-	-	-	-
Ara-C	.493	.0259	-	-	-	-
dFdC	.377	.1025	.176	.4639	-	-
CDA	.247	.2980	.575	.0070	-.160	.5067
dCK	-.452	.0444	-.660	.0011	-.427	.0602
RRM1	-.363	.1165	-.427	.0597	.304	.1958
dCK/CDA	-.249	.2938	-.471	.0352	-.041	.8669
dCK/RRM1	.155	.5194	-.003	.9896	-.478	.0317
CDA/dCK	.407	.0751	.739	<.0001	-.121	.6165
CDA/RRM1	.516	.0185	.615	.0031	-.135	.5741
RRM1/dCK	.022	.9267	.122	.6146	.712	.0002
RRM1/CDA	-.105	.6651	-.433	.0562	.403	.0784

* Correlation coefficient

Table 2 薬剤感受性と核酸代謝酵素との相関関係

感受性であることが示された。以上の結果から、CNDAC や dFdC に対する感受性には dCK と RR の双方のタンパク発現が相関し、感受性予測の有用なマ

一カーになる可能性が示唆された。一方、CDA は培養系においては Ara-C に対する感受性と相関していたが、CNDAC と dFdC に対する感受性との関連性は認められなかった。

Sample No.	dFdC		CNDAC		Protein level (AU)		
	Inhibition ratio* (%)	Sensitivity	Inhibition ratio (%)	Sensitivity	CDA	dCK	RRM1
1077	0.0	L	0.0	L	0.000	0.695	0.169
1188	0.0	L	0.0	L	0.000	1.523	0.297
1116	0.0	L	0.0	L	0.274	0.989	0.584
1068	0.0	L	0.0	L	0.422	1.251	0.236
1173	1.8	L	0.0	L	0.000	1.275	0.717
1185	6.5	L	2.7	L	0.000	0.000	0.000
1099	6.7	L	6.3	L	0.571	0.223	0.000
1146	8.6	L	6.3	L	0.599	1.158	0.419
1187	21.1	L	0.0	L	0.000	0.000	0.000
1100	23.0	H	10.6	L	0.852	0.242	0.000
1179	24.9	H	13.7	L	0.615	0.719	0.000
1028	26.5	H	32.0	H	0.227	0.885	0.000
1085	28.1	H	27.8	H	0.572	0.000	0.000
1144	29.2	H	29.2	H	0.503	0.736	0.000
1079	30.1	H	36.2	H	0.000	0.302	0.000
1119	30.3	H	32.6	H	0.291	1.429	0.212
1191	30.7	H	7.0	L	0.265	1.434	0.000
1066	39.7	H	22.3	H	0.507	0.457	0.000
1108	42.2	H	38.6	H	0.000	0.000	0.000
Cut-off line**	22.2		20.8				

*コラーゲンゲルマトリックス法を用いた薬剤感受性試験による評価結果

**各薬剤の腫瘍阻止率の平均値に6%を加算した値

Table 3 肺がん組織19症例における薬剤感受性と核酸代謝酵素のタンパク発現

平成17年度は、まず肺がん19症例について、核酸代謝酵素のタンパク発現量をウェスタンブロット法により解析し、CGM法による薬剤感受性試験におけるCNDACおよびdFdCに対する感受性との統計学的な比較検討を行った (Table 3)。その結果、dFdC感受性とRRM1発現量との間に統計学的に有意な負の相関が認められ、RRM1発現量はdFdC感受性を予測する上で重要なマーカーとなる可能性が示された。また、dFdC感受性とdCK/RRM1あるいはRRM1/dCKとの間に明らかな相関が認められ、dCKと

Factor	dFdC		CNDAC	
	Coefficient*	p value	Coefficient	p value
CNDAC	.825	<.0001	—	—
CDA	.179	.4694	.081	.7458
dCK	-.339	.1580	-.264	.2796
RRM1	-.641	.0024	-.474	.0395
dCK/CDA	-.489	.0326	-.355	.1381
dCK/RRM1	.461	.0460	.236	.3351
CDA/dCK	.175	.4802	.158	.5242
CDA/RRM1	.373	.1172	.196	.4273
RRM1/dCK	-.662	.0015	-.495	.0301
RRM1/CDA	-.445	.0557	-.362	.1295

* Correlation coefficient

Table 4 肺がん組織19症例における薬剤感受性と核酸代謝酵素との相関関係

RRM1の発現量におけるバランスも薬剤感受性に影響することが示唆された。一方、CNDAC腫瘍阻止率とRRM1発現量との間にも負の相関を示す傾向が認められた。また、RRM1とdCKの発現量比が薬剤感受性に関与している可能性も示された。

17年度の検討で RRM1 が dFdC に対する薬剤感受性のみならず、CNDAC に対する感受性にも影響を与える可能性を示す結果が得られた。そこで、18年度は、ヒト線維肉腫細胞を用い RRM1 サブユニット過剰発現安定株を樹立し、CNDAC ならびに dFdC に対する感受性の変化を調べた。その結果、dFdC に対しては約 5 倍、CNDAC に対しては約

2 倍抵抗性が増強することが確認され、重要な感受性規定因子の一つであることが新たに明らかになった。これまでの研究から CNDAC は腫瘍細胞におけるヌクレオチドプールを変化させる活性はないことから RR 活性には影響を与えないと考えられている。RRM1 タンパクは基質特異性決定部位、allosteric 調節部位、活性部位を有し、dFdCDP はこの RRM1 と結合することが RR 活性を阻害する。しかし、RRM1 発現の亢進に基づく CNDAC 感受性の低下の原因は不明であり、今後この詳細な機序を明らかにする必要がある。

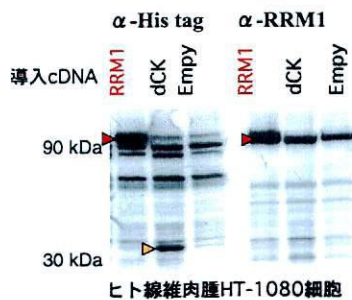


Fig. 4 RRM1過剰発現安定株の樹立

臨床がん組織を用いた検討では、17年度の臨床肺がん組織 19 検体に加え、肺がん (30 検体)、胃がん (30 検体)、大腸がん (28 検体)、膀胱がん (12 検体) 等、148 検体における核酸代謝酵素および ENT1 のタンパク発現を解析し

Drug	Sensitivity	RRM1/actin	dCK/actin	CDA/actin	ENT2/actin	DCK/CDA	DCK/RR
dFdC	H	0.404	1.552	0.057	0.738	4328.3	8.410
	L	0.590	1.119	0.269	0.854	2594.3	2.623
	p valu	0.019	0.096	0.034	0.949	0.017	0.010
CNDAC	H	0.301	1.183	0.115	0.596	2891.2	9.190
	L	0.515	1.112	0.276	0.917	1891.0	3.393
	p valu	0.045	0.154	0.602	0.421	0.223	0.082

Fig. 5 肺がん40症例における核酸代謝関連因子のタンパク発現と薬剤感受性の関連性

統計処理：Mann-WhitneyのU検定

薬剤感受性試験：コラーゲンゲルマトリックス3次元培養 (CGM) 法

た。dCK と ENT1 タンパクはほぼ全ての検体で発現が認められ、RRM1 の発

現は約 9 割弱に認められた。一方、CDA 発現は約 3 割に認められ、それらの中には明らかに強発現を示す検体があった。肺がん 49 症例の中 40 症例について CGM 法における薬剤感受性との関連性を統計学的に解析した結果、ENT1 発現と感受性には関連性は見られなかったが、CDA 発現は dFdC 感受性と有意に相関すること、RRM1 発現量あるいは dCK に対する RRM1 の発現量比 (dCK/RRM1 比) は CNDAC および dFdC 感受性と強く関連することが明らかになり、有用な感受性予測マーカーとなる可能性が示された。

4. 今後の展開

今後の展開として、肺がんに加えさらに多くの癌種におけるこれらの核酸代謝酵素ならびにヌクレオシドトランスポーターのタンパク発現と感受性との関連性を追求し、感受性予測マーカーとしての有用性を検証する予定である。さらに、ELISA 法を取り入れた簡便な検査系の確立する必要がある。

5. 要約

我々は、代謝拮抗抗がん剤の中でもヌクレオシド系核酸代謝拮抗剤のテーラード治療および抗腫瘍効果の増大や副作用の軽減を目指した新たな治療法の開発に資することを目的に、我々が開発中の抗腫瘍性ヌクレオシド、CNDAC および肺がん・膵がんの治療薬であるゲムシタビン (dFdC) の臨床効果を的確に予測できる感受性規定因子の解明研究を企画した。平成 17 年度はデオキシシチジンキナーゼ (dCK)、シチジンデアミナーゼ (CDA) およびリボヌクレオチドリダクターゼ (RR) に対する特異抗体を用いて、22 種のヒト腫瘍細胞ならびに抗腫瘍性ヌクレオシド耐性ヒト胃がん細胞、臨床肺がん組織 19 検体におけるタンパク発現量をウェスタンブロット法により解析し、MTT 法あるいはコラーゲンゲルマトリクス (CGM) 法による薬剤感受性試験における CNDAC、dFdC および Ara-C に対する感受性との統計学的な比較検討を行った。その結果、CNDAC や dFdC に対する感受性には dCK と RR の双方のタンパク発現が相関し、感受性予測の有用なマーカーになる可能性が示唆された。一方、CDA は培養系においては Ara-C に対する感受性と相関していたが、CNDAC と dFdC に対する感受性との関連性は認められなかった。平成 18 年度は、がん細胞培養系については、ヒト線維肉腫細胞を用い RR の M1 サブユニット過剰発現安定株を樹立し、CNDAC ならびに dFdC に対する感受性の変

化を調べた結果、dFdC に対しては約 5 倍、CNDAC に対しては約 2 倍抵抗性が増強することが確認され、重要な感受性規定因子の一つであることが確認できた。また、臨床がん組織を用いた検討では、17 年度の臨床肺がん組織 19 検体に加え、肺がん (30 検体)、胃がん (30 検体)、大腸がん (28 検体)、膀胱がん (12 検体) 等、148 検体における核酸代謝酵素および ENT1 のタンパク発現を解析した。肺がん 40 症例について CGM 法における薬剤感受性との関連性を統計学的に解析した結果、CDA 発現は dFdC 感受性と有意に相関すること、RRM1 発現量あるいは dCK に対する RRM1 の発現量比 (dCK/RRM1 比) は CNDAC および dFdC 感受性と強く関連することが明らかになった。