

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	中野靖弘
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p style="text-align: center;">Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells (ヒト膵癌細胞株における抗癌剤ゲムシタビンへの獲得耐性と細胞内代謝関連遺伝子に関する研究)</p> <p style="text-align: center;">共著者名</p> <p style="text-align: center;">丹野誠志、小泉一也、西川智哉、中村和正、蓑口まどか、伊澤 功、水上裕輔、奥村利勝、高後 裕</p> <p style="text-align: center;">British Journal of Cancer (in press)</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>膵癌はきわめて予後不良の癌であり、大部分が切除不能進行癌として発見される。代謝拮抗剤ゲムシタビン(GEM)は切除不能膵癌治療の第一選択薬であるが、GEMへの獲得耐性の出現が不可避であるため、臨床的な問題となっている。</p> <p>GEMは細胞内に取り込まれた後に活性体となるため、細胞内への取り込みや代謝に関わる経路はGEMの感受性や耐性化にも関与すると考えられる。GEMはhuman equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1)によって細胞内に取り込まれた後、GEMのリン酸化酵素であるdeoxycytidine kinase (dCK)によって活性化される。これら遺伝子の発現亢進は、細胞のGEM感受性を増強させることが<i>in vitro</i>の実験によって確認されており、GEM感受性におけるpositive regulatorと考えられている。</p> <p>細胞内で活性化されたGEMは、ribonucleoside reductase (RR)活性を抑制する。RRは調節サブユニットRRM1と触媒サブユニットRRM2から構成されており、DNAの重合と修復に必須のdeoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs)を産生するが、GEMはこのRR活性を直接抑制することによって抗腫瘍効果を発揮する。RRM1発現亢進は肺癌ではGEM抵抗性と相関すること、RRM2を細胞に過剰発現させるとGEM抵抗性となることが明らかにされており、RRはGEM感受性におけるnegative regulatorであると考えられている。</p> <p>膵癌細胞のGEM耐性獲得過程において、これらの細胞内GEM代謝関連遺伝子がどのように変化するかについては明らかではない。GEM耐性獲得過程における遺伝子変化によって膵癌のGEM抵抗性を予測できれば、不要な治療を減らし、他剤への変更を決定できるため、膵癌の治療方針決定に寄与すると考えられる。本研究では、膵癌におけるGEM抵抗性を予測する分子マーカーを明らかにするため、ヒト膵癌細胞株を用いて異なるGEM耐性を有する耐性誘導株を複数樹立し、GEM耐性獲得過程における細胞内代謝関連遺伝子(hENT1、dCK、RRM1、RRM2)の発現変化を検討した。</p>			

材 料・方 法

1) GEM耐性膀胱癌細胞株の樹立

ヒト膀胱癌細胞株は8株(PK1, PCI43, KLM1, PK8, PK9, MIAPaCa2, KP1N, BxPC3)を使用した。GEM耐性膀胱癌細胞株は、PCI43, PK1, KLM1の3株において3nMから徐々に培地のGEM含有濃度を上げ(最高4000nM)、6ヶ月以上持続的にGEMに曝露し、耐性獲得過程における異なる耐性を有するGEM耐性誘導株をそれぞれ7株ずつ樹立した。各耐性誘導株は培地GEM濃度により親株名-G(GEM濃度(nM))と命名した(G3~G4000)。

2) 細胞毒性分析

GEM感受性はWST-1 assay法により50%増殖抑制濃度(IC₅₀)で評価した。

3) dCKのexon別PCR解析

8種類の親株、3種類のGEM耐性株からDNAを抽出し、dCKの7つのexon及び5'-UTR領域に対しDNA 50ngを鋳型としてPCRを施行し、電気泳動を行った。

4) 定量的LightCycler RT-PCR

各細胞株からRNAを抽出し、RNA 1 μ gを鋳型として逆転写反応にてcDNAを作成し、LightCycler (Roche社)でhENT1, dCK, RRM1, RRM2, GAPDHの発現を定量した。

成 績

1. 膀胱癌細胞株PCI43, PK1, KLM1およびGEM耐性株におけるGEM感受性

PCI43, PK1, KLM1のGEM IC₅₀は各々350, 160, 80nMだった。耐性株PCI-G4000, PK1-G4000, KLM1-G4000のIC₅₀は親株に比べ各々157, 625, 2625倍高値を示した。

2. GEM耐性株におけるhENT1, dCK, RRM1, RRM2 mRNA発現解析

PCI43-G4000ではRRM1, RRM2 mRNA発現が親株に比較し各々約4倍、10倍増加していた。PK1-G4000ではRRM1 mRNA発現は親株に比べ約2倍増加していたが、RRM2 mRNA発現は増加していなかった。KLM1-G4000ではRRM1 mRNA発現は親株に比べ約42倍増加していたのに対し、RRM2 mRNA発現は増加していなかった。hENT1 mRNA発現は親株に比べPCI43-G4000, KLM1-G4000で有意に増加していたが、PK1-G4000では増加していなかった。dCK mRNAはPCI43-G4000, PK1-G4000ともに検出感度以下であり、KLM1-G4000では変化はなかった。dCKの7つのexonと5'-UTR領域のPCRを行ったところ、PCI43-G4000, PK1-G4000でdCK遺伝子の部分欠失を認めた。親株、KLM1-G4000にはdCKに異常を認めなかった。

3. GEM耐性獲得過程における各遺伝子mRNA発現の変化

PCI43耐性誘導株において、RRM2 mRNA発現量はGEM耐性濃度の上昇に比例して増加し、RRM1 mRNA発現は2から4倍に増加していた。GEM高濃度耐性ではdCK mRNAは検出感度以下だったが、低濃度耐性ではわずかに増加していた。hENT1 mRNAは耐性獲得過程後期で軽度増加していた。PK1耐性誘導株において、RRM1 mRNA発現量はわずかに増加していたが、RRM2 mRNA発現に増加は見られなかった。dCK mRNAはPK1-G300とPK1-G4000で検出感度以下だった。KLM1耐性誘導株において、RRM1 mRNA発現量は著明に増加していたが、RRM2 mRNA発

現量に増加は見られなかった。dCK mRNAは全てのKLM1耐性誘導株で発現を認めた。これらの結果から、GEMへの獲得耐性は単一遺伝子の発現変化によりもたらされるものではないと考えられた。そこで、GEM感受性におけるpositive regulatorであるhENT1とdCK、negative regulatorであるRRM1とRRM2の発現比、hENT1×dCK/RRM1×RRM2発現比を算出した。hENT1×dCK/RRM1×RRM2発現比はGEM耐性獲得過程において、いずれの耐性株においても、GEM耐性化にともなって徐々に低下した。

4. 親株のGEM感受性とhENT1×dCK/RRM1×RRM2発現比の相関

ヒト膵癌細胞株8種類のGEM IC₅₀はhENT1, dCK, RRM1, RRM2 mRNAのいずれの発現量との間にも相関を認めなかった。次に、hENT1×dCK/RRM1×RRM2発現比とGEM IC₅₀との相関を調べたところ、hENT1×dCK/RRM1×RRM2発現比の高い細胞株は高感受性、低い細胞株は低感受性を示し、有意な相関を認めた。GEM IC₅₀とhENT1/RRM1×RRM2、dCK/RRM1×RRM2の発現比との間には相関を認めなかった。

考 案

本研究ではヒト膵癌細胞株とGEM耐性誘導株のhENT1, dCK, RRM1, RRM2 mRNA発現解析を行ない、各遺伝子単独ではGEM感受性、獲得耐性と相関を認めず、4遺伝子の発現比がGEMへの感受性、獲得耐性において重要であることを明らかにした。

hENT1の発現はGEM耐性獲得過程において減少せず、親株でもIC₅₀と相関しなかった。また、dCKは低濃度耐性株で軽度増加するが、高耐性株では検出感度以下であり、dCK部分欠失が生じていることを明らかにした。RRM1はKLM1耐性株で著明に増加しており、RRM2はPCI耐性株で著明に増加していた。RR発現量の増加はdNTPsプールを増加させるため、これらの耐性株ではgemcitabine 活性体のDNAへの結合を競合的に阻害すると考えられる。また、dNTPsプールの増加はネガティブフィードバックを介してdCK活性も抑制するため、さらにGEM抵抗性を増強させると考えられる。

本研究では、GEM感受性におけるpositive regulatorであるhENT1×dCKと、negative regulatorであるRRM1×RRM2の発現比(hENT1×dCK/RRM1×RRM2)がGEM感受性と有意に相関し、この比の低下がGEMへの抵抗性、獲得耐性を反映することを明らかにした。今後、膵癌患者においてこの発現比を分子マーカーとして臨床応用することによって、GEM感受性に応じたオーダーメイド治療へ寄与できると考えられる。

結 論

定量的LightCycler RT-PCR解析により膵癌細胞株において4種類の遺伝子発現比がGEM感受性、獲得耐性と相関することを明らかにした。この遺伝子発現比は、膵癌患者のGEM治療の効果予測、獲得耐性予測に有用なマーカーになり得ると考えられる。

引用文献

1. Burris, H.A.3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F.A., Stephens, C.D. & Von Hoff, D.D. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, 15, 2403-2413.
2. Rauchwerger, D.R., Firby, P.S., Hedley, D.W. & Moore, M.J. (2000). Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity. *Cancer Res*, 60, 6075-6079.
3. Galmarini, C.M., Clarke, M.L., Jordheim, L., Santos, C.L., Cros, E., Mackey, J.R. & Dumontet, C. (2004). Resistance to gemcitabine in a human follicular lymphoma cell line is due to partial deletion of the deoxycytidine kinase gene. *BMC Pharmacol*, 24, 8.

参考論文

1. Habiro, A., Tanno, S., Koizumi, K., Izawa, T., Nakano, Y., Osanai, M., Mizukami, Y., Okumura, T. & Kohgo, Y. (2004). Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 71-77.
2. Koizumi, K., Tanno, S., Nakano, Y., Habiro, A., Izawa, T., Mizukami, Y., Okumura, T. & Kohgo, Y. (2005). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is necessary for gemcitabine-induced cytotoxicity in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*, 25, 3347-3353.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	中 野 靖 弘
<p>審査委員長 葛 西 真 一 ㊞</p> <p>審査委員 小 川 勝 洋 ㊞</p> <p>審査委員 奥 村 利 勝 ㊞</p> <p>審査委員 高 後 裕 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells (ヒト膵癌細胞株における抗癌剤ゲムシタピンへの獲得耐性と細胞内代謝関連遺伝子に関する研究)</p>			
<p>【目的】ゲムシタピン(GEM)は細胞内に取り込まれた後に活性体となるため、細胞内への取り込みや代謝に関わる経路は GEM の感受性や耐性化に関与すると考えられるが、GEM 耐性獲得過程において、これらの細胞内代謝関連遺伝子がどのように変化するのかについては明らかではない。GEM 耐性獲得過程における遺伝子変化によって膵癌の GEM 抵抗性を予測できれば、治療方針決定に寄与すると考えられる。今回、膵癌における GEM 抵抗性を予測する分子マーカーを明らかにするため、ヒト膵癌細胞株を用いて GEM 耐性獲得過程における細胞内代謝関連遺伝子の発現変化を検討した。</p> <p>【方法】ヒト膵癌細胞株 3 株を GEM 含有培地で継代し、耐性獲得過程における異なる耐性を有する GEM 耐性誘導株をそれぞれ 7 株ずつ樹立した。耐性誘導株の hENT1、dCK、RRM1 及び M2 mRNA の発現量を qRT-PCR 法にて定量し、耐性獲得過程における各遺伝</p>			

子発現量の変化を比較検討した。GEM 感受性 (IC50) は WST-1 assay 法にて測定した。さらに 8 種類のヒト肺癌細胞親株について各遺伝子発現量を定量し、GEM 感受性との相関を検討した。

【結果】耐性獲得過程において、各遺伝子の発現変化は細胞株により異なるパターンを示し、すべての細胞株に共通した遺伝子変化を認めなかった。そこで GEM への獲得耐性は単一遺伝子の発現変化によりもたらされるものではないと考え、GEM 感受性における negative regulator 遺伝子(RRM1, M2)発現量に対する positive regulator 遺伝子(hENT1, dCK)の発現比を算出したところ、すべての細胞株で GEM 耐性化の増強にしたがって遺伝子発現比の低下を認めた。さらにヒト肺癌細胞親株 8 株において、各遺伝子発現量と GEM 感受性には相関を認めなかったが、遺伝子発現比を算出した結果、GEM 感受性との間に有意な相関を認めた。

【結論】GEM の取込みや細胞内代謝に関与するこれら 4 遺伝子の発現比は、肺癌患者のゲムシタピン治療の効果予測、獲得耐性予測に有用なマーカーになり得ることが示唆された。

以上、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連領域に関する知識も十分であることが認められ、本論文審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。