104. 膵がんゲムシタビン抵抗性解除機構の解明と応用

立川　正憲

東北大学 大学院薬学研究科 薬物送達学分野

Key words：膵臓がん，ゲムシタビン，抵抗性解除機構，標的絶対定量プロテオミクス，質量分析

緒　言

膵がんは、5 年生存率がわずか 5 %程度と極めて予後不良な難治性がんであり、外科的切除療法と併せて、化学療法による治療成績の向上が急務である。膵臓がんの化学療法には、副作用が少ない核酸アナログであるゲムシタビンが用いられているが、効き目に個人差が極めて大きく、客観的奏功率は 15 %にも満たないという現状がある。そこで、ゲムシタビン抵抗性の分子機構を定量的に解明し、その機構を解除する薬剤の開発によって奏効率の向上が期待される。ゲムシタビン抵抗性の機構論的研究は、核酸輸送体の発現量変化についての論文発表が多くを占めるが、ゲムシタビン抵抗性との相関に関する明確な結論は得られていない。当研究室を含むこれまでの報告から、ゲムシタビン耐性を示す膵臓がん細胞株と感受性株との定量比較解析によって、ゲムシタビンががん細胞増殖抑制効果を発現するための律速酵素であるデオキシシチジンキナーゼ（deoxycytidine kinase、dCK）のタンパク質の発現量[1,2)] 及びゲムシタビンリン酸化量[1)] が、耐性株で顕著に低下していることが示されている。この結果は、dCK の発現量が低い膵臓がんに対し、dCK のタンパク質の発現量を上昇させることで、ゲムシタビン抵抗性を解除させることができる可能性を示している。近年発表された臨床疫学研究から、高血圧治療としてレニン－アンギオテンシン系阻害薬を服用していた膵がんの患者群では、ゲムシタビン治療による全生存期間の延長が報告されており[3)]、併用薬によってゲムシタビンの抗腫瘍効果を改善できることを示唆している。以上の研究背景を踏まえ、本研究では、膵臓がん手術検体及び細胞株を用いてゲムシタビン抵抗性の解除機構を解明するとともに、迅速な臨床応用を視野に入れ、併用によってゲムシタビン感受性を上昇させる臨床処方薬を同定することを目的とした。

方　法

1．原発性膵がん手術検体を用いた dCK タンパク質絶対発現量とゲムシタビン奏効率の相関性解明

標的タンパク質絶対定量法（Quantitative Targeted Absolute Proteomics, QTAP）[4,5)] を用いて、原発性膵臓がんの手術検体における dCK 絶対発現量を計測した。dCK タンパク質のアミノ酸配列情報から、*in silico* 設計法[4)] を用いて、定量標的とする dCK のペプチド配列を決定した[6)]。膵臓がん組織中の dCK 絶対発現量とゲムシタビン奏効率との相関関係を解析し、ゲムシタビン薬効予測マーカーとしての dCK の位置付けを検証した。本研究計画において、膵臓がん手術検体は、東北大学病院肝胆膵外科において手術の際に摘出されたがん組織を使用し、東北大学大学院医学系研究科･薬学研究科倫理委員会における承認のもと実施した。

2．dCK 発現量を誘導させる臨床処方薬の同定

dCK 発現量が少なくゲムシタビン感受性が低い膵臓がんモデル細胞株として AsPC-1 細胞を用い、臨床処方薬及びゲムシタビンを含有する培地で培養し、生細胞数を計測することで、併用による細胞増殖抑制効果を解析した。さらに、ヒトゲノム DNA からヒト dCK 5'flanking region をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上流につないだ dCK 転写活性化薬スクリーニング系を構築した（図 1）。ルシフェラーゼアッセイを行い、dCK 遺伝子の転写活性化を示す臨床処方薬のスクリーニングを行った。50 % growth inhibition concentration（GI_{50}）を算出し、細胞増殖抑制効果の増強について解析した。dCK タンパク質発現変化は、Western blot 法を用いて解析した。

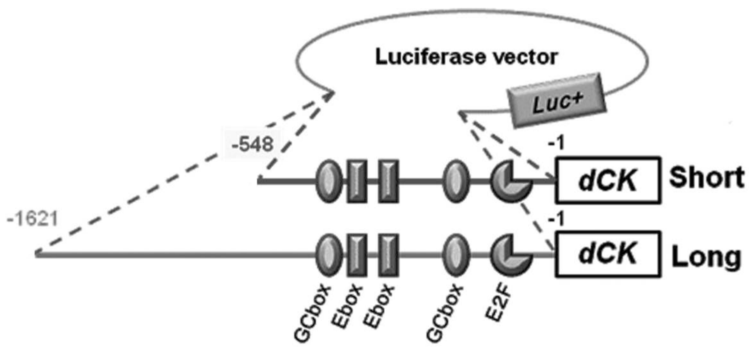

図 1.　Deoxycytidine kinase（dCK）プロモーター領域を用いたルシフェラーゼアッセイ系の模式図
ヒト dCK 5'flanking region（short と long バージョン）をクローニングし、ルシフェラーゼ（Luc+）遺伝子の上流につないだ dCK 転写活性化薬スクリーニング系（Luciferase vector）を構築した。

結果および考察

１．ゲムシタビン抵抗性の要因としてリン酸化酵素 dCK を同定

液体クロマトグラフィー-質量分析装置（LC-MS/MS）による QTAP の手法を用いて、がん組織のトリプシン消化産物を等電点電気泳動（IEF）で濃縮することで定量感度上昇に成功し、非濃縮に比べ約 10 倍の高感度な dCK 定量系を構築した。確立した分析法を用いて、原発性膵臓がん手術検体 40 例の細胞質画分における dCK 絶対発現量を決定した。相関解析の結果、膵がん組織中の dCK のタンパク質絶対発現量の低下度が、ゲムシタビン治療患者の奏効性を反映する臨床パラメーターと相関する傾向が示された。以上の結果から、リン酸化酵素 dCK がゲムシタビン抵抗性の要因であり、ゲムシタビン薬効予測マーカーとして、膵がん組織中 dCK タンパク質の絶対発現量が有用であることが示唆された（図 2）。

２．dCK 発現誘導によるゲムシタビン抵抗性解除薬の候補薬剤の同定

臨床処方薬 62 化合物の中から、単独では AsPC-1 細胞の増殖抑制活性を示さず、ゲムシタビンとの併用時に単独での細胞増殖抑制効果を 20 %以上増強させる薬物として、急性前骨髄球性白血病の治療薬である全トランス型レチノイン酸（all-trans retinoic acid、ATRA）ほか、4 種類の薬物を同定した。特に、ATRA 併用による細胞増殖抑制効果が最大であり、併用群ではゲムシタビン単独群と比較して、有意に細胞増殖活性が低下した。AsPC-1 の細胞増殖に対するゲムシタビンの GI_{50} は、10μM 濃度の ATRA 併用によってゲムシタビン単独時の約 3 倍低下し、ATRA によるゲムシタビン感受性増強効果が示された。ATRA は、急性前骨髄球性白血病治療剤として投与された場合の最大血漿中濃度付近またはそれを下回る 0.01-0.1μM の範囲において、ゲムシタビン単独での細胞増殖抑制効果を増強することが示された。さらに、dCK 転写活性化薬スクリーニングシステムを用いて、臨床処方薬を作用機序別に分類しヒット化合物を探索した結果、ATRA が同定された。Western blot 法を用いて、ゲムシタビンと ATRA を同時添加した場合に、AsPC-1 細胞の dCK タンパク質発現量が上昇することを示した。以上の結果から、ATRA は dCK の転写活性化を介し、dCK タンパク質発現量を上昇させることでゲムシタビン抵抗性を解除することが示唆された（図 2）。

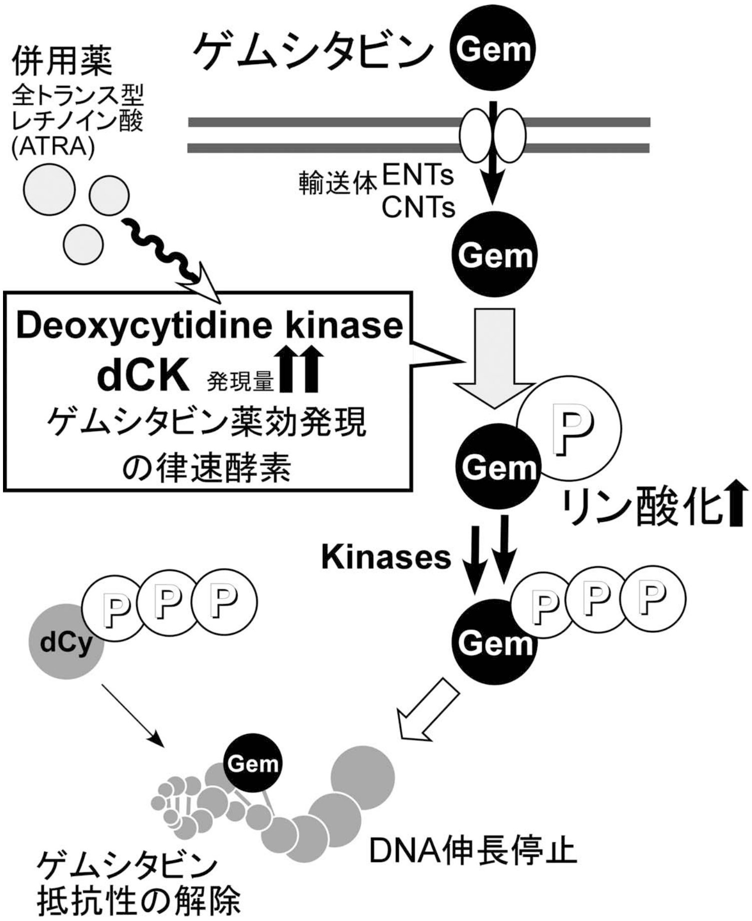

図 2.　膵臓がん細胞のゲムシタビン抵抗性解除機構における deoxycytidine kinase（dCK）の位置付けと併用薬による薬効増強効果

dCK の発現量が低い膵臓がん細胞に対し、dCK のタンパク質の発現量を上昇させることで、ゲムシタビン抵抗性を解除させることができる可能性がある。

ゲムシタビン増強薬の併用によるゲムシタビン化学療法（図 3）の proof-of-concept 確立のための今後の課題として、前向き研究によるヒト膵がん組織における dCK 絶対発現量の個人差と奏効率との関連性の確定、ゲムシタビン抵抗性解除機構における dCK の寄与確立、臨床承認薬のスクリーニング規模の拡大、*in vivo* 膵がんモデルでの検証があげられる。

図 3.　ゲムシタビン増強薬の併用によるゲムシタビン化学療法

膵臓がん治療におけるゲムシタビン化学療法と増強薬の位置づけを示した。ゲムシタビン増強薬の併用によるゲムシタビン化学療法の今後の課題として、前向き研究によるヒト膵がん組織における dCK 絶対発現量の個人差と奏効率との関連性の確定、ゲムシタビン抵抗性解除機構における dCK の寄与確立、臨床承認薬のスクリーニング規模の拡大、*in vivo* 膵がんモデルでの検証があげられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東北大学病院肝胆膵外科の大塚英郎、及び東北大学大学院薬学研究科薬物送達学分野の寺崎哲也である。

文　献

1) Ohmine K, Kawaguchi K, Ohtsuki S, Motoi F, Egawa S, Unno M, Terasaki T. Attenuation of phosphorylation by deoxycytidine kinase is key to acquired gemcitabine resistance in a pancreatic cancer cell line: targeted proteomic and metabolomic analyses in PK9 cells. Pharm Res. 2012;29(7):2006-16. doi: 10.1007/s11095-012-0728-2. PubMed PMID: 22419259.

2) Saiki Y, Yoshino Y, Fujimura H, Manabe T, Kudo Y, Shimada M, Mano N, Nakano T,Lee Y, Shimizu S, Oba S, Fujiwara S, Shimizu H, Chen N, Nezhad ZK, Jin G,Fukushige S, Sunamura M, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Unno M, Horii A. DCK is frequently inactivated in acquired gemcitabine-resistant human cancer cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012;421(1):98-104. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.122. PubMed PMID: 22490663.

3) Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Sasahira N, Hirano K, Kogure H, Kawakubo K, Yagioka H, Yashima Y, Mizuno S, Yamamoto K, Arizumi T, Togawa O, Matsubara S, Tsujino T, Tateishi K, Tada M, Omata M, Koike K. Inhibition of renin-angiotensin system affects prognosis of advanced pancreatic cancer receiving gemcitabine. Br J Cancer. 2010;103(11):1644-8. doi: 10.1038/sj.bjc.6605955. PubMed PMID: 20978506

4) Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, Sekine Y, Uchida Y, Ito S, Terasaki T. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. Pharm Res. 2008;25(6):1469-83. doi: 10.1007/s11095-008-9532-4. PubMed PMID: 18219561.

5) Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood-brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. Fluids Barriers CNS. 2013;10(1):21. doi: 10.1186/2045-8118-10-21. PubMed PMID: 23758935.

6) Ohmine K, Kawaguchi K, Ohtsuki S, Motoi F, Ohtsuka H, Kamiie J, Abe T, Unno M, Terasaki T. Quantitative Targeted Proteomics of Pancreatic Cancer: Deoxycytidine Kinase Protein Level Correlates to Progression-Free Survival of Patients Receiving Gemcitabine Treatment. Mol Pharm. 2015;12(9):3282-91. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00282. PubMed PMID: 26280109.