

# 論文内容の要旨

## 論文題目

### 腫瘍微小環境による細胞毒性抗がん剤への 耐性誘導メカニズムの解析と新しい治療法の開発

氏 名 小野塚 博子

#### 【背景・目的】

腫瘍組織は、がん細胞の異常な細胞増殖と様々な細胞の浸潤、不完全な血管形成により不均一な組織であることが知られている。正常組織では、秩序だった血管構築によって効率よく組織が血液で灌流される。一方、腫瘍組織では、がん細胞の異常な増殖によって既存の組織が破壊され、階層性のない脆弱な血管網が構築される (Nat Med.,9:685-93,2003)。このため、腫瘍組織への血液の灌流量が減少し、酸素の供給が不十分となる。酸素電極を用いた計測からは、腫瘍組織の酸素濃度は正常組織に比べて極端に低いことが示された (J Natl Cancer Inst., 93:266-76, 2001)。がん細胞は、このような環境に適応するため様々な変化を獲得する。Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) は低酸素環境で安定化され、細胞応答を引き起こす下流因子の転写を促進するため、腫瘍の形成や悪性化の経路と関連する。一方、がん細胞は周辺組織の酸素濃度に関わらず、解糖系を介してエネルギーを産生する (Science, 123:309-14, 1956)。がん細胞本来の高いグルコース消費性に加え、HIF-1 $\alpha$  は解糖系に関わる酵素の発現を増加し、がん細胞のグルコース消費を促進する。そのため、腫瘍組織の低酸素環境では、不十分な血液灌流による供給不足に加え、がん細胞によってグルコースが大量に消費されて枯渇する。胃がんと大腸がん組織の代謝産物の解析を行なった研究から、腫瘍組織は正常組織に比べてグルコース濃度が大幅に減少していることを明らかにした (Cancer Res.,11:4918-25, 2009)。すなわち、腫瘍内部の微小環境は、低酸素かつグルコース欠乏という特徴を持つ。

分子標的治療薬とともに、細胞毒性を主作用とした抗がん剤が広く使用されている。腫瘍組織

の不均一性が、これらの抗がん剤の作用に対し、どのように影響するかは十分に理解されていない。不十分な血流は、腫瘍組織への抗がん剤の輸送を妨げる。さらに、低酸素環境は ABC トランスポーターの発現を促進し、抗がん剤耐性を誘導する。低酸素環境での抗がん剤耐性機序は検討されているが、詳細は未だ明らかになっていない。

本研究では、腫瘍微小環境を低酸素だけでなくグルコース欠乏をともなった条件であると捉え、①腫瘍微小環境を模倣した条件が、抗がん剤に対する感受性に影響するか否かと、②もし影響するならば、その耐性機序を明らかにすること、そして③腫瘍微小環境の特徴を利用し標的とした新規抗がん剤を開発すること、を目的とした。

## 【結果・考察】

### 1. 腫瘍微小環境を模倣した条件での、がん細胞の抗がん剤感受性の解析

膵臓がん細胞株 PANC-1 を、通常条件 (21% O<sub>2</sub>, 1 g/L グルコース)、グルコース欠乏条件 (21% O<sub>2</sub>, 0 g/L グルコース)、低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>, 1 g/L グルコース)、低酸素グルコース欠乏条件 (1% O<sub>2</sub>, 0 g/L グルコース) で培養した。抗がん剤を 72 時間処置して細胞の抗がん剤に対する感受性を細胞生存率で評価した。ゲムシタビンの 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は、通常条件では 300 nM なのに対し、他の条件では IC<sub>50</sub>>300 μM となり、感受性は 1000 分の 1 以下となった(Fig.1)。

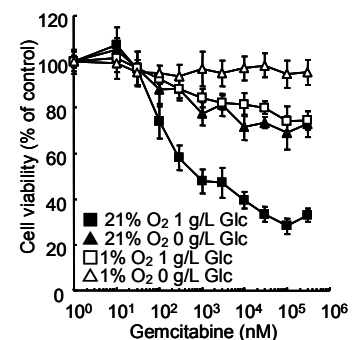


Fig.1 PANC-1 の抗がん剤に対する感受性

### 2. 低酸素グルコース欠乏条件での抗がん剤耐性機序の解析

#### ① 細胞周期の解析とゲムシタビンの取り込み量測定

細胞にとりグルコースが枯渇した場合、特にペントースリン酸経路を介した核酸の *de novo* 合成など増殖にとり必須のものが欠乏することになる。ゲムシタビンは、S 期で DNA に取り込まれて作用を発揮するため、細胞周期が停止した細胞では感受性が低下する。PANC-1 を通常条件と低酸素グルコース欠乏条件で培養し、新生された DNA を EdU で、DNA 総量を 7-aminoactinomycinD でラベルして細胞周期を解析した。低酸素グルコース欠乏条件において、細胞周期は S 期で遅延するものの、回転していた (Fig.2A)。トリチウムラベルしたゲムシタビンもちいて細胞内と DNA 内への取り込み量を測定すると、低酸素グルコース欠乏条件においても十分な取り込みが起こっていた(Fig.2B)。

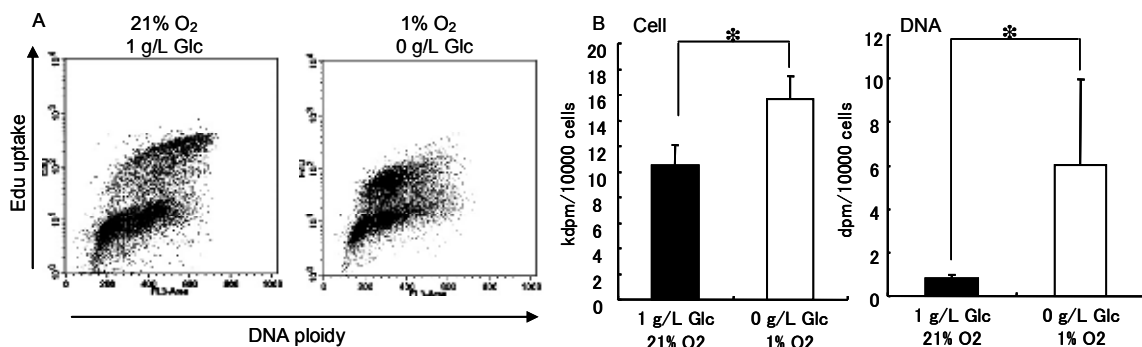


Fig.2 低酸素グルコース欠乏条件での細胞の挙動 (A) 細胞周期解析 (B) [<sup>3</sup>H] ゲムシタビンの取り込み量 (\*, P<0.05)

## ② 細胞周期チェックポイントの解析

DNA 内に取り込まれたゲムシタビンは、複製フォークを停止してチェックポイントキナーゼ (Chk) を活性化し、細胞周期停止と細胞死を誘導する。細胞周期が停止されると、その間に細胞は DNA 修復経路によって損傷を除去し、細胞死を回避する。ゲムシタビンは通常条件と低酸素グルコース欠乏条件の両方で等しく H2AX、Chk1、Chk2 のリン酸化を誘導し、細胞周期を S 期で停止した。細胞周期関連因子の阻害剤の中で、Chk1 阻害剤 (UCN-01、Gö6976、Chk1 siRNA) は、通常条件において細胞のゲムシタビンに対する感受性を増強することを見出した。

## ③ 細胞生存因子の解析

ストレス条件において、細胞は生存因子を活性化して細胞死を回避する。PANC-1 では、低酸素条件で HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  が、低酸素とグルコース欠乏条件で Akt が活性化した。HIF-1 $\alpha$  siRNA と HIF-2 $\alpha$  siRNA をもちいて HIF 経路を阻害した細胞において、低酸素条件での耐性は解除されなかった。Akt の上流因子である PI3K 阻害剤 (LY294002) をゲムシタビンと併用すると、通常条件において細胞のゲムシタビンに対する感受性をわずかに増強したものの、低酸素グルコース欠乏条件での耐性を解除しなかった。

## ④ 2つのキナーゼ阻害剤の併用による耐性解除

低酸素グルコース欠乏条件での耐性を解除するため、阻害剤を併用することを試み、Chk1 阻害剤と細胞生存因子の阻害剤を併用した。UCN-01 と HIFs siRNA をゲムシタビンと併用した場合、HIFs siRNA は UCN-01 による感受性増強作用に影響せず、低酸素条件での耐性も解除しなかった。UCN-01 と LY294002 をゲムシタビンと併用すると、通常条件で細胞のゲムシタビンに対する感受性を大きく増強し、低酸素グルコース欠乏条件での耐性を一部解除した (Fig.3A)。他の Chk1 阻害剤 (Gö6976、Chk1 siRNA) と LY294002 をゲムシタビンと併用しても、耐性を解除しなかった (Fig.3B,C)。低酸素グルコース欠乏条件での耐性には、UCN-01 の Chk1 以外の標的と、PI3K-Akt 系の関与が明らかになった。

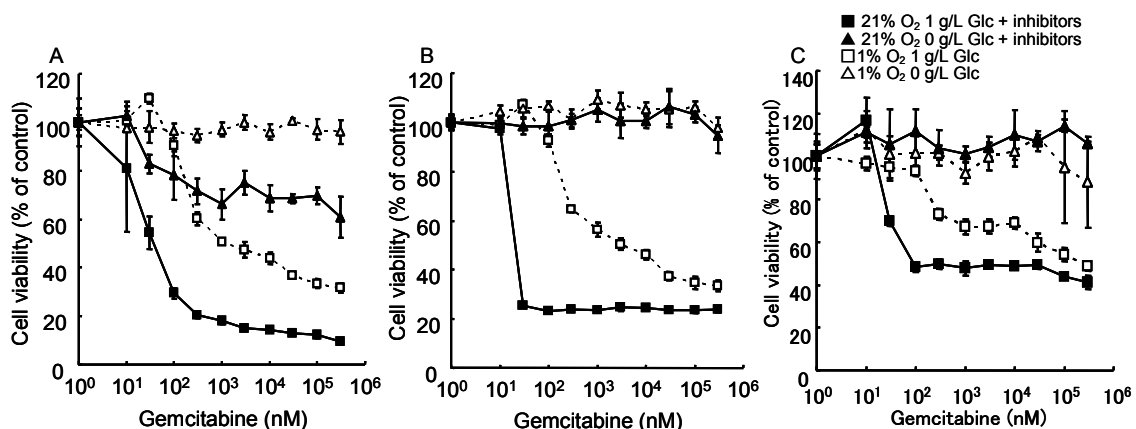


Fig.3 Chk1 阻害剤と LY294002 のゲムシタビンとの併用効果 (A) UCN-01 + LY294002、(B) Gö6976 + LY294002、(C) Chk1 siRNA + LY294002

## 3. 他のがん細胞株での耐性機序の解析

DLD-1 細胞は、膵臓がん細胞株や他の大腸がん細胞株と比べて Akt 発現量が低く、PI3K-Akt 経路への依存の低い細胞であると考えられた。大腸がん細胞株 DLD-1 細胞のゲムシタビンに対

する感受性変化を指標として、PANC-1 細胞で見出した耐性機序が他の細胞株でも成り立つかを検討した。DLD-1 細胞は、通常条件でのゲムシタビンに対する感受性が低く、低酸素グルコース欠乏条件では感受性をほとんど示さなくなった。この細胞で、UCN-01 とゲムシタビンを併用すると、通常条件と低酸素グルコース欠乏条件の両方で感受性を強く増強した。UCN-01 と LY294002 をゲムシタビンと併用すると、UCN-01 単独の時よりもさらに感受性を増強した。大腸がん細胞株、DLD-1 由来のマウス皮下腫瘍モデルを用い、週一回、三週間試薬を腹腔内投与した。ゲムシタビン 10 mg/kg 投与群では、溶媒投与群と比較して有意な差はなかった。UCN-01 2.5 mg/kg と LY294002 25 mg/kg をゲムシタビンと併用した群では、有意な増殖抑制作用を示した (Fig.4)。

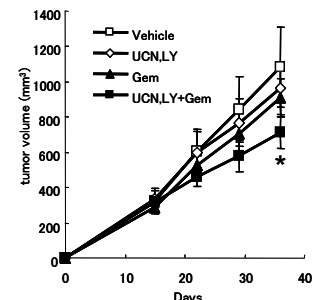


Fig.4 UCN-01 と LY294002 の in vivo で のゲムシタビンとの併用効果 (\* $P < 0.05$ )

#### 4. 腫瘍微小環境の特徴を利用し標的とした新規抗がん剤開発

当研究室で開発されたアッセイ手法をもちいて、静岡県ファルマバレーセンター所蔵の 3 万化合物のスクリーニングを行い、グルコース欠乏条件選択的に殺細胞作用を示す抗がん剤候補化合物 (PVZB1077) を見出した。PVZB1077 は、2 種類の細胞株 (PANC-1、Capan-1) でグルコース欠乏条件においてより効果的な作用を持つことを見出した。PVZB1077 は、PANC-1 細胞の Akt リン酸化をグルコース欠乏条件でのみ抑制することを見出した (Fig.5A)。膵臓がん細胞株 Capan-1 と大腸がん細胞株 HCT-116 由来のマウス皮下腫瘍モデルを用い、週 4-5 回、250 と 500  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で三週間、試薬を腹腔内投与した。PVZB1077 は 2 種の細胞株由来の皮下腫瘍において、それぞれ有意な増殖抑制効果を示した (Fig.5B)。

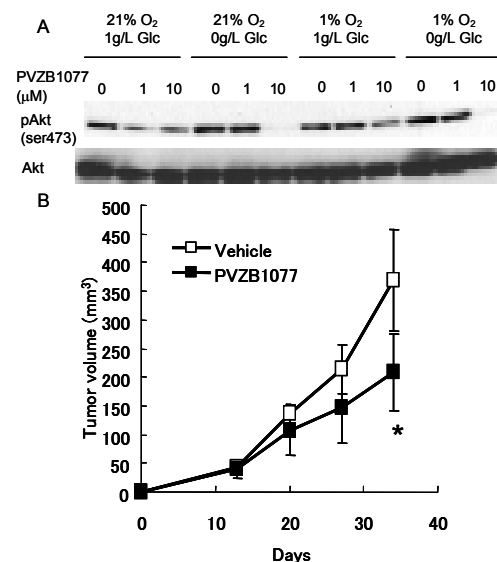


Fig. 5 PVZB1077 の作用解析 (A) PANC-1 細胞における Akt リン酸化に対する影響 (B) Capan-1 皮下腫瘍モデルを用いた抗腫瘍試験 (\* $P < 0.05$ )

#### 【結論】

本研究では、腫瘍微小環境を模倣した条件でがん細胞を培養すると多剤耐性が誘導されること、この耐性には UCN-01 の Chk1 以外の標的因子と PI3K-Akt 系が関与することを明らかにした。また、腫瘍微小環境を利用し標的とした抗がん剤スクリーニング系により、新規抗がん剤開発が可能になることを証明した。