

膵臓がんに対する新規併用化学療法の基礎的検討

応用薬物治療部門 森元能仁

【緒言】

膵臓がんは他のがん種と比べ悪性度が高く、化学療法の治療効果が乏しい。発見時は進行期であることが多いため予後は極めて悪く、新規治療法の臨床開発が望まれている。本邦においてゲムシタビン (GEM) と TS-1 (S-1) が膵臓がんに対するキードラッグであり、併用療法もしくは単剤療法で頻用されている。しかし併用療法について基礎レベルでの知見は少なく、更なるエビデンスの集積が待望されている。そこでヒト膵臓がん細胞株を用いて GEM と S-1 の併用療法の基礎的検討を行い、詳細なメカニズムを明らかにすると同時により効果的な治療法を検討した。

【結果・考察】

1. GEM と S-1 の併用療法の基礎的検討

MTT assay にて細胞増殖抑制効果について膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いて検討した結果、GEM と S-1 の併用は相乗効果を示した。フローサイトメトリー (FACS) を用いて細胞周期への影響を観察したところ、併用群において S 期細胞の蓄積が観察された。そこで S 期遅延のメカニズムを Western blotting で検討した結果、GEM と S-1 の併用群はそれぞれの単剤群と比較し checkpoint kinase 1 (Chk1) を活性化することが明らかとなった。

2. Chk1 阻害剤 (prexasertib) と GEM、S-1 を併用した新規治療法の検討

Chk1 が活性化すると、細胞周期を S 期で遅延させて、その間に障害を受けた DNA を修復することでアポトーシスから逃れることができ、結果的に抗がん剤の耐性機序となっていることが報告されている。そこで Chk1 阻害剤の prexasertib を用いて GEM、S-1 との併用効果について膵臓がん細胞株 SUIT-2 を用いて検討した。MTT assay を行った結果、prexasertib と GEM あるいは S-1 との併用はそれぞれ相乗効果を示した。更に prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用がそれぞれの 2 剤併用に比べて高い効果を示した。アポトーシスの検出を Cell Death Detection ELISA を用いて行った結果、prexasertib + GEM + S-1 の 3 剤併用が最もアポトーシスの誘導を増加させた (Figure 1)。Hoechst 33342 で核を染色すると、prexasertib + GEM + S-1 群ではアポトーシスの形態学的変化の特徴である核の凝縮と断片化を多く認めた。また、Western blotting によりアポトーシス関連タンパク質の発現量を検討したと

ころ、prexasertib + GEM + S-1 群で cleaved caspase 3 と cleaved PARP の発現増加が認められた。さらにアポトーシスを制御している Bcl-2 ファミリーを調べた結果、prexasertib + GEM + S-1 群では Bcl-2 の発現が大きく抑制されていた。また特異的 siRNA を用いた Chk1 のノックダウンが GEM + S-1 のアポトーシス誘導に与える影響を検討した結果、Chk1 のノックダウンは GEM + S-1 によるアポトーシスの誘導を増加させた。また Chk1 ノックダウン + GEM + S-1 群では Bcl-2 の発現が大きく抑制されていた。

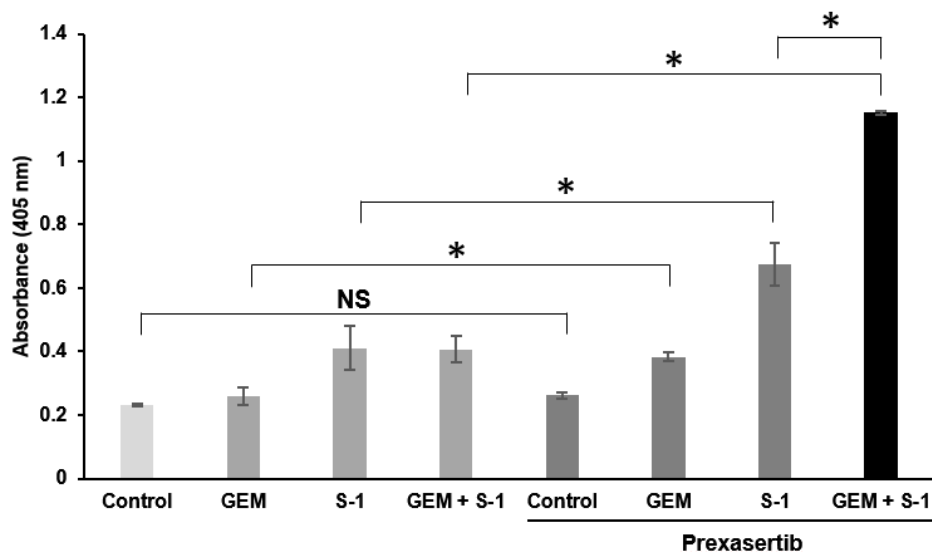


Figure 1. Prexasetib + GEM + S-1 によるアポトーシス誘導

3. Bcl-2 ファミリーをターゲットとした新規治療法の検討

ミトコンドリアの機能に注目し、選択的 Bcl-2 阻害剤の venetoclax (ABT-199) と非選択的 Bcl-2 阻害剤 (Bcl-2, Bcl-xL を阻害) の navitoclax (ABT-263) を用いて併用効果の検討を行った。MTT assay の結果、venetoclax は各々の薬剤 (GEM, S-1, prexasertib) と併用効果を認めなかったが、navitoclax は prexasertib と高い相乗効果を示した。そこで SUIT-2 に加えて他の膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 と BxPC-3 についても検討を行った結果、BxPC-3 でも同様に venetoclax ではなく navitoclax

と prexasertib は高い併用効果を認めた。アポトーシスの検出を Cell Death Detection ELISA を用いて行った結果、SUIT-2 と BxPC-3 において prexasertib と navitoclax の併用群はそれぞれの単剤群と比較しアポトーシスの誘導を増加させた。SUIT-2 において特異的 siRNA を用いた Bcl-2 のノックダウンが prexasertib によるアポトーシス誘導作用へ及ぼす影響について検討した結果、アポトーシスは誘導されなかった。しかし Bcl-xL をノックダウンした結果、prexasertib の用量依存的にアポトーシスが誘導された (Figure 2)。

このことから、prexasertib と navitoclax による相乗的細胞増殖抑制効果は Bcl-2 ではなく Bcl-xL の阻害によるアポトーシス誘導であることが示された。また 3 つの膵臓がん細胞株において、venetoclax による臨床上的効果が認められている白血病の細胞株である HL-60 と比較して、Bcl-2 のタンパク質の発現量は極めて低く、Bcl-xL は逆に高いことが明らかとなった。さらに、内因性の Bcl-xL と Chk1 の両方のタンパク質の発現量が高いと、prexasertib と navitoclax の併用効果が高い結果が得られたことから、Bcl-xL と Chk1 のタンパク質の発現量は効果予測バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

【結論】

本検討により膵臓がんの標準的薬物治療法である GEM と S-1 の併用療法における耐性機序として Chk1 活性化を明らかにし、Chk1 阻害剤を併用することで効果的な併用効果が得られることが示された。さらにその併用効果発現の詳細なメカニズムの検討を Bcl-2 ファミリーに着目して進めた結果、Chk1 と Bcl-xL の同時阻害は膵臓がんに対する新たな治療法となる可能性が示唆された。

【本研究の誌上発表】

Yoshihito Morimoto, Osamu Takeuchi, Asako Takizawa, Hiroshi Yoneyama, Fumiki Asanuma, Yukio Suzuki, Koichiro Atsuda, Yoshinori Yamada. Effect of a combination of S-1 and gemcitabine on cell cycle regulation in pancreatic cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, **23**, 505-514, 2012.

Yoshihito Morimoto, Kimihiko Takada, Osamu Takeuchi, Akinori Takagi, Kazuhiro Watanabe, Masayoshi Hirohara, Tomoyuki Hamamoto, Yutaka Masuda. Prexasertib increases the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine and S-1. *Oncology Reports*, **43**, 689-699, 2020.

Yoshihito Morimoto, Kimihiko Takada, Osamu Takeuchi, Kazuhiro Watanabe, Masayoshi Hirohara, Tomoyuki Hamamoto, Yutaka Masuda. Bcl-2/Bcl-xL inhibitor navitoclax increases the antitumor effect of Chk1 inhibitor prexasertib by inducing apoptosis in pancreatic cancer cells via inhibition of Bcl-xL but not Bcl-2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **472**, 187-198, 2020.

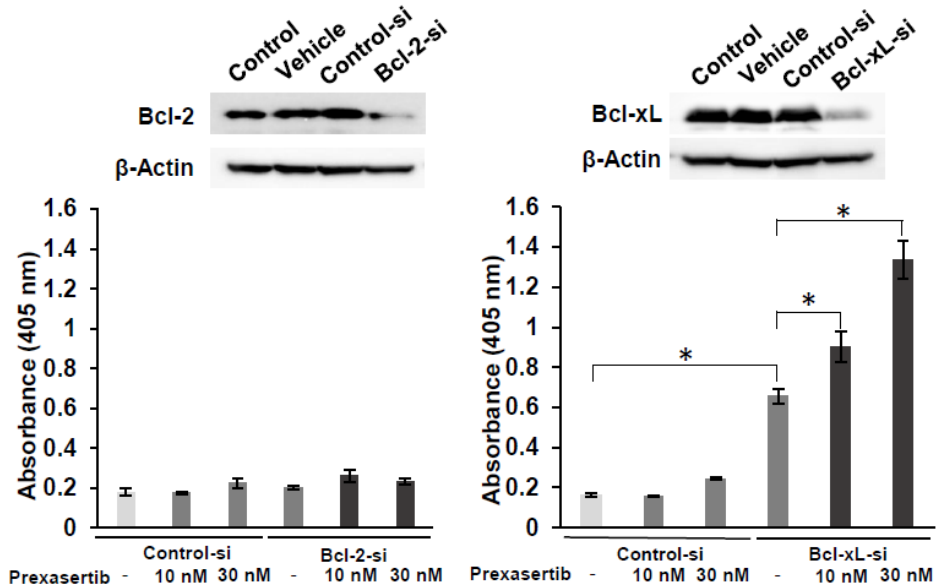


Figure 2. Bcl-2 もしくは Bcl-xL のノックダウンが prexasertib によるアポトーシス誘導作用に及ぼす影響