Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-23

Synergistic effects of pemetrexed and amrubicin in non-small cell lung cancer cell lines: potential for combination therapy

Hatakeyama, Yukihisa

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2014-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第5991号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005991

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Synergistic effects of pemetrexed and amrubicin in non-small cell lung cancer cell lines: potential for combination therapy

非小細胞肺癌細胞株におけるペメトレキセドとアムルビシン併用療法による相乗的効果の検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
呼吸器内科学
（指導教員：西村善博特命教授）

畠山　由記久

進行期非小細胞肺癌の化学療法の第一選択はプラチナ製剤と第3世代抗癌剤の併用療法である。日本での奏功率は約30%、生存期間中央値は約13か月と未だ予後不良な疾患である。分子標的薬の分野は目覚ましい進歩を遂げているが、期待に応える薬剤はいまだ十分ではない。そのため既存の抗癌剤を用いた新たな治療法の開発も望まれる。

葉酸代謝拮抗薬であるペメトレキセドは、プリン及びピリミジンの合成に使用される3つの酵素、チミジル酸生成酵素（ＴＳ）、ジヒドロフォレート還元酵素(DHFR)、グリシンアミドリボヌクレオチド・ホルミル基転移酵素(GARFT)を阻害することによって、プリン及びピリミジンヌクレオチド前駆体の合成阻害に働き、癌細胞の成長・生存延長に必須であるDNA、RNAの合成を阻害する。またペメトレキセドは細胞障害性をS期で発揮することも報告されている（Azrak RG, et al. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1121-9)。

一方でアムルビシンと同じトポイソメラーゼ阻害剤には細胞周期のS期の細胞を増加させるという働き（Azrak RG, et al. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1121-9）とTSの発現を抑制するという働きが報告されている（Takiuchi H, et al. *Gastrointestinal Cancer Res.* 2007; 1: 171-6）ことから、アムルビシン投与によりS期に細胞周期をとどめ、さらにはTS発現を抑制することで、ペメトレキセドの薬理作用を増強できるのではないかとの着想に至った。そこで非小細胞肺癌細胞株（A549,H460,H520）を用いた *in vitro* での2薬剤同時投与による腫瘍増殖抑制試験を行い、Combination indexの手法を用いてその併用効果の解析を行った。A549,H460のAMRol IC50値は0.016μM,H520 AMRol IC50値は0.064μM前後であった。Combination index（C.I）を用いた薬物相互作用解析ではA549、H460において50%効果用量(ED_{50})を挟んで濃度依存的にC.Iが低下(A549: ED_{50} 0.63 ± 0.22, ED_{75} 0.39 ± 0.14, ED_{90} 0.31 ± 0.19, H460:ED_{50} 0.93 ± 0.30, ED_{75} 0.66 ± 0.12, ED_{90} 0.53 ± 0.03)しており広範囲において相乗効果を認めた。

次に相乗効果の機序についてさらなる検討を行うために、我々はrealtime RT-PCRやwestern blotなどの手法を用いて、アムルビシンの生体内代謝産物であるアムルビシノール投与による葉酸代謝経路に関わるTS,DHFR,GARFTへの影響を測定した。投与量をコントロール、IC50、IC50×10、IC50 ×100と設定した。realtime RT-PCRではA549,H460各4群おいてTSはAMRol投与の用量依存的に抑制が見られた。DHFR及びGARFT発現量比較もTSに準ずるものであった。H520に関しては各投与群間に有意な発現の差は見られなかった。Western blottingの結果は、TSの発現レベルは各細胞株においてアムルビシンの投与により概ね用量依存的にTSの発現が抑制された。

TSの抑制がペメトレキセドの抗腫瘍効果の増強につながるものであることを確認するためにSiRNAによりTSがノックダウンされた条件(コントロール群:ノックダウン群＝1:0.11,p=0.0007)でのペメトレキセド投与試験を行い、評価を行ったところコントロール群に比べてTSノックダウン群において、腫瘍増殖抑制がより認められた。

また、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の組成変動の検討を行った。アムルビシノール投与の段階的濃度別投与を行い、IC50値でのS期の増加を確認(A549 コントロール:12.99±2.28%→IC50:27.84±3.47%, H460 コントロール:12.33±3.68%→IC50:20.93±7.60%, H520 コントロール:19.50±1.76%→IC50:59.20±8.91%)するとともに、アムルビシノールの暴露時間を変更し評価

したところ、投与後の S 期細胞の時間依存的な増加を確認(A549 0h:14.45±1.65%→24h:26.50±0.80%, H460 0h:16.09±6.36% → 24h:22.82±11.3%, H520 0h:15.25±2.89% → 24h:39.99±16.46%)することが出来た。細胞周期の S 期への移行増加がペメトレキセドの抗腫瘍効果増強に寄与することを確認するために *in vitro* での G1/S 期への細胞周期同調条件下でのペメトレキセド投与も行った。細胞周期同調条件下投与での腫瘍増殖抑制はコントロール群との比較でより強く、アムルビシノールで引き起こされた S 期同調がペメトレキセドへの抗腫瘍効果の増強に影響している可能性が示唆された。

次に *in vitro* で得られた相乗効果の確認と毒性評価のため、担癌マウスモデルを作成して、薬効、および毒性に関する検討を行った。*in vivo* における評価項目として、抗腫瘍効果を相対腫瘍体積 (RTV) の推移で、また毒性を体重減少の推移で観察した。観察期間は 30 日間を超えない期間とし、英国癌研究調整委員会 (UKCCCR) および神戸大学内規則・ガイドラインに基づき飼育を行った。2 剤併用療法群のマウスは他群のペメトレキセド単剤投与群、アムルビシン単剤投与群、コントロール群のマウスと比較し RTV の抑制を認めた。体重減少は 2 剤併用群、他群と有意差がなく、併用群の毒性評価も許容出来る結果となった。

以上から 2 剤併用で得られた相乗効果の作用機序の一つとして、仮説で提唱したアムルビシノールによる TS の抑制、細胞周期の S 期への移行がペメトレキセドの抗癌剤感受性を向上させることにより、相乗効果を生み出している可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2381号	氏　名	畠山　由記久
論文題目 Title of Dissertation	Synergistic effects of pemetrexed and amrubicin in non-small cell lung cancer cell lines: potential for combination therapy 非小細胞肺癌細胞株におけるペメトレキセドとアムルビシン併用療法による相乗的効果の検討		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 眞庭謙昌 副　査 Vice-examiner 南博信 副　査 Vice-examiner 平井みどり		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

進行期非小細胞肺癌の化学療法の第一選択はプラチナ製剤と第 3 世代抗癌剤の併用療法である。日本での奏功率は約 30%、生存期間中央値は約 13 か月と未だ予後不良な疾患である。分子標的薬の分野は目覚ましい進歩を遂げているが、期待に応える薬剤はいまだ十分ではない。そのため既存の抗癌剤を用いた新たな治療法の開発も望まれる。

葉酸代謝拮抗薬であるペメトレキセドは、プリン及びピリミジンの合成に使用される 3 つの酵素、チミジル酸生成酵素（TS）、ジヒドロフォレート還元酵素(DHFR)、グリシンアミドリボヌクレオチド・ホルミル基転移酵素(GARFT)を阻害することによって、プリン及びピリミジンヌクレオチド前駆体の合成阻害に働き、癌細胞の成長・生存延長に必須である DNA、RNA の合成を阻害する。またペメトレキセドは細胞障害性を S 期で発揮することも報告されている（Azrak RG, et al. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1121-9)。一方でアムルビシンと同じトポイソメラーゼ阻害剤には細胞周期の S 期の細胞を増加させるという働き（Azrak RG, et al. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1121-9）と TS の発現を抑制するという働きが報告されている（Takiuchi H, et al. *Gastrointestinal Cancer Res.* 2007; 1: 171-6)。以上のことから、アムルビシン投与により S 期に細胞周期をとどめ、さらには TS 発現を抑制することで、ペメトレキセドの薬理作用を増強できるのではないかとの着想に至り、非小細胞肺癌細胞株（A549, H460, H520）を用いた *in vitro* での 2 薬剤同時投与による腫瘍増殖抑制試験を行い、Combination index の手法を用いてその併用効果の解析を行った。

ペメトレキセドとアムルビシンの生体内代謝産物であるアムルビシノール（AMRol）投与による Combination index（C.I）を用いた薬物相互作用解析では、A549、H460 において広範囲において相乗効果を認めた。次に相乗効果の機序についてさらなる検討を行うために、Real-time RT-PCR や western blot などの手法を用いて、AMRol 投与による葉酸代謝経路に関わる TS, DHFR, GARFT への影響を測定した。Real-time RT-PCR による検討で、A549, H460 各 4 群おいて TS は AMRol 投与の用量依存的に抑制が見られた。DHFR 及び GARFT 発現量比較も TS に準ずるものであった。H520 に関しては各投与群間に有意な発現の差は見られなかった。Western blotting の結果は、TS の発現レベルは各細胞株においてアムルビシンの投与により概ね用量依存的に TS の発現が抑制された。TS の抑制がペメトレキセドの抗腫瘍効果の増強につながるものであることを確認するために siRNA により TS がノックダウンされた条件でのペメトレキセド投与試験を行い、評価を行ったところコントロール群に比べて TS ノックダウン群において、腫瘍増殖抑制がより認められた。

また、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の組成変動の検討を行ったところ、投与後の S 期細胞の時間依存的な増加を確認することが出来た。細胞周期の S 期への移行増加

がペメトレキセドの抗腫瘍効果増強に寄与することを確認するために *in vitro* での G1/S 期への細胞周期同調条件下でのペメトレキセド投与も行った。細胞周期同調条件下投与での腫瘍増殖抑制はコントロール群との比較でより強く、アムルビシノールで引き起こされた S 期同調がペメトレキセドへの抗腫瘍効果の増強に影響している可能性が示唆された。

さらに *in vitro* で得られた相乗効果の確認と毒性評価のため、担癌マウスモデルを作成して、薬効、および毒性に関する検討を行った。*in vivo* における評価項目として、抗腫瘍効果を相対腫瘍体積（RTV）の推移で、また毒性を体重減少の推移で観察した。2 剤併用療法群のマウスは他群のペメトレキセド単剤投与群、アムルビシン単剤投与群、コントロール群のマウスと比較し RTV の抑制を認めた。体重減少は 2 剤併用群、他群と有意差がなく、併用群の毒性評価も許容出来る結果となった。

本研究は、肺癌細胞におけるアムルビシンとペメトレキセドの 2 剤同時投与による相乗効果を明らかにした研究であるが、従来ほとんど行われなかったチミジル酸生成酵素（TS）の発現および細胞周期依存的な抗腫瘍効果の分析によって重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。