

原 著

新規抗がん剤候補としてのレクザイムを用いた
悪性中皮腫細胞に対する多剤併用効果の検討

佐藤 稔之,^{a,b} 立田 岳生,^b 菅原 栄紀,^b 原 明義,^a 細野 雅祐^{b*}

Combinatorial Treatment Using Leczyme as a New Candidate of
Anti-Cancer Drug for Malignant Mesothelioma Cell Lines

Toshiyuki SATOH,^{a,b} Takeo TATSUTA,^b Shigeki SUGAWARA,^b Akiyoshi HARA,^a and Masahiro HOSONO^{b*}

^aDepartment of Clinical Pharmacotherapeutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University; ^bDivision of Cell Recognition Study, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Medical and Pharmaceutical University.

(Received November 20, 2017)

Malignant mesothelioma is one of the aggressive cancer that results most commonly from exposure to asbestos. Treatment options of this cancer are limited even in the case of chemotherapy. Moreover, mesothelioma often becomes resistant to pemetrexed and cisplatin, the key drugs for the mesothelioma treatment. Sialic acid binding lectin isolated from *Rana catesbeiana* oocytes (cSBL) shows remarkable anti-tumor effects caused by its ribonuclease activity in mesothelioma cells and exhibits high synergistic effect with pemetrexed. To find more effective combination regimen of cSBL, we examined currently estimated anti-mesothelioma drugs, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and EGF receptor-tyrosine kinase inhibitors (erlotinib, gefitinib, and vandetanib), by using pemetrexed-resistant cell lines, H28-PR and H2452-PR, *in vitro*. Consequently, the former showed slightly cross-resistance to gefitinib and the latter to cisplatin, cSBL, gefitinib, and vandetanib, respectively. In multiple drugs combination study, pemetrexed + cSBL and pemetrexed + cisplatin + cSBL were higher effective than the other regimens from the aspects of antiproliferative and synergistic effects. Cleavage of Bid and caspase-3 protein which is the sign of apoptosis, and both downregulation of p21 and stabilization of cyclin A which is of cytostatic effects, were detected dependent on the drugs used in the combination treatments. According to these results, we estimated that pemetrexed + cSBL + TRAIL combination showed strong synergy by playing the role without any interference and may serve as a rational regimen with the object of anti-proliferative mechanism. In conclusion, our results indicated that cSBL-containing combination treatments show promise for the treatment of malignant mesothelioma.

Key words — Combination chemotherapy, drug resistance, malignant mesothelioma, sialic acid binding lectin

緒 論

悪性中皮腫は、難治性の高悪性度腫瘍であり、悪性中皮腫患者の約70~80%において、アスベスト暴露歴が報告されている。¹⁻⁵⁾ 化学療法では、葉酸代謝拮抗薬のpemetrexedと、白金製剤であるcisplatinの併用レジメンが³⁾、cisplatin単剤と比較して生存期間を有意に延長することが報告され(12.1カ月対9.3カ月, P=0.02),⁶⁾ 米国では2004年2月に、日本では2007年1月にそれぞれ悪性中皮腫の標準レジメンとして承認された。しかし、このが

んは、多くの化学療法剤に対して高い抵抗性を示し、放射線療法や手術療法に対しても抵抗性を示す。^{6,7)} さらに、pemetrexed + cisplatin 併用療法を行った患者のほとんどで、1年以内のがんの増悪または再発、^{8,9)} あるいは薬剤耐性を生じることが明らかになっている。¹⁰⁾ 薬剤耐性の詳細なメカニズムはいまだ不明な点も多いが、pemetrexedの主要な標的分子であるチミジル酸シンターゼ(TS)¹⁰⁻¹²⁾ や、多剤耐性に関与するABCCファミリータンパク質¹³⁻¹⁵⁾ の発現増加が耐性獲得の原因となっていることが報告されている。近年では、非臨床試験あるいは臨床試験で、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKIs)や抗体医薬品の単独または併用療法が悪性中皮腫に効果を示すことが報告されており、^{1,16-20)} また、切除不能例に対

^a東北医科薬科大学薬学部薬物治療学教室, ^b東北医科薬科大学薬学部分子生体膜研究所分子認識学教室

*e-mail: mhosono@tohoku-mpu.ac.jp

する pemetrexed + cisplatin + bevacizumab 3 剤併用療法などが期待を集めているが、¹⁹⁾ いまだ悪性中皮腫に対し、安定で高い治療効果を発揮する薬剤の選択は困難であり、新たな治療薬の開発が望まれている。

ウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン (Sialic acid binding lectin isolated from *Rana catesbeiana* oocytes, cSBL) は、レクチン活性、^{21,22)} リボヌクレアーゼ (RNase) 活性、²³⁾ および抗腫瘍活性²²⁾ を併せ持つ多機能性タンパク質であることから“レクザイム”とも呼ばれている。cSBL は、RNA を標的としたこれまでにない抗腫瘍メカニズムを介することから、新規がん治療薬の候補になり得ると考えられている。これまでに、悪性中皮腫を含む多くのがん細胞株に対し、アポトーシス誘導を介した細胞傷害作用を示すことが報告されている。²⁴⁾ さらに、*in vitro* において、悪性中皮腫細胞株に対して細胞傷害作用が認められている腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (TRAIL)²⁴⁾ あるいは悪性中皮腫治療のキードラッグである pemetrexed²⁵⁾ との併用で、また、肝細胞がんに対しては免疫調節作用を持つインターフェロン γ (IFN- γ)²⁶⁾ との併用で、cSBL はいずれも高い相乗性をもつ細胞傷害作用を示すことが報告されている。

今回、新しい悪性中皮腫治療薬の候補として cSBL、TRAIL および EGFR-TKIs (erlotinib, gefitinib, vandetanib) に着目し、それらの有効性を検討した。また、臨床で治療を行う際の障壁の一つとなる pemetrexed 耐性に着目し、この薬物に対する耐性細胞を新規に樹立、または入手し、耐性化した細胞に対する各薬剤の効果について確認した。さらに、2 剤あるいは 3 剤併用時の細胞増殖抑制効果および併用効果についても検討を行い、相乗性・作用機序の観点から合理的な多剤併用に関する考察を行った。

実験材料および実験方法

1. 細胞培養

悪性中皮腫細胞株 NCI-H28 (H28) (肉腫性)、NCI-H2452 (H2452) (上皮性) および不死化非悪性中皮細胞株 MeT5A は、American Type Cell Culture Collection より購入した。Pemetrexed 耐性 H28 細胞株 (H28-PR) は、以下に記載する方法で樹立したものをを用いた。Pemetrexed 耐性 H2452 細胞

(H2452-PR) は、千葉大学大学院医学研究院先端化学療法学滝口裕一教授より譲渡されたものをを用いた。H28、H2452 および各耐性細胞は、10% 非働化牛胎児血清 (FBS, Biosera 社製) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬社製) 中で培養した。MeT5A 細胞は、3.3 nM 上皮成長因子 (EGF)、400 nM ヒドロコルチゾン、870 nM インスリン、20 mM HEPES、10% FBS を含む Medium 199 with Earle's balanced salt sodium (75 mM L-glutamine, 1.25 g/L 炭酸水素ナトリウムを含む, Sigma 社製) を用いて培養した。いずれの細胞も培地に 100 U/mL ペニシリン G、100 μ g/mL ストレプトマイシンを加え、37°C、飽湿、5% CO₂ 条件下で培養した。

2. 材料

今回用いた cSBL はすべて大腸菌発現系を用いたリコンビナント体であり、既報²⁷⁾ に従い作成、精製したものをを用いた。表記はすべて cSBL とした。Pemetrexed disodium salt heptahydrate は LC Laboratories より、cisplatin および erlotinib hydrochloride は和光純薬工業より、gefitinib および vandetanib は SYNkinase より購入した。抗 caspase-3 抗体、抗 Bid 抗体、抗 p21 抗体 (12D1)、Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体および HRP 標識抗ラビット IgG 抗体は Cell Signaling Technology より、抗 cyclin A 抗体 (H-432) は Santa Cruz Biotechnology より、抗 β -actin 抗体は Sigma-Aldrich より購入したものをを用いた。

3. Pemetrexed 耐性 H28 細胞株の樹立

6-well plate に H28 細胞を 1×10^5 cells/well になるように播種し、pemetrexed を加え 72 時間培養した。その後、培地および pemetrexed を除去、細胞表面を洗浄し、新鮮な培地を加え薬剤耐性化した細胞を含むコロニーが得られるまで、さらに 10–14 日培養した。その後、このコロニーを回収し、pemetrexed の濃度を段階的に増加させた。この操作は約 12 カ月継続して行い、pemetrexed の濃度を 0.1 μ g/mL より開始、漸増し、終濃度は H28 細胞の 50% 致死濃度 (IC₅₀) に相当する 7.0 μ g/mL とした。

4. 細胞生存率の測定

細胞生存率は、WST-8 法を用いて決定した。各細胞を 96-well plate に 5×10^3 cells/well になるように播種し、各薬剤を以下の濃度域で培地中に加え、72 時間培養した。Pemetrexed, 1 nM–10 mM; cisplatin, 1 nM–100 μ M; cSBL, 1 nM–30 μ M;

TRAIL, 1 pg/mL–100 ng/mL; erlotinib, 10 nM–100 μ M; gefitinib, 10 nM–50 μ M; vandetanib, 10 nM–100 μ M. その後, 培地中に Cell Count Reagent SF (ナカライテスク社製) を 10 μ L ずつ加え, 37°C, 5% CO₂ 下でさらに 1–2 時間培養した. Infinite™ 200 PRO および i-control™ software (Tecan Japan 社製) を用い, 450 nM および 600 nM の吸光度を測定した. IC₅₀ は GraphPad Prism 5.0 software を用いて算出した.

5. 薬剤の併用効果の検討

薬剤併用時の生存率への影響は, WST-8 法を用いて検討した. 細胞は H28 細胞を用い, 96-well plate に 5×10^3 cells/well になるように播種し, 72 時間培養後に吸光度を測定した. 薬剤は pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL および erlotinib より任意の 2 種あるいは 3 種を同時に処理した. 濃度は 2 剤処理時は IC₅₀ を基に処理濃度比を固定したものを, また, 3 剤処理時は IC₅₀ より算出した IC₂₀ (GraphPad QuickCalcs: EC_{anything} from EC₅₀ を用いて算出) を基に処理濃度比を固定したものをを用いた. 各併用時の処理濃度比は以下の通りである: pemetrexed + cisplatin (1 : 1), pemetrexed + erlotinib (1 : 1.5), cSBL + pemetrexed (1 : 20), cSBL + erlotinib (1 : 30), cSBL + TRAIL (1 : 5), pemetrexed + cisplatin + cSBL (0.03 : 4 : 0.03), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (0.03 : 4 : 1.3), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (0.03 : 4 : 5.6), pemetrexed + cSBL + TRAIL (0.03 : 0.03 : 3.1). 併用効果の指標である Combination Index (CI) と併用時の薬物用量の減少効果の指標である Dose Reduction Index (DRI) の算出を既報²⁸⁾ を参考に CompuSyn software (ComboSyn 社製) を用いて行った. CI および DRI の算出は以下の計算式により行った. $CI = (D_{x, comb})_a / (D_{x, alone})_a + (D_{x, comb})_b / (D_{x, alone})_b + \dots$, $DRI = (D_{x, alone})_a / (D_{x, comb})_a$. それぞれの計算式において, $D_{x, comb}$, $D_{x, alone}$ は, 生存率を x% 低下させる濃度を, a, b, ... は併用に用いた薬剤 (薬剤 a, 薬剤 b, ...) を表している. $CI > 1$, $= 1$, および < 1 の場合, 薬剤の併用がそれぞれ拮抗的, 相加的, および相乗的であることを示している. $DRI > 1$, $= 1$, および < 1 の場合, 薬物用量の減少効果が良好, 全くない, および不良であることを示している.

6. ウェスタンブロット法

60 mm dish に H28 および H28-PR 細胞を 2×10^5

cells/well になるように播種し, pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL および erlotinib を終濃度がそれぞれ 30 nM, 4 μ M, 30 nM, 1.3 ng/mL および 5.6 μ M となるように加えた. 48 時間後に細胞を回収し, 1 tablet/10 mL cComplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science 社製), 1 tablet/10 mL PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science 社製) を加えた抽出バッファー (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.1% デオキシコール酸 Na, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム [SDS]) を用いて, whole cell lysate を作製した. 可溶性タンパク質を回収し, BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社製) を用いて, タンパク質濃度を測定した. タンパク質は, 14% SDS-PAGE により分離を行い, Immobilon-P Transfer Membrane (Merck Millipore 社製) に転写した. 転写膜に対し, Can Get Signal (東洋紡社製) で希釈した一次, 二次抗体をそれぞれ処理した. 目的タンパク質は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare 社製) を用いて検出した.

結 果

1. cSBL, TRAIL および EGFR-TKIs は悪性中皮腫細胞に高い選択性を示す

まず始めに, 悪性中皮腫の治療薬として承認されている pemetrexed, cisplatin と cSBL, TRAIL および EGFR-TKIs (erlotinib, gefitinib, vandetanib) の細胞増殖抑制効果を, WST-8 法により測定した. Fig. 1 に示すように, いずれの薬剤もがん細胞 H28 および H2452 に対して増殖抑制効果を示すが, cSBL, TRAIL および EGFR-TKIs は MeT5A に対し今回用いた最大濃度でも 50% 前後の生存率を維持しており, 正常細胞に対する抑制効果が低いことが示された. また, cSBL および EGFR-TKIs は細胞株の違いによる増殖抑制効果にほとんど差がなく, がん細胞選択性が高いことが示されたが, 一方で pemetrexed, cisplatin および TRAIL の H2452 細胞に対する作用は, H28 細胞と比較して低いことが明らかとなった.

2. Pemetrexed 耐性株は一部の薬剤に交叉耐性を示す

次に, 現在化学療法を行う上で問題となってい

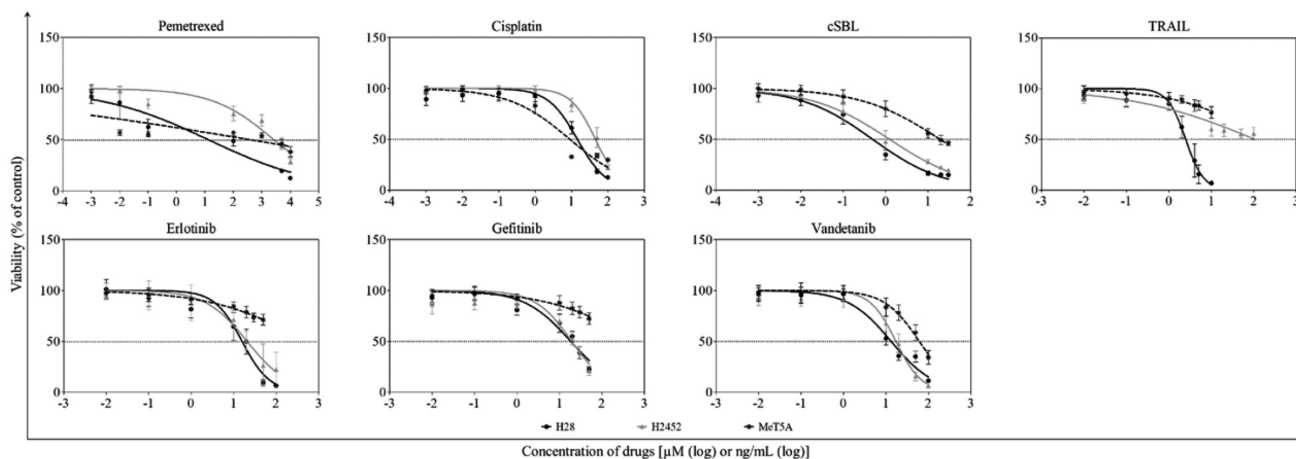


Fig. 1. Dose-response curves in the malignant mesothelioma cell lines H28 and H2452, and the mesothelial cell line MeT5A treated with pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, erlotinib, gefitinib or vandetanib. Cells were treated with pemetrexed (1 nM – 10 mM), cisplatin (1 nM – 100 μ M), cSBL (1 nM – 30 μ M), TRAIL (10 pg/mL – 100 ng/mL), erlotinib (10 nM – 100 μ M), gefitinib (10 nM – 50 μ M) or vandetanib (10 nM – 100 μ M) for 72 h. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines.

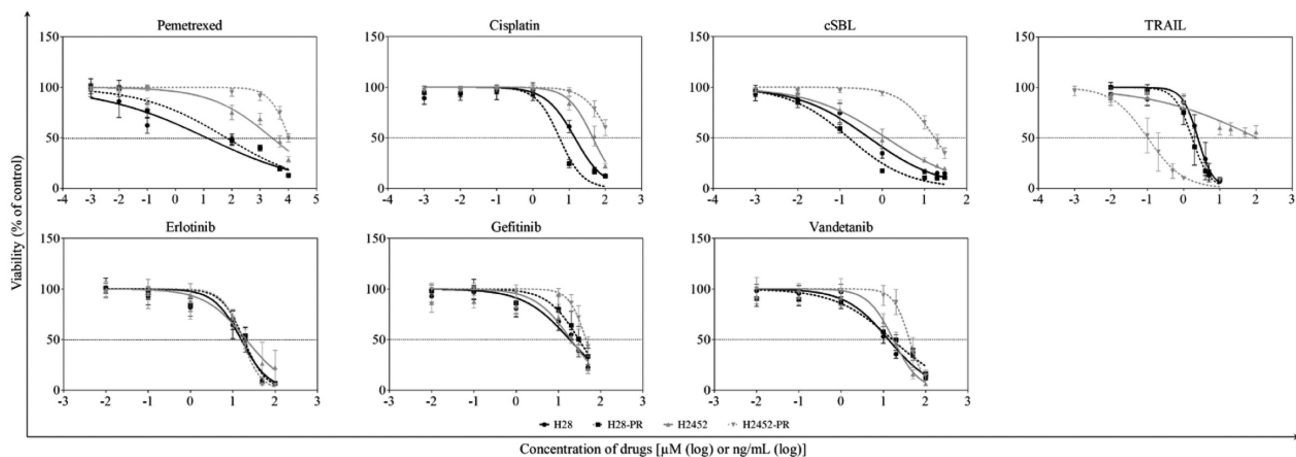


Fig. 2. Dose-response curves in the mesothelioma cell lines H28 and H2452, and their pemetrexed-resistance cell lines H28-PR and H2452-PR treated with pemetrexed, cisplatin, cSBL, TRAIL, erlotinib, gefitinib or vandetanib. Cells were treated with pemetrexed (1 nM – 10 mM), cisplatin (1 nM – 100 μ M), cSBL (1 nM – 30 μ M), TRAIL (1 pg/mL – 100 ng/mL), erlotinib (10 nM – 100 μ M), gefitinib (10 nM – 50 μ M) or vandetanib (10 nM – 100 μ M) for 72 h. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

る pemetrexed 耐性株に対する各薬剤の効果を、H28-PR および H2452-PR を用いて比較した。その結果を Fig. 2 に示す。どちらの耐性株も親株と比較すると、pemetrexed に対して耐性を示し、その耐性度 (Resistance Rate: RR) は、それぞれ H28-PR が 4.99, H2452-PR が 3.97 となった (Table 1)。他の薬剤に対する感受性は、細胞株ごとに異なるが、H28-PR は cisplatin および cSBL に対しては親株と比べて感受性が増加し、TRAIL, erlotinib および vandetanib への感受性は親株とほとんど変わらず、gefitinib に対してはわずかに感受性が低下することが明らかになった。一方、H2452-PR は

cisplatin, cSBL, gefitinib および vandetanib に対して交叉耐性を示すが、erlotinib および TRAIL に対しては交叉耐性を示さず、特に TRAIL に著しく高い感受性を示した。

3. cSBL + pemetrexed は耐性細胞株に対しても高い相乗性を示す

次に、他剤に対する交叉耐性がほとんど見られなかった H28-PR と親株の H28 細胞を用いて、2 剤併用時の併用効果について検討した。EGFR-TKIs は細胞株による効果の差が最も小さかった erlotinib を用いた。Pemetrexed を含む併用では、いずれの組み合わせでも H28 および H28-PR で用

Table 1. IC₅₀ values (μ M) and resistance rate (RR) of drugs in malignant mesothelioma cells.

Drugs		H28	H28-PR	H2452	H2452-PR	MeT5A	Target
Pemetrexed	IC ₅₀	13.04	65.03	2658.00	10551.00	ND	TS DHFR GRAFT
		5.85 to 29.07	40.00 to 105.7	1925 to 3670	9526 to 11685		
	RR		4.99		3.97		
Cisplatin	IC ₅₀	14.37	5.44	45.02	141.30	8.92	DNA
		12.32 to 16.76	4.45 to 6.64	41.10 to 49.33	119.4 to 167.3		
	RR		0.38		3.14		
cSBL	IC ₅₀	0.49	0.16	1.23	17.32	19.04	RNA
		0.40 to 0.60	0.13 to 0.19	1.01 to 1.49	16.12 to 18.61		
	RR		0.33		14.10		
TRAIL	IC ₅₀	2.48	1.73	108.30	0.10	202.10	TRAIL-R
		2.26 to 2.72	1.57 to 1.90	67.52 to 173.6	0.08 to 0.13		
	RR		0.70		0.0010		
Erlotinib	IC ₅₀	15.88	18.28	20.82	16.60	ND	EGFR
		13.51 to 18.68	16.39 to 20.40	16.13 to 26.87	15.68 to 17.58		
	RR		1.15		0.80		
Gefitinib	IC ₅₀	18.38	30.34	19.70	44.85	ND	EGFR
		15.71 to 21.51	25.85 to 35.60	16.67 to 23.29	41.24 to 48.77		
	RR		1.65		2.28		
Vandetanib	IC ₅₀	13.18	16.20	17.18	41.49	60.95	EGFR VEGFR-2/3
		11.21 to 15.48	13.63 to 19.27	15.37 to 19.20	37.16 to 46.32		
	RR		1.23		2.42		

The 95% confidence intervals for each IC₅₀ value are shown in bottom row. The RR value was calculated as the IC₅₀ value of each agent in resistance cells divided by the IC₅₀ value in each parent cell line. ND: not determined

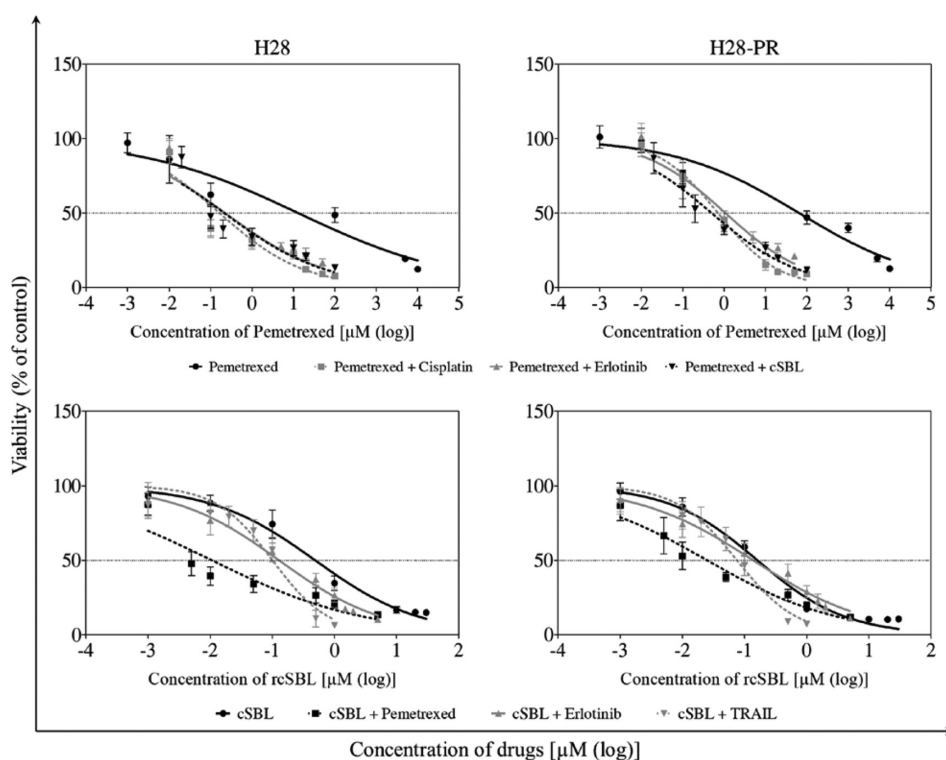


Fig. 3. Dose-response curves in H28 and H28-PR cells in dual combination therapy. Cells were treated with pemetrexed + cisplatin, pemetrexed + cSBL, pemetrexed + erlotinib, cSBL + erlotinib or cSBL + TRAIL for 72 h. X-axis of upper panels or lower panels show concentration of pemetrexed or cSBL, respectively. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

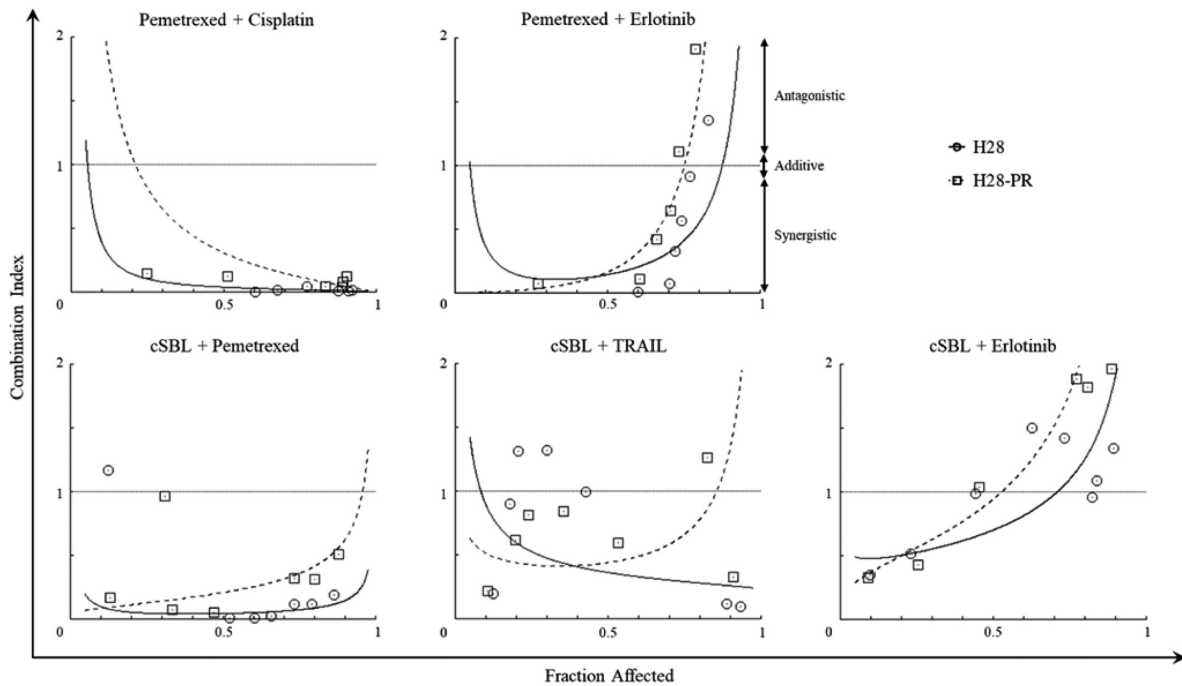


Fig. 4. CI-Fa curves for H28 and H28-PR cells in dual combination therapy. The drug concentration ratios were as follows: pemetrexed + cisplatin (1 : 1), pemetrexed + erlotinib (1 : 1.5), cSBL + pemetrexed (1 : 20), cSBL + erlotinib (1 : 30) or cSBL + TRAIL (1 : 5). Cells were treated with pemetrexed (10 nM–100 μ M), cisplatin (10 nM–100 μ M), cSBL (1 nM–10 μ M), TRAIL (5 pg/mL–50 ng/mL) or erlotinib (15 nM–150 μ M) for 72 h. CI values less than 1 indicate a synergistic effect, CI values greater than 1 indicate an antagonistic effect and CI values equal to 1 indicate an additive effect.

量-反応曲線が左へシフトし、併用により細胞増殖抑制効果が高くなることが示された (Fig. 3 上). 一方で、cSBLとの併用では、H28 および H28-PR どちらの細胞株でも erlotinib との併用による細胞増殖抑制効果の増強はほとんど見られず、TRAIL との併用でも、低濃度側では増殖抑制効果の増強は起こらないことが示された (Fig. 3 下). また、これらの薬剤の組み合わせにおける Combination Index を算出したものを Fig. 4 に示した. この結果から、pemetrexed + cisplatin (PC) および cSBL + pemetrexed (SP) が高い相乗性を示す組み合わせであることが示された. また、pemetrexed + erlotinib (PE) の増殖抑制効果は PC とほとんど変わらないが相乗性は低いこと、cSBL + erlotinib (SE) は増殖抑制効果も相乗性も低い組み合わせであり、cSBL + TRAIL (ST) の組み合わせは、濃度ごとの相乗効果にばらつきが生じることが明らかになった.

4. Pemetrexed, cSBL および cisplatin の 3 剤併用は強い細胞増殖抑制効果を示す

現在、欧米諸国を中心に、pemetrexed + cisplatin の現行レジメンに TKIs や抗体医薬品を組み込んだ新規レジメンが承認されるかあるいは治験が進行している. 今回、併用効果を検討した 5

種の薬剤から 3 剤を選び、それぞれの組み合わせにおける併用効果について検討を行った. 3 剤併用レジメンとして、pemetrexed + cisplatin + cSBL (PCS), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (PCT), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (PCE) および pemetrexed + cSBL + TRAIL (PST) の 4 パターンでの解析を行った. Pemetrexed 単独処理と比較すると、いずれの併用パターンでも用量-反応曲線が大きく左にシフトすることが示された (Fig. 5 左). また、相乗性に関して解析を行ったところ、すべての併用で高濃度側でしか相乗性が認められなかったものの、PCS が比較的高い相乗性を示した (Fig. 5 右). さらに、ウェスタンブロット法により各薬剤の抗腫瘍メカニズムへの関与が報告されているタンパク質 (p21, cyclin A, Bid および cleaved caspase 3) について検討を行った. 各タンパク質については、p21 は cisplatin あるいは erlotinib 処理により発現が増加し G1 期における停止に関わること、^{29,30)} cyclin A は pemetrexed 処理により持続的な活性化が引き起こされ S 期における細胞周期の停止に関わること、³¹⁾ Bid は TRAIL 処理により切断が増強されミトコンドリア障害を介した細胞死を増強すること、²⁴⁾ caspase 3 は cSBL 単

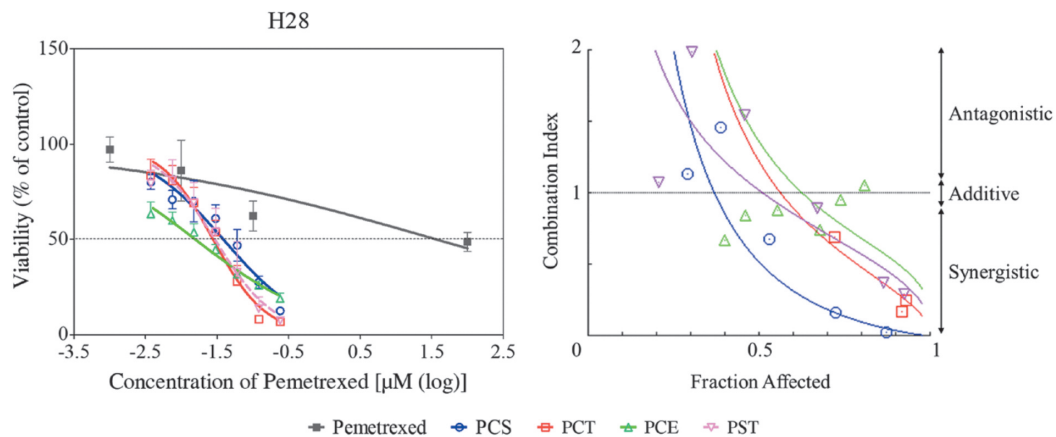


Fig. 5. Dose-response curves and CI-Fa curves for H28 cells in triple combination therapy. Cells were treated with pemetrexed + cisplatin + cSBL (0.03 : 4 : 0.03), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (0.03 : 4 : 1.3), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (0.03 : 4 : 5.6) or pemetrexed + cSBL + TRAIL (0.03 : 0.03 : 3.1). Cells were treated with pemetrexed (3.75 nM – 240 nM), cisplatin (500 nM – 32 μ M), cSBL (3.75 nM – 240 nM), TRAIL (162.5 pg/mL – 10.4 ng/mL) or erlotinib (700 nM – 44.8 μ M) for 72 h. Left panel shows viability of H28 cell lines. Right panel shows CI-Fa curves of each combination in H28 cell lines. The dots and bars represent the mean and SD, respectively. Dose-response curves are depicted as lines or dotted lines.

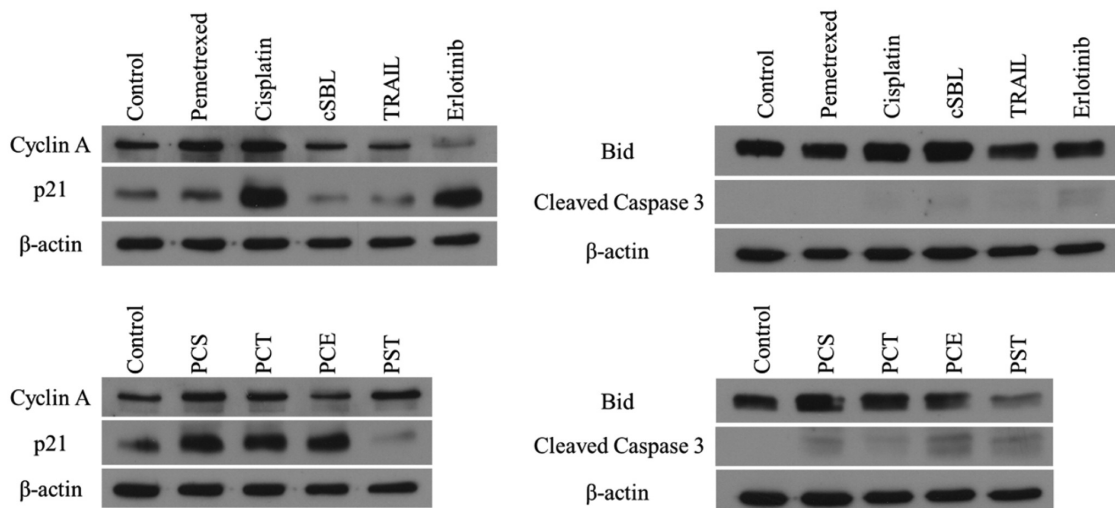


Fig. 6. Western blot analysis of proteins related to anti-tumor activities of each drug. H28 cells were treated with IC₂₀ values of each drug (pemetrexed: 0.03 μ M, cisplatin: 4 μ M, cSBL: 0.03 μ M, TRAIL: 1.3 ng/mL and erlotinib: 5.6 μ M) in single or triple treatment for 48 h.

単独処理あるいは TRAIL や pemetrexed との併用時に断片化しアポトーシスが誘導される^{24,25)}ことが、それぞれ報告されている。Fig. 6 に示したように、単独処理では、cyclin A が pemetrexed, cisplatin で増加、cSBL, TRAIL, erlotinib で減少した。p21 は pemetrexed ではほとんど変化せず、cisplatin, erlotinib で顕著に増加、cSBL, TRAIL で顕著に減少した。Bid は単独処理では顕著な変化は観察されなかった。Cleaved caspase 3 は、cSBL, TRAIL および erlotinib でわずかに発現が

認められた。併用時には、cyclin A は PCE を除いた組み合わせでの増加が確認された。p21 は cisplatin を含む併用で顕著に増加し、反対に PST では顕著に減少した。Bid は PCE でわずかに、また、PST で顕著に減少した。Cleaved caspase 3 は、単独処理時に比べいずれの処理でも顕著に増加し、特に PCE で強い活性化が認められた。

5. 3 剤併用は、pemetrexed の用量を大きく減少させる

相乗効果をもたらす併用の場合、一定レベルの

Table 2. CI and DRI values of H28 and H28-PR cells in dual or triple combination therapy.

Combination regimen		CI value	DRI value			
			Pemetrexed	Cisplatin	cSBL	TRAIL
H28	PC	0.04	94.85	31.67	-	-
	SP	0.05	88.20	-	28.48	-
	PCS	0.52	893.01	2.24	14.42	-
	PST	1.02	1185.88	-	19.14	1.03
H28-PR	PC	0.31	43.68	3.47	-	-
	SP	0.21	95.50	-	4.98	-

The CI and DRI values at Fa=0.5 were calculated as indicated in methods section. Pemetrexed + cisplatin; PC, cSBL + pemetrexed; SP, Pemetrexed + cisplatin + cSBL; PCS, Pemetrexed + cSBL + TRAIL; PST

効果を得るために必要な各薬剤の用量は、単独処理時の各薬剤の用量と比較し、著しく減少させることができる。この併用時における薬剤用量減少効果はDRIを算出することにより評価できる。今回、既存の併用レジメンであるPCと、本研究において有用性が示唆されたcSBLを含む併用レジメン(SP, PCS, PST)における各薬剤のDRIを、併用時のIC₅₀に相当するFa=0.5において算出した(Table 2)。DRIは、併用によって各薬剤のFa=0.5を与える用量が、単独処理時と比べ何倍軽減できるかという尺度を表している。H28細胞における用量減少効果は、PCでpemetrexed, 94.9; cisplatin, 31.7, SPではcSBL, 28.5; pemetrexed, 88.2と算出され、その効果はPCとSPで同程度であった。一方で、H28-PR細胞において、PCでpemetrexed, 43.7; cisplatin, 3.5, SPではcSBL, 5.0; pemetrexed; 95.5となり、PCと比較するとSPで2倍以上pemetrexedの用量減少効果が期待できることが示された。また、3剤併用時はいずれの併用においても、各薬剤で1以上のDRIが算出され、良好な減少効果を示した。特にpemetrexedの用量減少効果はPCSで893倍、PSTで1185倍となり、PCまたはSPと比較しても10倍以上の高い用量減少効果が示された。

考 察

本研究では、cSBL, TRAILおよびEGFR-TKIを含む新規悪性中皮腫治療薬候補と、悪性中皮腫に対する治療薬として現在使用されている、pemetrexedおよびcisplatinの細胞増殖抑制効果について比較し、さらに多剤併用効果についても検討を行った。中皮腫は、組織学的に上皮性、二相性お

よび肉腫性の3つのサブタイプに分類される。^{1,32)} 上皮型は非上皮型と比較すると、より予後が良いことが報告されている。^{1,33,34)} 本研究では、肉腫性中皮腫細胞株H28と上皮性中皮腫細胞株H2452およびそれぞれのpemetrexed耐性細胞株を用いた。その結果、今回用いた新規薬剤は、現行の薬剤と比較して高いがん細胞選択性を示した(Fig. 1, Table 1)。化学療法を行う上での問題となっているpemetrexed耐性に対しては、細胞種および各薬剤によって反応性に差異があり、交叉耐性を示すものもあったが、pemetrexed耐性株でより強い細胞増殖抑制効果を示す薬剤も見られたこと(H28-PR細胞に対するcSBL, H2452-PR細胞に対するTRAILなど)(Fig. 2)から、耐性の克服に向けた薬物治療選択に有用な知見が得られた。また、種々の組み合わせによる2剤併用効果を検討したところ、pemetrexed + cisplatin, cSBL + pemetrexedの2種の組み合わせが高い相乗性を示す一方で、erlotinibを含む組み合わせでは相乗性が低く、上記2種の組み合わせの有用性が確認できた(Fig. 3, 4)。さらに、3剤併用による細胞増殖抑制効果を観察したところ、今回用いた組み合わせの中ではpemetrexed + cisplatin + cSBLの組み合わせで最も高い相乗効果が得られた(Fig. 5)。各薬剤の作用機序に関わるタンパク質の挙動をウェスタンブロット法により観察したところ、既報^{25,35)}と一致してpemetrexedがcyclin Aの発現を安定化する一方で、erlotinibがその発現を減少させることや、cisplatinがp21の発現を上昇させる一方、cSBLやTRAILではその発現を減少させるなど、相反する作用が確認された。各薬剤の作用機序に着目するとpemetrexed + cSBL + TRAILの組み合わせにおける合理性が示唆された(Fig. 6)。また今回、DRI

を指標に薬剤用量減少効果を評価した結果、H28細胞に対する用量減少効果は、PCとSPは同程度であったが、腎障害などの様々な副作用を生じうる cisplatin³⁶⁾を、正常細胞に対して作用しづらい cSBL に置換することで、より有害作用の少ない治療を行える可能性があると考えられる。また、3剤併用時にはより高い pemetrexed の用量減少効果が認められた。さらに、耐性細胞に対しては、PCよりもSPで高いDRIが示され、pemetrexed耐性を獲得した細胞に対しても、cSBLを含む併用が有効な治療法となる可能性が示された。

その曝露が悪性中皮腫の要因とされるアスベスト繊維は、EGFRへの直接的な作用またはmRNAレベルでの発現上昇作用により、MAPKやAKTなどEGFRの下流シグナルを活性化することが明らかになっている。^{37,38)}悪性中皮腫の発生にEGFRの発現上昇が寄与することも示唆されており、これらのことからEGFRを標的とした治療薬の開発が検討されている。EGFR-TKIであるerlotinibがEGFRに変異を有する患者を対象に、³⁹⁾また、EGFRに対するモノクローナル抗体であるcetuximabとcisplatinまたはcarboplatinおよびpemetrexedとの3剤併用がEGFRタンパク質を過剰発現している患者を対象として臨床試験⁴⁰⁾が行われている。一方、gefitinibやimatinibとcisplatinおよびgemcitabineとの併用では、相乗的または相加的な効果が得られないことが悪性中皮腫IST-Mes2細胞を用いた*in vitro*の実験で報告されている。⁴¹⁾本研究では、上記報告と同様に、pemetrexed+erlotinibとcSBL+erlotinibの2剤併用では有用な併用効果は得られなかった。今回の結果からは、erlotinibのcyclin A発現低下作用とp21発現増加作用が、pemetrexedとcSBLのそれぞれの作用と相反しており、これらが相乗性を低下させているものと考えられる。これに対し、EGFR-TKIsは、EGFRの発現状況や変異状況によりその効果に差異があることが知られており、細胞種によっては有用な治療薬になる可能性があることから、今後、EGFRの表現型を含めたさらなる検討が必要と考えられる。

TRAILはTNFリガンドファミリーに属し、がん細胞選択的に細胞傷害作用を示すタンパク質で、がん細胞膜上に特異的に発現するDR4、DR5に結合して、デスレセプター経路によるアポトーシスを誘導する。いくつかのがんではTRAILに対する

耐性発現が報告されているものの、TRAILレセプター標的薬の効果をより強くする試みなど、TRAILを基礎とした治療法の開発が現在も精力的に行われている。⁴²⁾我々はこれまでに、TRAILとcSBLの併用が、悪性中皮腫細胞に対し、Bid切断の増強を介したアポトーシスの亢進による相乗的な細胞傷害作用を示すことを報告している。²⁴⁾また近年では、TRAILとMurine Double Minute 2 (MDM2)阻害剤⁴³⁾やプロテアソーム阻害剤⁴⁴⁾との併用によってもアポトーシスが増強されることが報告され、さらにはTRAIL+carboplatin+pemetrexedの3剤併用が、carboplatin+pemetrexedの2剤併用に比べより強い細胞傷害作用を示すことが*in vitro*および*in vivo*で明らかになっている。⁴⁵⁾本研究では、TRAILを含む3剤併用の組み合わせとしてpemetrexed+cisplatin+TRAILおよびpemetrexed+cSBL+TRAILの検討を行った。その結果、いずれにおいても強い細胞増殖抑制効果が観察されたが、pemetrexed+cSBL+TRAILの組み合わせで、cyclin AやBidに対する作用が相反しないことから、これら3剤併用が有効であると考えられる。

実効性の高い化学療法に向け課題となるのは、副作用（正常細胞に対する毒性）と薬剤耐性である。多剤併用は異なる作用機序により強い抗腫瘍効果を誘導し、また、各薬剤の使用量を減らすことで、それらの課題を克服しうる合理的な治療戦略である。今回試験したcSBL、TRAILおよびEGFR-TKIsはいずれも高いがん細胞選択性を示し、既存の薬剤よりも副作用を低減できる可能性がある。しかしながら、薬剤耐性に関しては、TKIsに対して抵抗性を示す悪性中皮腫の事例が報告されており、それらにはEGFR変異のレアリティ、シグナル伝達に関与するがん抑制遺伝子PTENの欠損やEGFR阻害を代償するMETレセプターの発現およびCOX2/PGE2を介したトランス活性化、さらには薬剤排出ポンプなどの関与が示唆されている。⁴⁶⁻⁴⁹⁾また、TRAILに関しては、TRAILレセプターの変異や発現低下、またはデコイレセプターであるDcR1およびDcR2の発現などによる耐性獲得が種々のがんで確認されている。^{50,51)}cSBLを含む抗腫瘍性リボヌクレアーゼに対するがん細胞の耐性獲得に関してはほとんど知見が得られていないが、細胞内への取り込み阻害などが関与していることが予測される。⁵²⁾以上のように、がん

細胞は各薬剤の作用機序に依存し、発現変異などを介して薬剤抵抗性を獲得し得るが、合理的な多剤併用により耐性の克服が期待できる。特に cSBL は、リボヌクレアーゼ活性により細胞内 RNA の切断をするため、多剤併用時において遺伝子発現を介した耐性変異を抑制する可能性もある。さらに、今回の研究からは、耐性細胞株によっては他の薬剤がより強い細胞増殖抑制効果を示す場合が見いだされ、現行の薬物療法の課題克服に向け有用な知見が得られたと考えられる。

現在の悪性中皮腫の新規治療薬開発研究においては、上述の EGFR-TKIs や血管新生を標的とした bevacizumab の他、FAK を標的とした defactinib や、メソテリンを標的とした amatuximab などの新規分子標的薬、さらには PD-1 を標的とした pembrolizumab などのがん免疫療法薬なども臨床試験が行われている。⁵³⁻⁵⁵⁾ 本研究では、*in vitro* における細胞増殖抑制作用に着目して検討を行い、cSBL 単独あるいは cSBL を用いた併用処理の有効性が示されたが、他剤との相互作用を *in vivo* を含めた実験系により精査することが今後の課題と考えている。これらの知見をもとに、悪性中皮腫のより効果的な治療法の開発につながることを期待される。

謝辞 本研究を行うにあたり、pemetrexed 耐性 H2452 細胞株を譲渡してくださいました、千葉大学大学院医学研究院 先端化学療法学滝口裕一教授に心より感謝申し上げます。研究資金は、文部科学省による私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (2012-2017) と科研費 17K15029 の助成を受けたものです。

利益相反

著者全てにおいて、開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL, *J. Clin. Oncol.*, **27**, 2081–2090 (2009).
- 2) Robinson BWS, Lake RA, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 1591–1603 (2005).
- 3) Ruffie P, Feld R, Minkin S, Cormier Y, Boutan-Laroze A, Ginsberg R, Ayoub J, Shepherd FA, Evans WK, Figueredo A, *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1157–1168 (1989).
- 4) Chailleux E, Dabouis G, Pioche D, Lajartre M de, Lajartre A-Y de, Rembeaux A, Germaud P, *Chest*, **93**, 159–162 (1988).
- 5) Adams VI, Unni KK, Muhm JR, Jett JR, Ilstrup DM, Bernatz PE, *Cancer*, **58**, 1540–1551 (1986).
- 6) Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P, *J. Clin. Oncol.*, **21**, 2636–2644 (2003).
- 7) Goudar RK, *Curr. Oncol. Rep.*, **7**, 260–265 (2005).
- 8) Leon LG, Gemelli M, Sciarrillo R, Avan A, Funel N, Giovannetti E, *Curr. Drug Targets*, **15**, 1331–1340 (2014).
- 9) Hazarika M, White RM, Booth BP, Wang Y-C, Ham DYL, Liang CY, Rahman A, Gobburu JVS, Li N, Sridhara R, Morse DE, Lostritto R, Garvey P, Johnson JR, Pazdur R, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 982–992 (2005).
- 10) Kitazono-Saitoh M, Takiguchi Y, Kitazono S, Ashinuma H, Kitamura A, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, Tagawa M, Tatsumi K, *Oncol. Rep.*, **28**, 33–40 (2012).
- 11) Ozasa H, Oguri T, Uemura T, Miyazaki M, Maeno K, Sato S, Ueda R, *Cancer Sci.*, **101**, 161–166 (2010).
- 12) Obata T, Tanaka M, Suzuki Y, Sasaki T, *J. Cancer Ther.*, **4**, 1052–1059 (2013).
- 13) Uemura T, Oguri T, Ozasa H, Takakuwa O, Miyazaki M, Maeno K, Sato S, Ueda R, *Cancer Sci.*, **101**, 2404–2410 (2010).
- 14) Hooijberg JH, De Vries NA, Kaspers GJL, Pieters R, Jansen G, Peters GJ, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **58**, 1–12 (2006).
- 15) Tompa P, Emori Y, Sorimachi H, Suzuki K, Friedrich P, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1333–1339 (2001).
- 16) Monica V, Lo Iacono M, Bracco E, Busso S, Di Blasio L, Primo L, Peracino B, Papotti M, Scagliotti G, *Oncotarget*, **7**, 76577–76589 (2016).
- 17) Giovannetti E, Zucali PA, Assaraf YG, Leon LG, Smid K, Alecci C, Giancola F, Destro A, Gianoncelli L, Lorenzi E, Roncalli M, Santoro A, Peters GJ, *Br. J. Cancer*, **105**, 1542–1553 (2011).
- 18) Bonelli MA, Fumarola C, La Monica S, Alfieri R, *Biochem. Pharmacol.*, **123**, 8–18 (2017).

- 19) Zalcman G., Mazieres J., Margery J., Greillier L., Audigier-Valette C., Moro-Sibilot D., Molinier O., Corre R., Monnet I., Gounant V., Rivière F., Janicot H., Gervais R., Locher C., Milleron B., Tran Q., Lebitasy M-P., Morin F., Creveuil C., Parienti J-J., Scherpereel A., *Lancet*, **387**, 1405–1414 (2016).
- 20) Scherpereel A., Mazieres J., Greillier L., Dô P., Bylicki O., Monnet I., Corre R., Audigier-Valette C., Locatelli-Sanchez M., Molinier O., Thiberville L., Urban T., Ligeza-poisson C., Planchard D., Amour E., Morin F., Moro-Sibilot D., Zalcman G., *J. Clin. Oncol.*, **35**, LBA8507-LBA8507 (2017).
- 21) Nitta K., Takayanagi G., Kawauchi H., Hakomori S., *Cancer Res.*, **47**, 4877–4883 (1987).
- 22) Nitta K., Ozaki K., Ishikawa M., Furusawa S., Hosono M., Kawauchi H., Sasaki K., Takayanagi Y., Tsuiki S., Hakomori S., *Cancer Res.*, **54**, 920–927 (1994).
- 23) Nitta K., Oyama F., Oyama R., Sekiguchi K., Kawauchi H., Takayanagi Y., Hakomori S., Titani K., *Glycobiology*, **3**, 37–45 (1993).
- 24) Tatsuta T., Hosono M., Takahashi K., Omoto T., Kariya Y., Sugawara S., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.*, **44**, 377–384 (2014).
- 25) Satoh T., Tatsuta T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *Oncotarget*, **8**, 42466–42477 (2017).
- 26) Hu CC., Lee YH., Tang CH., Cheng JT., Wang JJ., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 1229–1236 (2001).
- 27) Kariya Y., Tatsuta T., Sugawara S., Kariya Y., Nitta K., Hosono M., *Int. J. Oncol.*, **49**, 1334–1342 (2016).
- 28) Chou T-C., *Cancer Res.*, **70**, 440–446 (2010).
- 29) Qu K., Lin T., Wei J., Meng F., Wang Z., Huang Z., Wan Y., Song S., Liu S., Chang H., Dong Y., Liu C., *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, **33**, 1253–1259 (2013).
- 30) Sutter AP., Höpfner M., Huether A., Maaser K., Scherübl H., *Int. J. cancer*, **118**, 1814–1822 (2006).
- 31) Chen K-C., Yang T-Y., Wu C-C., Cheng C-C., Hsu S-L., Hung H-W., Chen J-W., Chang G-C., *PLoS One*, **9**, e97888 (2014).
- 32) Indovina P., Marcelli E., Di Marzo D., Casini N., Forte IM., Giorgi F., Alfano L., Pentimalli F., Giordano A., *Cancer Biol. Ther.*, **15**, 380–388 (2014).
- 33) Kataoka Y., Yamamoto Y., Otsuki T., Shinomiya M., Terada T., Fukuma S., Yamazaki S., Hirabayashi M., Nakano T., Fukuhara S., *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **45**, 562–568 (2015).
- 34) Ortolan E., Giacomino A., Martinetto F., Morone S., Lo Buono N., Ferrero E., Scagliotti G., Novello S., Orecchia S., Ruffini E., Rapa I., Righi L., Volante M., Funaro A., *Oncotarget*, **5**, 6191–6205 (2014).
- 35) Yang T-Y., Chang G-C., Chen K-C., Hung H-W., Hsu K-H., Sheu G-T., Hsu S-L., *Eur. J. Pharmacol.*, **663**, 17–26 (2011).
- 36) Dasari S., Bernard Tchounwou P., *Eur. J. Pharmacol.*, **740**, 364–378 (2014).
- 37) Zanella CL., Posada J., Tritton TR., Mossman BT., *Cancer Res.*, **56**, 5334–5338 (1996).
- 38) Pache JC., Janssen YM., Walsh ES., Quinlan TR., Zanella CL., Low RB., Taatjes DJ., Mossman BT., *Am. J. Pathol.*, **152**, 333–340 (1998).
- 39) National Library of Medicine. “Erlotinib Hydrochloride in Treating Patients With Malignant Peritoneal Mesothelioma”: [〈https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01592383〉](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01592383) (アクセス 2017年11月20日)
- 40) National Library of Medicine. “Study of Cetuximab Combined With Cisplatin or Carboplatin/Pemetrexed as First Line Treatment in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. (MesoMab)”: [〈https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00996567〉](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00996567) (アクセス 2017年11月20日)
- 41) Barbieri F., Würth R., Favoni RE., Pattarozzi A., Gatti M., Ratto A., Ferrari A., Bajetto A., Florio T., *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1467–1477 (2011).
- 42) de Miguel D., Lemke J., Anel A., Walczak H., Martinez-Lostao L., *Cell Death Differ.*, **23**, 733–747 (2016).
- 43) Urso L., Cavallari I., Silic-Benussi M., Biasini L., Zago G., Calabrese F., Conte PF., Ciminale V., Pasello G., *Oncotarget*, **8**, 44232–44241 (2017).
- 44) Yuan B-Z., Chapman J., Ding M., Wang J., Jiang B., Rojanasakul Y., Reynolds SH., *BMC Cancer*, **13**, 140 (2013).
- 45) Pasello G., Urso L., Silic-Benussi M., Schiavon M., Cavallari I., Marulli G., Nannini N., Rea F., Ciminale V., Favaretto A., *J. Thorac. Oncol.*, **9**, 1008–1017 (2014).
- 46) Cortese JF., Gowda AL., Wali A., Eliason JF., Pass HI., Everson RB., *Int. J. cancer*, **118**, 521–522 (2006).

- 47) Lippman SM., Gibson N., Subbaramaiah K., Dannenberg AJ., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 6097–6099 (2005).
- 48) Bronte G., Incorvaia L., Rizzo S., Passiglia F., Galvano A., Rizzo F., Rolfo C., Fanale D., Listi A., Natoli C., Bazan V., Russo A., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **107**, 20–32 (2016).
- 49) Noguchi K., *Yakugaku Zasshi*, **137**, 151–160 (2017).
- 50) Jin Z., El-Deiry WS., *Cancer Biol. Ther.*, **4**, 139–163 (2005).
- 51) Trivedi R., Mishra DP., *Front. Oncol.*, **5**, 69 (2015).
- 52) Nitta K., Ozaki K., Tsukamoto Y., Furusawa S., Ohkubo Y., Takimoto H., Murata R., Hosono M., Hikichi N., Sasaki K., *Cancer Res.*, **54**, 928–934 (1994).
- 53) National Library of Medicine. “Window of Opportunity Study of VS-6063 (Defactinib) in Participants With Surgical Resectable Malignant Pleural Mesothelioma.” : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02004028> (アクセス 2017 年 11 月 20 日)
- 54) National Library of Medicine. “Study of the Safety and Efficacy of Amatuximab in Combination With Pemetrexed and Cisplatin in Subjects With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (MPM)(ARTEMIS)” : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02357147> (アクセス 2017 年 11 月 20 日)
- 55) Frenel J-S., Le Tourneau C., O’Neil B., Ott PA., Piha-Paul SA., Gomez-Roca C., van Brummelen EMJ., Rugo HS., Thomas S., Saraf S., Rangwala R., Varga A., *J. Clin. Oncol.*, JCO.2017.74.547 (2017).