

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590637

研究課題名(和文) ヒト末梢血単核細胞を用いた核酸誘導体の効果予測に関する研究

研究課題名(英文) Assessment of anti-cancer effects for nucleoside analogues by using drug response for human mononuclear lymphocytes in vitro.

研究代表者

本間 真人 (Homma, Masato)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90199589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸誘導体のゲムシタピン(GEM)はトランスポーター(SLC29A1)の発現が高い腫瘍細胞に有効である。SLC29A1の活性評価には手術での摘出標本を用いるが、手術非適応の症例には適用できない。摘出標本の代替として末梢血単核細胞(PBMC)の可能性を検討した。

SLC29A1の遺伝子多型(rs6932345)はPBMC上のmRNA発現に影響し、野生型が変異型キャリアーより1.7倍高く、PBMCのマイトゲン増殖に対するGEMの抑制効果も強かった。また、GEMのPBMC抑制効果はSLC29A1阻害剤の添加によって減弱した。SLC29A1を介したGEMの効果はPBMCで評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that nucleoside analogue such as gemcitabine (GEM) showed potent anti-tumor effects in patients with the tumor tissue expressing high levels of SLC29A1, a nucleoside transporter. We examined whether or not peripheral mononuclear leucocytes (PBMC) can be used as an alternative tissue to assess the expression levels of SLC29A1.

Single nucleotide polymorphisms for SLC29A1 (rs6932345) affected the mRNA expression on PBMC, where the wild-type showed 1.7 times higher levels compared with mutation carries. Inhibitory effects of GEM on PBMC proliferation was also enhanced in the wild type. Pre-treatment of PBMC with SLC29A1 inhibitors reduced inhibitory effects of GEM on PBMC proliferation. These results suggested that PBMC could be used to assess anti-tumor effects of GEM via SLC29A1.

研究分野：臨床薬理学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ゲムシタピン SLC29A1 末梢血単核細胞 遺伝子多型 mRNA発現

1. 研究開始当初の背景

ゲムシタピン (gemcitabine: GEM) などの核酸誘導体薬は細胞表面に発現する核酸トランスポーター (Solute Carrier Family 29 Member 1: SLC29A1) を介して腫瘍細胞内に取り込まれ、抗腫瘍効果を発揮する。膵がんに対する GEM を用いた術後化学療法では、SLC29A1 の発現 (あるいは mRNA 発現) が高い腫瘍に対して高い有効性 (生存期間の有意な延長) が報告されており、その活性評価が GEM の効果予測に有用であると指摘されている。しかしながら腫瘍組織を用いた SLC29A1 の発現測定は、手術による摘出標本が得られる場合に可能であり、手術非適応の症例に応用することはできない。

2. 研究の目的

SLC29A1 の発現が知られている末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を摘出標本の代替として SLC29A1 の活性評価に用いることができれば、手術非適応患者においても GEM の効果を予測できると考えられる。本研究では PBMC を用いた SLC29A1 活性の評価について以下の3点を検討し、摘出標本の代替としての可能性を検討する。

- (1) SLC29A1 活性に影響することが知られている遺伝子多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) が PBMC 上の mRNA 発現に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) マイトゲン刺激による PBMC の増殖に対する GEM の抑制効果における SLC29A1 の関与を明らかにする。
- (3) 膵がん患者において PBMC のマイトゲン増殖に対する GEM の抑制効果と、摘出標本における SLC29A1 のタンパク発現や mRNA 発現との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 対象被験者:

健常被験者 46 名 (男性: 28 名、女性: 18 名、年齢: 29.0 ± 3.7 歳)、膵がん患者 11 名 (男性: 8 名、女性 3 名、年齢: 66.6 ± 10.1 歳) を対象とし採血を行った。患者は GEM による治療計画および治療中の外来患者であり、そのうち 10 名は術後の化学療法対象者であった。

(2) GEM の PBMC 増殖抑制活性の評価:

末梢血より PBMC を分離し、RPMI1640 培地で細胞懸濁液 (1 × 10⁶ cell/mL) を調製した。PBMC 懸濁液にマイトゲン (Concanavalin A; 終濃度 5.0 μg/mL) と GEM (終濃度 0.001 ~ 100 μM) を添加し、37 °C、5%CO₂ 下で 96 時間培養した。培養後、生細胞数を cell counting kit で解析し、細胞増殖を 50% 抑制する GEM 濃度を IC₅₀ 値として求めた。SLC29A1 阻害剤 (S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine: NBMPR と dipyridamole; いずれも終濃度 5 μM) の検討では、マイトゲンと GEM を添加する前に PBMC をそれぞれの阻害剤で処理 (30 分間ブ

レインキュベーション) した後に同様の実験を行った。

(3) 遺伝子多型解析および mRNA 定量:

末梢血よりゲノム DNA を分離し、SLC29A1 の遺伝子多型 (rs6932345A>C と rs747199 G>C) を PCR-RFLP (PCR restriction fragment length polymorphism) 法によって解析した。rs6932345 はイントロン上 (エキソン 11 と 12 の間) の、rs747199 はプロモーター領域の SNP であり、mRNA 発現との関連が報告されている。rs6932345 の解析には、5'-CGG AGC CTC ACA GCT GTA TT-3' (forward) と 5'-GCA GTG GCA CAA ACA CCA-3' (reverse) を、rs747199 では 5'-TGA CTG AGG TCA AAC CAG AGG-3' (forward) と 5'-GAG TGT GGG AAT GTG TCA GT-3' (reverse) をプライマーとして用いた。

PBMC から total RNA を抽出し、SLC29A1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。プライマーには 5'-AGA CCA AGT TGG ACC TCA TTA GC-3' (forward) と 5'-CAC GGC TGG AAA CAT CCC AAT-3' (reverse) を用い、mRNA 発現量はユビキチンまたは GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) に対する相対発現として定量した。

(4) 倫理的手順:

本研究は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) SLC29A1 の遺伝子多型 (rs6932345A>C と rs747199 G>C) が PBMC 上の mRNA 発現に及ぼす影響:

rs6932345 が野生型 (A/A) (n=34) の mRNA 発現は変異型 (C) キャリアー (n=12) の 1.7 倍であった (1.20 ± 0.70 vs. 0.70 ± 0.30, p<0.05)。rs747199 は rs6932345 とリンクしており、同様な傾向は rs747199 でも見られた (野生型 vs. 変異型キャリアー: 1.21 ± 0.70 vs. 0.70 ± 0.34, p<0.02)。両者が野生型 (n=31) といずれかが変異型キャリアー (n=15) との比較では、さらに発現量の差が明確になり (1.26 ± 0.70 vs. 0.68 ± 0.32, p<0.01) PBMC 上の mRNA 発現は SLC29A1 の遺伝子多型の影響を受けて変動することが明らかとなった。

表 1 SLC29A1 の遺伝子多型 (rs747199G>C) が GEM の IC₅₀ 値に及ぼす影響

	GEM の IC ₅₀ 値 (μM)	
	中央値 (範囲)	
rs747199	G/G	C キャリアー
対照*	0.04(0.01-0.10)	0.06(0.01-10.0)
+NBMPR	0.40(0.07-2.50)	0.68(0.32-3.70)
+DP†	3.70(0.18-8.10)	5.60(0.80-18.0)

DP: dipyridamole, *: p<0.05 (G/G vs. C キャリアー)

(2) SLC29A1 を介した PBMC のミトゲン増殖に対する GEM の抑制効果：

ミトゲン刺激による PBMC の増殖に対する GEM の抑制効果が SLC29A1 活性を反映するか否かを検討するために、SLC29A1 遺伝子多型と SLC29A1 阻害剤の影響について検討した。GEM の PBMC 増殖抑制効果を示す IC₅₀ 値は、rs747199 の野生型の方が変異型キャリアーに比べて低く (0.04 : 0.01-0.10 vs. 0.06:0.01-10.0 μM, p<0.05) 強い抑制効果が見られた (表 1)。また GEM の IC₅₀ 値は、SLC29A1 阻害剤の NBMPR と dipyridamole の添加により、野生型ではそれぞれ対照の 10 倍および 100 倍に、変異型キャリアーではそれぞれ対照の 11 倍、48 倍に増加した (表 1)。これらのことから、GEM の PBMC 増殖抑制効果は SLC29A1 を介しており、その活性を反映していると考えられた。

表 2 健常者 PBMC と膵がん患者 PBMC に対する GEM の IC₅₀ 値の比較

	GEM の IC ₅₀ 値 (μM) 中央値 (範囲)	
	健常者	膵がん患者
mRNA 発現*	1.09 ± 0.67 [§]	1.72 ± 1.11 [§]
対照*	0.04 (0.01-10.0)	0.48 (0.02-100)
+NBMPR**	0.41 (0.07-3.70)	1.04 (0.26-72.0)
+DP**	3.70 (0.18-18.0)	8.90 (2.40-80.0)

DP: dipyridamole, *: p<0.05, **: p<0.01 (健常者 vs. 膵がん患者), §: 平均 ± SD

(3) 膵がん患者における PBMC のミトゲン増殖に対する GEM の抑制効果と摘出標本における SLC29A1 発現との関連：

膵がん患者の PBMC 増殖に対する GEM の抑制効果を、摘出標本における SLC29A1 発現との関連を調べるにあたって、予備的に健常被験者の PBMC と比較した。SLC29A1 の遺伝子多型を揃えて (健常者と患者の変異型キャリアーの割合はそれぞれ 27% と 31%) PBMC 上の mRNA 発現を比較したところ、患者での発現量が有意に高かった (1.09 ± 0.67 vs. 1.72 ± 1.11, p<0.05) (表 2)。このことから GEM の PBMC 抑制効果は患者の方が強く見られると予測されたが、GEM の IC₅₀ 値は、健常者と比較して患者で有意に高かった (0.04 : 0.01-0.10 vs. 0.48:0.02-100.0 μM, p<0.05) (表 2)。この傾向は、SLC29A1 阻害剤を添加した場合も同様であった。患者 PBMC における NBMPR と dipyridamole の添加による IC₅₀ 値の上昇はそれぞれ対照の 2 倍および 20 倍であり (表 2)、健常者 PBMC の場合より SLC29A1 阻害剤が及ぼす影響は小さかった。

これらのことは、患者 PBMC における GEM の増殖抑制効果は健常者 PBMC と比較して SLC29A1 活性の及ぼす影響が低下している可能性を示している。その理由として、患者は既に GEM 治療を受けているため、末梢血中には、ある程度 GEM に耐性のある (SLC29A1 活性の低い) PBMC が相対的に多く循環している

ことが考えられる (GEM 投与直後は、GEM 感受性の高い PBMC はアポトーシスを起し、末梢血中の数は相対的に少なくなっている)。

本研究では SLC29A1 の活性評価の手段として、PBMC を用いる方法を検討したが、同一患者において手術摘出標本を用いる方法と直接比較するまでには至らなかった。しかしながら上記の検討結果から、PBMC を用いて評価できる可能性があること、両者の活性 (mRNA 発現も含む) を比較する場合、少なくとも PBMC では GEM 投与開始前のものを用い、GEM 投与直後のものは避けることが望ましいと考えられた。また、組織上の mRNA 発現は、SLC29A1 の遺伝子多型の影響を受けていることも明らかとなり、SNP 解析も GEM の効果予測に有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Suzuki Y, Homma M, Abei M, Hyodo I, Kohda Y., Impact of solute carrier family 29 member 1 (SLC29A1) single nucleotide polymorphisms on mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells. *Biol Pharm Bull.* 査読有、2013、36(1)、144-146.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b12-00809>
- 2) Suzuki Y, Homma M, Abei M, Hyodo I, Kohda Y., Effects of dipyridamole coadministration on the pharmacokinetics of ribavirin in healthy volunteers. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有、2013、28(5)、406-410.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-137>

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 鈴木嘉治、本間真人、小田竜也、大河内信弘、幸田幸直：SLC29A1 遺伝子多型が末梢血単核細胞上の SLC29A1 mRNA 発現に及ぼす影響。第 39 回日本臓器保存生物医学学会学術集会。2012、11 月 16 日
- 2) 本間真人、大木桜子、鈴木嘉治、小田竜也、大河内信弘、幸田幸直：SLC29A1 の遺伝子多型がゲムシタピンの末梢血リンパ球幼弱抑制効果に及ぼす影響。第 38 回日本臓器保存生物医学学会学術集会。2011、11 月 25 日
- 3) 鈴木嘉治、本間真人、安部井誠人、兵頭一之介、幸田幸直：SLC29A1 活性がリバビリンの体内動態に及ぼす影響。第 28 回日本 TDM 学会学術集会。2011、6 月 18 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-medicine/pharmsci/>

6．研究組織

(1)研究代表者

本間 真人（HOMMA, Masato）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90199589

(2)連携研究者

小田 竜也（ODA, Tatsuya）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：