

悪性中皮腫細胞におけるペメトレキセド耐性機序の解明

092A05 川崎 泰裕

化学療法学講座

【目的】

悪性中皮腫は、アスベストと関連した腫瘍として知られている。アスベストの長期にわたる暴露が主な要因であり、その治療法は確立されていないため予後が非常に悪い。抗悪性中皮腫治療薬として近年承認されたペメトレキセドは、葉酸代謝経路に作用する薬剤である。葉酸と同様に溶質キャリアータンパクファミリーであるSLC19AやSLC46A1といった葉酸トランスポーターにより細胞内に取り込まれ、チミジル酸合成酵素 (TYMS) やジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR)、さらにはグリシンアミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ (GARFT) といった多数の因子を阻害し、結果的にチミジル酸の合成を阻害することでDNA合成を阻害し抗腫瘍効果を示す。しかし、ペメトレキセド以外で悪性中皮腫に有効性を示す薬剤は極めて少なく、悪性中皮腫がペメトレキセドに対して耐性を獲得した時には、もはや効果的な治療薬がないのが現状である。このため、ペメトレキセドに対して耐性を獲得した悪性中皮腫に対して有用な新たな化学療法剤の開発が緊急の課題である。本研究では、ペメトレキセドによる耐性細胞を樹立し、その耐性機序を解明し、この耐性細胞に有効な薬剤の検討を行った。

【方法】

悪性中皮腫細胞株であるMSTO-211Hに対してペメトレキセドを継続的に暴露することによってペメトレキセド耐性細胞を樹立し、*in vitro*においてペメトレキセドの感受性を比較した。耐性を獲得した細胞株 (H/Pemetrexed) と親株からmRNAを抽出後、cDNAを作成し、ペメトレキセドの作用機序に関連する主要な遺伝子であるTYMS、DHFR、GARFT、ホリルポリグルタミン酸合成酵素 (FPGS)、ガンマグルタミル加水分解酵素 (GGH)、SLC19A、SLC46A1の7種類のmRNA発現量をReal Time PCR法で比較検討した。

また、ペメトレキセドの濃度や時間を変えて処理したMSTO-211HのcDNAを作成し、TYMSのmRNAの変化量も解析した。同様の方法で耐性を獲得しにくい他の悪性

中皮腫細胞株 (ACC-meso-1、ACC-meso-4、NCI-H2452) や口腔扁平上皮細胞であるKBに関してTYMSの変化量を比較した。

H/Pemetrexedに対して有用な薬剤を検討するためにMT assay法を用いて既存の抗がん剤であるメトトレキサート (MTX) やフルオロウラシル (5-FU)、新規抗がん剤であるエチニルシチジン (ECyd) の感受性について検討した。

【結果】

耐性度が約160倍のペメトレキセド耐性細胞 (H/Pemetrexed) を樹立した。この細胞では、TYMSのmRNAの発現量が他のペメトレキセド標的因子に比べ約30倍増加していた。ペメトレキセドで処理したMSTO-211Hでは処理していないMSTO-211Hと比べTYMSのmRNA発現量は、時間、濃度依存的に増加していた。また、ペメトレキセドで処理せずに48時間培養したMSTO-211Hとペメトレキセドで48時間処理したMSTO-211H、ACC-meso-1、ACC-meso-4、NCI-H2452、KBを比較したところ、ペメトレキセドで処理していないMSTO-211Hと比べ、TYMSのmRNA発現量がKBで1.7倍、NCI-H2452で2.5倍、ACC-meso-1、ACC-meso-4で3.5倍、MSTO-211Hで7倍程度増加していた。

TYMSの発現制御に関連する転写因子の1つであるE2F1およびE2F4のmRNA量を検討したところ、E2F1のmRNAの発現量の変化はほとんど認められず、E2F4は2倍程度の増加が認められた。

H/Pemetrexedは、ペメトレキセドと同じ葉酸代謝拮抗剤として分類されるMTXに対しても5.4倍の耐性度があり、交差耐性を示した。一方、5-FUとECydは耐性細胞に対してそれぞれ1.81倍、0.73倍の耐性度であり交叉耐性を示さなかった。また、5-FUよりもECydの方が約200倍高い感受性を示した。

【考察】

ペメトレキセドの標的因子は多数存在するが、MSTO-

211Hにおいては、TYMSがその効果発現のために最も重要な因子であり、TYMS高発現細胞がペメトレキセドにより選択された結果、耐性を獲得したものと示唆された。TYMSと相互作用をするE2FファミリーのmRNA量や5'-UTRに存在するTYMSのSNPもMSTO-211HとH/Pemetrexedでは変化はなく、TYMS高発現のメカニズムについては不明であり今後の課題である。

ペメトレキセドが無効な耐性悪性中皮腫の治療において、交差耐性を持たず、感受性の高いECydが第二世代の抗悪性中皮腫治療薬として有用な薬剤であることが示唆された。