

| | |
|---------|---|
| 氏名・(本籍) | 伊藤 史子 (秋田県) |
| 専攻分野の名称 | 博士(医学) |
| 学位記番号 | 医博甲第 1040 号 |
| 学位授与の日付 | 令和 3 年 3 月 22 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学系研究科医学専攻 |
| 学位論文題名 | The BCRP inhibitor febuxostat enhances the effect of nilotinib by regulation of intracellular concentration (BCRP 阻害薬であるフェブキシスタットは細胞内濃度制御によりニロチニブの薬理効果を増強させる) |
| 論文審査委員 | (主査) 柴田 浩行 教授 (副査) 大森 泰文 教授 羽瀧 友則 教授 |

学位論文内容要旨

論文題目
(論文題目の和訳)

The BCRP inhibitor febuxostat enhances the effect of nilotinib by regulation of intracellular concentration

(BCRP 阻害薬であるフェブキシソスタットは細胞内濃度制御によりニロチニブの薬理効果を増強させる)

申請者氏名 伊藤 史子

研究目的

第2世代チロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor; TKI) であるニロチニブは慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia; CML) の治療薬である。TKI は CML の予後を劇的に改善したが、耐性獲得により再発や病勢進行をきたす症例も存在し、耐性機序の解明が課題として残されている。薬剤排泄型トランスポーターである breast cancer resistance protein (BCRP) は基質蛋白を細胞外へ排出する機能により薬物動態に関与するが、ニロチニブも BCRP の基質として報告され、さらに CML 幹細胞において BCRP 発現が亢進しているとの報告もなされている。我々は過去に、ニロチニブ内服 CML 患者において、BCRP 発現量が低下する一塩基多型 ABCG2 421C>A が深い分子遺伝学的寛解達成の独立した予想因子であることを報告している。最近、尿酸降下薬フェブキシソスタットが BCRP 活性を阻害することが報告された。上記を踏まえ、CML の日常診療で併用することも多いフェブキシソスタットの相互作用による BCRP を介したニロチニブの細胞内濃度への影響について検討した。

研究方法

CML 細胞株 K562 に対しイマチニブを少量から漸増しながら長期間曝露し、イマチニブ耐性 K562 株 (K562/IM-R) を樹立した。Parental K562 および K562/IM-R における BCRP 発現をフローサイトメトリーにて定量した。ニロチニブ存在下での生存率やアポトーシスについて、XTT アッセイや PI/Annexin V を用いて定量し、さらにフェブキシソスタットの前投薬により変化がみられるかについて検討した。また、ニロチニブの細胞内濃度を高速液体クロマトグラフィーで定量し、細胞株同士やフェブキシソスタット前投薬の有無により増減がみられるかについても検討した。

研究成績

イマチニブ 200nM またはニロチニブ 3.9nM 存在下で培養し細胞数計測を行ったところ、parental K562 は細胞数が頭打ちであったのに対し K562/IM-R は細胞増殖が抑制されなかった。また、ニロチニブ 1nM-1000nM を曝露しにニロチニブを曝露し XTT アッセイを行ったところ、K562/IM-R では生存率の有意な上昇をみとめ、IC50 は K562/IM-R 50nM vs. parental 3.9nM であり、ニロチニブ耐性を有していることが確認された。細胞表面の BCRP 発現も parental K562 では陽性率が 3.12% であったのに対し K562/IM-R では 70.4% と発現レベルの上昇をみとめた。ニロチニブと、BCRP 阻害作用を持つフェブキシソスタットを併用しアポトーシスを評価したところ、Annexin V 陽性率はフェブキシソスタット群 38.9% vs. 対照群 26.3% (P=0.002) であった。K562/IM-R はニロチニブ 4000-10000ng/ml を投与したときの細胞内濃度が parental K562 よりも有意に低く、さらにフェブキシソスタット前投薬により K562/IM-R のニロチニブ細胞内濃度は上昇をみとめた。

結論

TKI 耐性獲得機序として、TKI 長期投与に伴い BCRP 発現が亢進した白血病幹細胞分画において、BCRP による細胞外へのニロチニブ排出が亢進することでニロチニブ細胞内濃度が低下し、薬理効果が低下することが示唆された。フェブキシソスタットの併用は BCRP 阻害を介してニロチニブの細胞外排泄に拮抗するため、耐性を獲得した CML 幹細胞におけるニロチニブの感受性を増強し、治療効果の改善が期待できるかもしれない。今後の臨床検体を用いた追試が望まれる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：柴田 浩行

申請者：伊藤 史子

論文題名：The BCRP inhibitor febuxostat enhances the effect of nilotinib by regulation of intracellular concentration

(BCRP 阻害役であるフェブキソスタットは細胞内濃度制御によりニロチニブの薬理効果を増強させる)

要旨

第二世代チロシンキナーゼ阻害薬 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) であるニロチニブは慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia, CML) の予後を劇手に改善したが、耐性獲得が問題視されるようになった。その一つの機序として薬剤排泄型トランスポーターの過剰発現がある。breast cancer resistance protein (BCRP) はニロチニブを基質として細胞外へ排泄する。臨床例においても BCRP は CML 幹細胞に高発現しているという報告がある。近年、尿酸降下薬であるフェブキソスタットが BCRP 活性を阻害することが報告された。これらの知見に基づいて CML 細胞株である K562 にイマチニブを漸増、暴露し、イマチニブ耐性 K562 (K562/IM-R) を作成した。BCRP 発現細胞の割合をフローサイトメトリーで定量したところ、親株の K562 が 3.1% の BCRP 陽性率であったのに対して、K562/IM-R では 70.4% の細胞に BCRP の発現を認めた。それぞれ、200 nM のイマチニブ、3.9 nM のニロチニブ存在下では親株の K562 は増殖できなかつたが、K562/IM-R の増殖が認められた。ニロチニブの 50% 細胞増殖抑制濃度は親株の K562 が 3.9 nM であったが、K562/IM-R は 50 nM であった。それに対して、K562/IM-R に対してフェブキソスタットで前処置を行うと、アポトーシスを示す Annexin V の陽性率は対照群の 26.3% から 38.9% に増加した (P=0.002)。また、フェブキソスタット前処置によって、K562/IM-R の細胞内ニロチニブ濃度は有意に上昇した。以上から、CML のイマチニブ耐性は BCRP の発現誘導によってもたらされ、その耐性打破にフェブキソスタットが有効であることが示された。

1) 斬新さ

薬剤耐性は古くから診療上の問題点であり、新規の薬剤が誕生しても、この

問題は常に出現する。抗悪性腫瘍薬も例外ではなく、分子標的薬への耐性化は血液腫瘍のみならず、肺癌などの固形癌でも認められる。初めて、小分子化合物によって標的分子制御が可能になった CML では 2 次耐性などの出現と耐性化 CML に有効な新たな分子標的薬の開発が進められている。

耐性化の機序の多くは標的分子への変異導入であるが、標的分子のコピー数の増加や分子標的薬の排出ポンプの発現誘導などもあげられる。本研究は、その点に着目した研究で、実際に薬剤耐性細胞を作り出して、薬剤排出ポンプの阻害剤を使用して耐性打破を実現し、実験的に実証したという点に斬新性がある。

2) 重要性

薬剤耐性の打破は薬物療法にとって極めて重要な課題である。分子標的薬の場合、変異した標的に対して新たな分子標的薬を開発する。標的分子のコピー数の増加に対しては、分子標的薬の活性増強を目指すなどが行われる。一方で、薬剤排出ポンプの活性化などの場合はポンプ作用をアゴニスティックに競合するか、アンタゴニスティックに阻害する物質が選ばれる。本研究のフェブキソスタットはいずれの機能によるものかは未だ不明であるが、ポンプ作用を抑制し、ニロチニブの細胞内濃度を高く維持することに成功、耐性細胞にアポトーシスを誘導している。この時に必要なフェブキソスタットの濃度は、それが臨床に用いられる濃度以下であり、この知見は直ちに臨床応用可能な発見である。また、特に強調されていないが、BCRP は CML 幹細胞において強く発現している。通常、癌細胞よりも癌幹細胞は薬剤抵抗性で、これが残存するか否かが薬物療法の成否の鍵を握る。フェブキソスタットによる耐性の打破は CML 幹細胞の撲滅につながる可能性があると思われる。このように、本研究は癌幹細胞治療という観点からも極めて重要な指摘が含有されている。

3) 研究方法の正確性と表現の明瞭さ

本研究は K562/IM-R を自ら樹立し、それらを用いて細胞生物学的検討や分子生物学的検討を行っている。高速液体クロマトグラフィーやフローサイトメトリーなどの高度な検出系を用いて実験は正確に行われている。

また、得られたデータは適切な統計学的処理がなされている。それらは論文に明瞭に記載されている。また、研究資金についても記載があり、経済的中立性も担保されている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判断された。