

メソトレキセート耐性絨毛癌に対する 薬剤ライブラリスクリーニングに基づく新規治療薬開発

名古屋大学医学部附属病院

産科婦人科 病院助教 吉田康将

1. 研究の背景・目的

絨毛性疾患は、妊娠に伴い発症し、栄養膜細胞（トロホブラスト）の異常増殖を特徴とする疾患群である。そのうち、悪性腫瘍として、絨毛癌が知られている。絨毛癌は、日本で年間約 50 例発症し、希少癌に分類される。絨毛癌は、血行性転移を来しやすく、肺や脳に病変を有することが多い。従って、絨毛癌に対する標準治療は、多剤併用化学療法となる。標準的に用いられるレジメントとして、MEA 療法（メソトレキセート、エトポシド、アクチノマイシン D）があり、幸い約 90%は奏功するとされる。一方で、残りの 10%の治療抵抗性の絨毛癌に対する治療が临床上の大きな課題である。

本研究の目的は、薬物ライブラリスクリーニングによるドラッグリポジショニングの戦略により、メソトレキセート耐性絨毛癌に対する新規治療薬候補を同定することである。

2. 研究の対象ならびに方法

実験には、JAR 細胞および JEG-3 細胞を使用した。始め 25 nM のメソトレキセートにて培養し、1,000–10,000 nM まで徐々に濃度を濃くしていき、メソトレキセート耐性株を樹立した。次に、約 1200 種類の化合物からなるライブラリを使用して、メソトレキセート耐性 JAR 細胞（JAR-MR 細胞）と JEG-3 細胞（JEG-3-MR 細胞）において *in vitro* でスクリーニングを行った。なお、この薬剤ライブラリは、LTT バイオファーマ社から提供を受けている。そして、*in vitro* で高い抗腫瘍効果を示した化合物に対しては、マウスモデルにおける *in vivo* の抗腫瘍効果も検討した。本研究は、名古屋大学における動物倫理委員会の承認を得て、実施した。

3. 研究結果

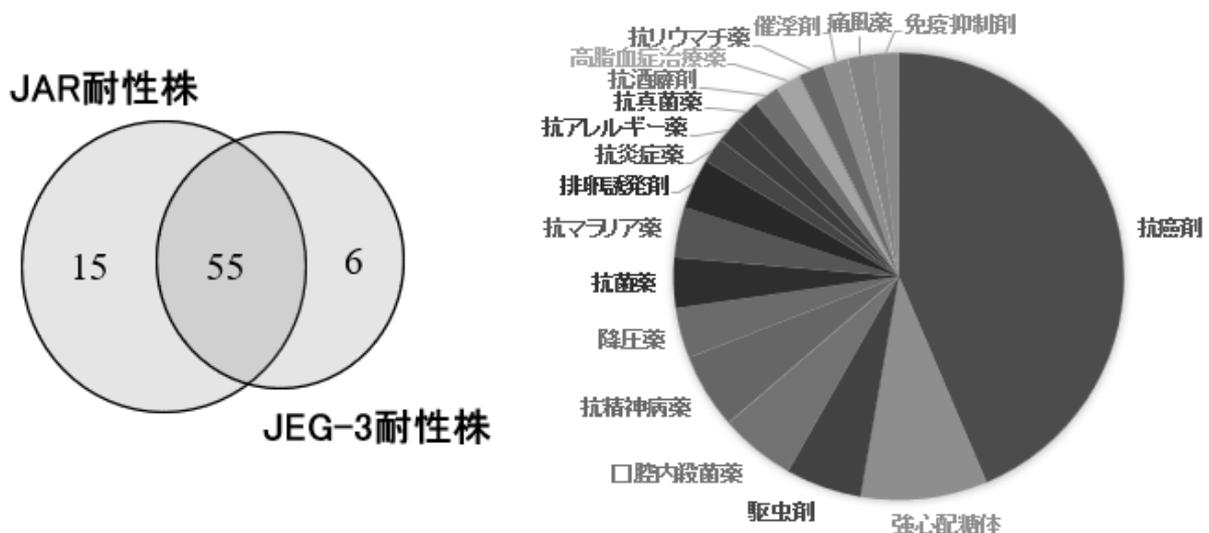
(1) メソトレキセート耐性株の樹立

低濃度のメソトレキセートから、徐々に高濃度にするこゝで、メソトレキセート耐性株 (JAR-MR 細胞、JEG-3-MR 細胞) を樹立した。JAR 親株のメソトレキセートに対する IC50 は、16 nM であるのに対し、JAR-MR 細胞の IC50 は、3,512 nM となった。同様に、JEG-3 親株のメソトレキセートに対する IC50 は、59 nM であるのに対し、JEG-3-MR 細胞の IC50 は、2,291 nM となり、親株と比較して、数十倍～数百倍の耐性を獲得した。

(2) in vitro における薬剤ライブラリスクリーニング

1 次スクリーニングとして、メソトレキセート耐性株に対して、1238 種類の化合物を 10 μ M の濃度で添加し、細胞生存率が 25%以下となる化合物を抽出した。その結果、JAR-MR 細胞では、70 個、JEG-3-MR 細胞では、61 個同定され、両者に共通するものは 55 個であった (図 1)。それらの化合物の薬効別に検討したところ、24 種類は抗癌剤であった。

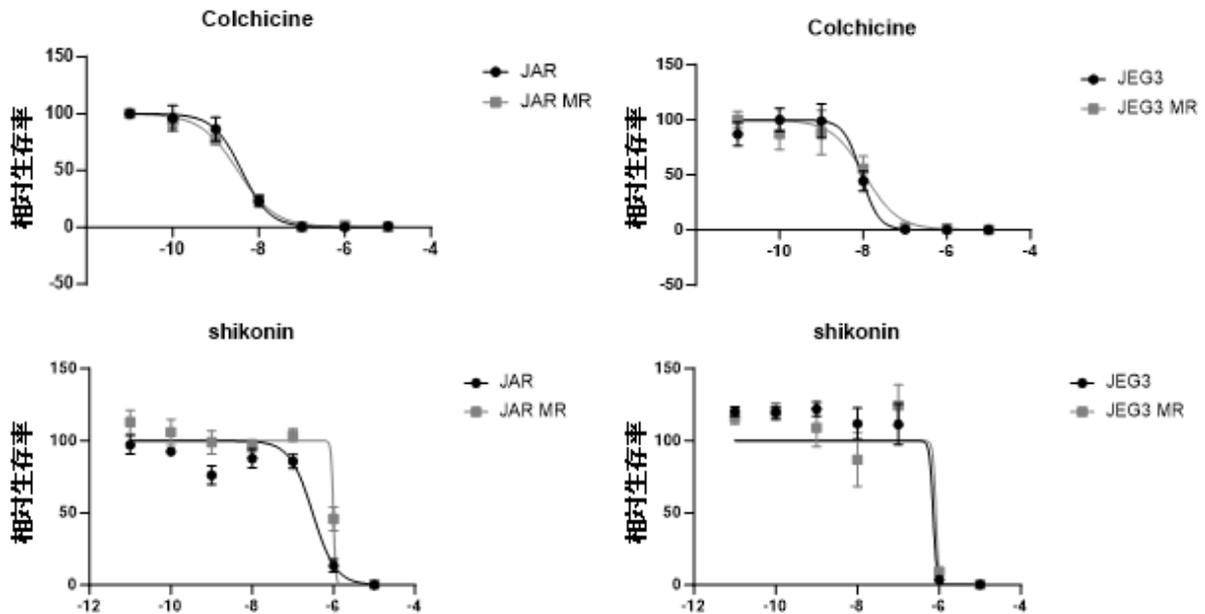
図1. 一次スクリーニングの結果



本研究においては、既存抗癌剤の絨毛癌への応用が目的ではなく、他疾患に対する既存薬の新たな抗癌作用の検索を目的としているため、24 種類の抗癌剤を除いた 31 種類の薬剤に対して 2 次スクリーニングを行った。2 次スクリーニングとしては、候補薬剤の濃度を 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M とし、各薬剤の IC50 を算出した。その結果、両細胞株の IC50 が 1 μ M 未満である薬剤が 6 種類選択された。そのうち、効果が高い薬剤として、コルヒチン (JAR-MR 細胞: 3.2 nM, JEG-3-MR 細胞: 10.1 nM)、シコニン (JAR-MR

細胞: 990 nM, JEG-3-MR 細胞: 830 nM) が選択された (図2)。なお、親株とメソトレキセート耐性株の比較においては、明らかな差は認めなかった。

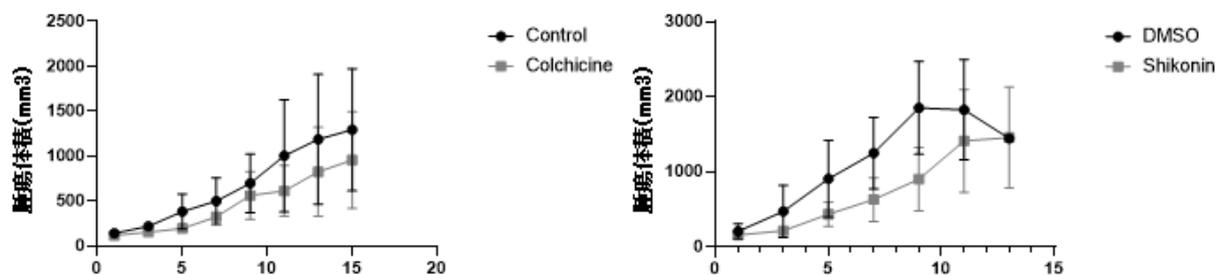
図2. 候補薬剤のin vitroにおける効果 (IC50)



(3) in vitro における効果

ヌードマウスに、 4×10^6 個の JAR 細胞を皮下移植した。腫瘍が 100mm^3 を超えた後に、コルヒチン (2mg/kg) を経口投与した。その結果、コルヒチン投与は、腫瘍増殖を抑制する傾向がみられた。一方、同様に、腫瘍が 100mm^3 を超えた後に、シコニン (3mg/kg) を腹腔内投与した。その結果も、シコニン投与は、腫瘍増殖を抑制する傾向がみられた。また、いずれの薬剤もマウスの体重減少は見られなかった。

図3. 候補薬剤のマウスモデルにおける効果



4. 考察

絨毛癌のメソトレキセート耐性に関しては、DHFR 遺伝子の増幅による影響が以前より報告されている（文献1）。しかし、DHFR の発現抑制だけでは、メソトレキセートの感受性は改善しないことも示されている。（文献2）。従って、メソトレキセート耐性に関わる他の因子について、更なる研究が求められている。

既承認薬のドラッグリポジショニングは、安全性が確立された薬剤を用い、新たな薬効を探索し、他疾患への応用を目指す戦略である（文献3）。そのため、臨床試験の実施が困難である希少癌における新規治療薬開発として期待されている。我々は、以前にも絨毛癌細胞に対して、ドラッグライブラリスクリーニングを実施しており、ポリノスタットが候補薬として同定されている（文献4）。今回、我々は、メソトレキセート耐性株に着目して、改めてドラッグライブラリスクリーニングを実施した。その結果、新たにコルヒチンとシコニンがメソトレキセート耐性の絨毛癌細胞に対しても高い抗腫瘍効果（in vitro）を発揮することが示された。コルヒチンは主に痛風の治療に使用され、微小管の重合を阻害することで細胞分裂を抑制します（文献5）。また、抗癌作用や抗炎症作用もあり、いくつかの癌治療において研究されています。一方、シコニンは、植物由来のアルカロイドで、抗癌作用や抗炎症作用があることが知られています。細胞の分裂を抑制し、癌細胞の増殖を阻害することから、癌治療の研究にも利用されています。（引用6）。しかし、残念ながら、いずれの薬剤もマウスでの有意な抗腫瘍効果は見いだせなかった。従って、in vivoにおいて、これらの薬剤が効果を発揮するためには、薬剤送達方法等を改善するなど、更なる研究が求められる。

ドラッグライブラリスクリーニングにより、絨毛癌細胞に高い抗腫瘍効果を示す化合物を同定した。今後も研究を継続することにより、絨毛癌患者の予後改善に寄与することが期待される。

5. 文献

1. Sakai K, Wake N, Fujino T, *et al.* Methotrexate-resistant mechanisms in human choriocarcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 1989 Jul;34(1):7-11.
2. Georgiou M, Ntavelou P, Stokes W, *et al.* ATR and CDK4/6 inhibition target the growth of methotrexate-resistant choriocarcinoma. *Oncogene.* 2022;41(18):2540-2554.
3. Khambhati K, Siruka D, Ramakrishna S, *et al.* Current progress in high-throughput screening for drug repurposing. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2024;205:247-257.
4. Watanabe E, Yokoi A, Yoshida K, *et al.* Drug library screening identifies

histone deacetylase inhibition as a novel therapeutic strategy for choriocarcinoma.

Cancer Med. 2023;12(4):4543-4556.

5. Dhyani P, Quispe C, Sharma E, *et al.* Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):206.

6. Biswal S, Sahoo SK, Biswal BK. Shikonin a potent phytotherapeutic: a comprehensive review on metabolic reprogramming to overcome drug resistance in cancer. *Mol Biol Rep.* 2025;52(1):347.

6. 論文発表

・西子 裕規, 新美 薫, 安井 裕子, 吉田 康将, 西野 公博, 山本 英子, 梶山 広明. 絨毛癌 MTX 耐性株の樹立とドラッグ・リポジショニングによる治療薬剤の探索. 第 32 回日本胎盤学会学術集会・第 42 回日本絨毛性疾患研究会. 2024 年 10 月 18 日~19 日 岡山岡山国際交流センター