

経口鉄キレート剤デフェラシロクス  
はゲムシタビンと併用することで  
相乗的に膵癌細胞への抗腫瘍効果を  
示す

氏名 篠田崇平

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻 消化器内科学分野

平成30年6月

## 目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景および目的	4
3. 方法	5
4. 結果	7
5. 考察	12
6. 結語	14
7. 謝辞	14
8. 参考文献	15

## 1. 要旨

【背景】膵癌は極めて予後が不良で、副作用の少ない新規膵癌化学療法が必要とされている。鉄は細胞代謝に必須で、癌細胞は増殖速度が速く、より多くの鉄を必要とする。そのため鉄制御は新規癌治療となりえる。既に我々は膵癌細胞株を用いたin vitro及び、in vivo研究において、内服剤である次世代型鉄キレート剤デフェラシロクス (DFX) が濃度依存性に抗腫瘍効果を持つことを確認した。

【方法・結果】本研究ではゲムシタビン (GEM) とDFXを併用した新規膵癌治療法の基礎的有効性をIn vitro, in vivoで検討を行った。In vitroに関して、Cell proliferation、Apoptosis analysis、Caspase analysisでは、GEM+DFX併用群はGEM単剤群、DFX単剤群と比較し、有意な腫瘍増殖抑制効果、Late apoptosisの増加、Caspase活性の上昇を示した。In vivoではヌードマウスを用いた膵癌細胞株皮下移植モデルで検討を行ったところ、GEM+DFX併用群はGEM単剤群、DFX単剤群と比較し、有意な腫瘍増殖抑制効果とApoptosisの増加を認めた。また、薬剤による有害事象は認められなかった。Westernblot法では、DFX単剤群、GEM+DFX併用群ではGEM耐性に関与するRibonucleotide reductase (RR) の発現が低下していることを確認した。

【結論】鉄キレート剤は抗癌剤ではないため、副作用も少ない。また、鉄キレート剤の腫瘍増殖抑制効果だけでなく、RRの発現を抑制することでGEMによるApoptosis効果も増強するという相乗効果が得られる可能性がある。今後も作用機序解明の基礎的検討を行うことで、膵癌に対するGEM+DFX併用療法は将来的に臨床応用が可能と考えられる。

## 2. 研究の背景および目的

膵癌は極めて予後不良で、その80%以上が切除不能膵癌と診断され、切除可能膵癌を含めても5年生存率は10%以下である(1)。切除不能膵癌の第一選択は化学療法であり、この20年間はゲムシタビン(GEM)が主に標準治療として用いられてきた(2)。近年ではフルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチン、ロイコボリンを併用したFOLFIRINOX療法(3)やGEM+ナブパクリタキセル併用療法(4)の有用性が報告されている。しかし、これら併用化学療法はGEM単剤療法と比べて、血球減少などの偶発症が高頻度で発生する。また、膵癌の半数以上は65歳以上の高齢者である(1)こと、現時点における膵癌化学療法は根治を目指したものでなく、あくまで生存期間延長を目的とした緩和的治療であることを考慮すると、GEMは依然膵癌治療のKey drugである。

鉄はDNA合成に必須な元素である(5)。癌細胞は増殖速度が速く、正常細胞と比べより多くの鉄を必要とするため、鉄制御は新規癌治療となりえる(6)。鉄キレート剤は鉄過剰症に対して投与されている既存の薬剤で、抗癌剤ではないため副作用が少ない。我々は鉄キレート剤デフェロキサミン(DFO)の難治進行肝癌に対する臨床的有効性を世界で初めて報告した(7)。DFOは経静脈投与する薬剤であるため、近年では鉄過剰症に対して経口投与ならびに外来治療が可能な次世代型鉄キレート剤デフェラシロクス(DFX)が使用されている。そして我々はDFXが膵癌細胞株に対して濃度依存性に腫瘍増殖抑制効果を示すことを報告した(8)。しかし、DFX単剤では既存の抗癌剤と比較すると、十分なアポトーシスと腫瘍増殖抑制効果を示しているとは言い難い。また、我々は基礎実験において肝細胞癌に対してDFXとソラフェニブの併用治療がDFX単剤と比較し肝発癌を抑制することを示すなど、DFXと既存の抗癌剤との併用療法に着目してきた(9)。以上の背景から、今回我々は膵癌に対するGEM+DFX併用療法の有効性について検討した。

### 3. 方法

#### (1) 細胞培養と薬剤

本検討ではAmerican Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)から購入した膵癌細胞株であるBxPC-3、Panc-1を使用した。BxPC-3とPanc-1は膵癌由来の上皮細胞である。BxPC-3はRPM I-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)に10% fetal calf serumと50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを加えて培養した。Panc-1はDulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies)に10% fetal calf serumと50  $\mu$ g/mlゲンタマイシンを加えて培養した。全て37°C、5% CO<sub>2</sub>の環境下で培養した。GEMはEli Lilly and Co. (Indianapolis, IN, USA)から、DFXはNovartis (Basel, Switzerland)から購入した。

#### (2) 細胞増殖抑制効果の評価

細胞増殖は3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assayを用いて評価した。96穴培養プレート(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)内の各Well内にそれぞれ3000 cells/100  $\mu$ lの細胞を投与し、37°Cで24時間培養した。次にGEM (0, 5, 10, 20, 39, 78, 156, 312 nM) and/or DFX (0, 1, 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500, 1000  $\mu$ M)をそれぞれに加えて72時間さらに培養した。10  $\mu$ lのMTS solution (Promega, Madison, WI, USA)をそれぞれに加え2時間経過した後に、multimode reader (Infinite 200 PRO, Tecan Trading, AG, Switzerland)で490nmの吸光度を測定し、コントロール群との比率で評価を行った(8, 10)。

#### (3) アポトーシス解析

96穴培養プレート内の各Well内に3000 cells/100  $\mu$ lの細胞を投与し、37°Cで24時間培養した。GEM (20 nM) and/or DFX (20  $\mu$ M)をそれぞれに加えて72時間さらに培養した。細胞を回収した後に、caspase 3/7 assay kit (Caspase-Glo 3/7 kit, Promega)を用いてカスパーゼ活性を評価した。アポトーシスに関してはapoptosis detection kit (Annexin V Apoptosis Detection Kit APC, eBioscience, San Diego, CA, USA)、flow cytometer (Gallios, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).を用いて評価し、FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)で解析を行った(8, 10)。

#### (4) ノードマウスを用いた膵癌細胞株皮下移植モデルでの評価

全ての動物実験は山口大学医学部動物実験委員会の審査を受け許可を得て行った(approval ID 21-035)。また、「山口大学医学部動物実験指針」、「動物の保護及び保管に関する法律」(法律第105号)及び「実験動物の飼養及び保管に関する基準」(総理府告示第6号)の規制に基づいて行った。

雌のBALB/c (nu/nu)マウスをNippon SLC (Shizuoka, Japan)から購入し、8-10週齢時点でBxPC-3を、RPMI-1640とMatrigel (BD Bioscience)が1:1の比率になるよう懸濁し、 $3 \times 10^6$ 個の細胞

をマウス背部の皮下に投与した。皮下移植後に腫瘍径を隔日計測し、腫瘍体積(mm<sup>3</sup>)を短径<sup>2</sup>×長径/2という計算式を用いて算出した。平均腫瘍体積が180 mm<sup>3</sup>に達した時点で薬剤投与を開始した(day 0)。マウスはcontrol (n=10), GEM (n=12), DFX (n=10), and GEM+DFX (n=12)の4群に分けた。過去の検討(8, 11)と同様で、DFXはゾンデを用いて200mg/kg/dayを3回/週の頻度で経口投与を行い、GEMは5mg/kg/回を2回/週の頻度で腹腔内投与を行った。Control群はPBSのみをそれぞれ投与した。薬剤投与開始から21日後にSacrificeし、腫瘍体積を用いて腫瘍増殖抑制効果を比較検討した。Sacrifice時に採血を行い、Yamaguchi Laboratory Co., Ltd. (Ube, Japan)で解析を行った。移植腫瘍片はパラホルムアルデヒドで72時間固定を行い、パラフィン包埋した。terminal deoxynucleotidyl transferase-deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL)のIn Situ Detection kit (TMR Red; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)を用いて染色を行い、アポトーシス陽性細胞をDynamic cell count BZ-HIC software (model BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan)を用いて測定した。

#### (5) Western blot法での評価

BxPC-3とPanc-1にGEM(20 nM) and/or DFX(20 μM)を72時間投与し、溶解液に4℃で1時間反応させてタンパク質抽出を行った。その後15000Gで30分かけて遠心分離を行い、上清を回収した。タンパク質はLowry法(12)に準じて濃度測定を行った。抽出した各群のタンパク質40 μgに対して、pre-cast gels (12% acrylamide; Mini-PROTEAN TGX Gels, BioRad, Hercules, CA, USA)を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。一次抗体は①rabbit monoclonal antibody against ribonucleotide reductase (RR) subunit 1 (RRM1, dilution 1:3000, ab137114; Abcam, Cambridge, MA, USA)、②rabbit monoclonal antibody against RR subunit 2 (RRM2, dilution 1:1500, ab172476; Abcam)、③mouse monoclonal antibody against beta-actin (dilution 1:10000, ab6276; Abcam)を用いた。一次抗体を4℃で24時間反応させた後に、二次抗体であるhorseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (dilution 1:5000; GE Healthcare, Buckinghamshire, England, UK)を室温で1時間反応させた(13)。image analysis software (Quantity One; BioRad, Hercules, CA, USA)を用いて解析を行った。

#### (6) 統計解析

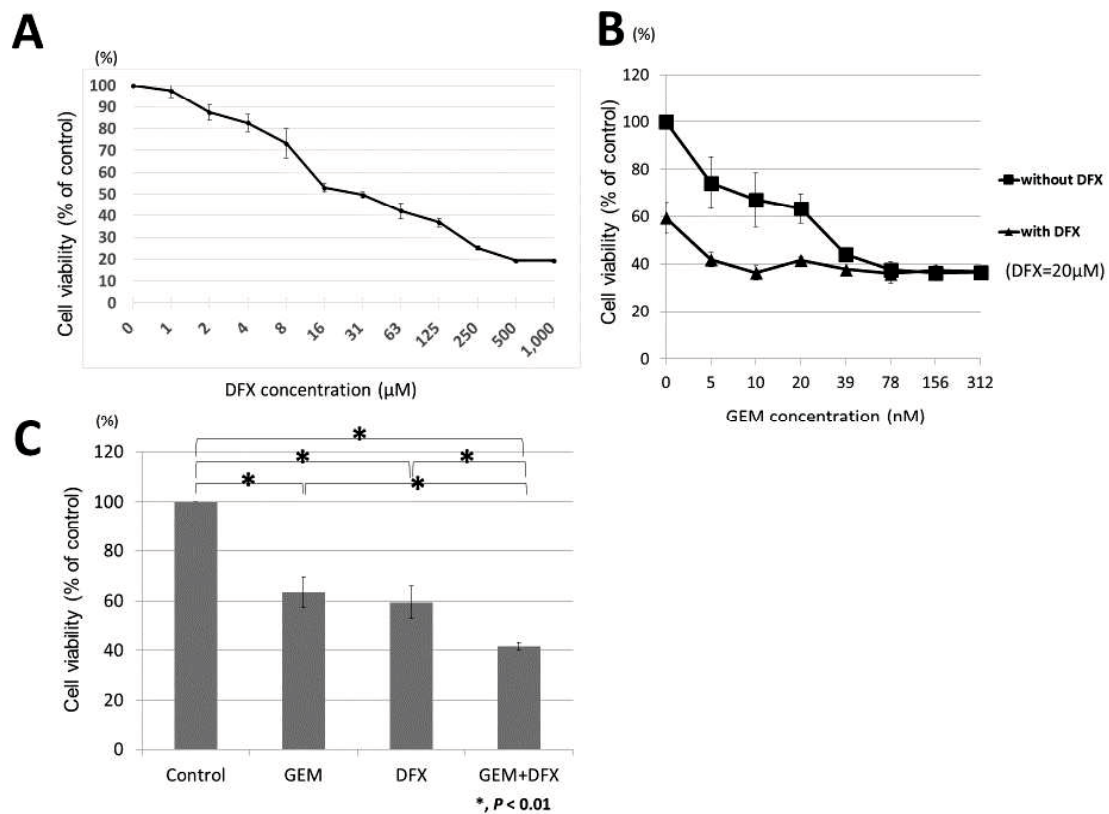
統計解析ソフトJMP13(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いてStudent's t testで検討を行った。結果はmean ± standard deviation (SD)で示した。P値<0.05を有意と判定した。

#### 4. 結果

##### (1) *in vitro*でのBxPC-3に対する細胞増殖抑制効果

DFXのBxPC-3に対する細胞増殖抑制効果をMTS assayで評価を行うと、濃度依存性に細胞増殖抑制効果を呈することが明らかとなった (Fig. 1A)。DFXのBxPC-3に対するIC<sub>50</sub>値は $22.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ であった。次にGEM+DFX併用群のBxPC-3に対する細胞増殖抑制効果を評価するためGEM (0, 5, 10, 20, 39, 78, 156, 312 nM) with  $20 \mu\text{M}$  DFX or without DFXで評価を行った (Fig. 1B) ところ、 $20 \text{ nM}$  GEM+ $20 \mu\text{M}$  DFX併用群では $20 \text{ nM}$  GEM単剤と比較し有意に高い細胞増殖抑制効果を示した (Fig. 1C)。

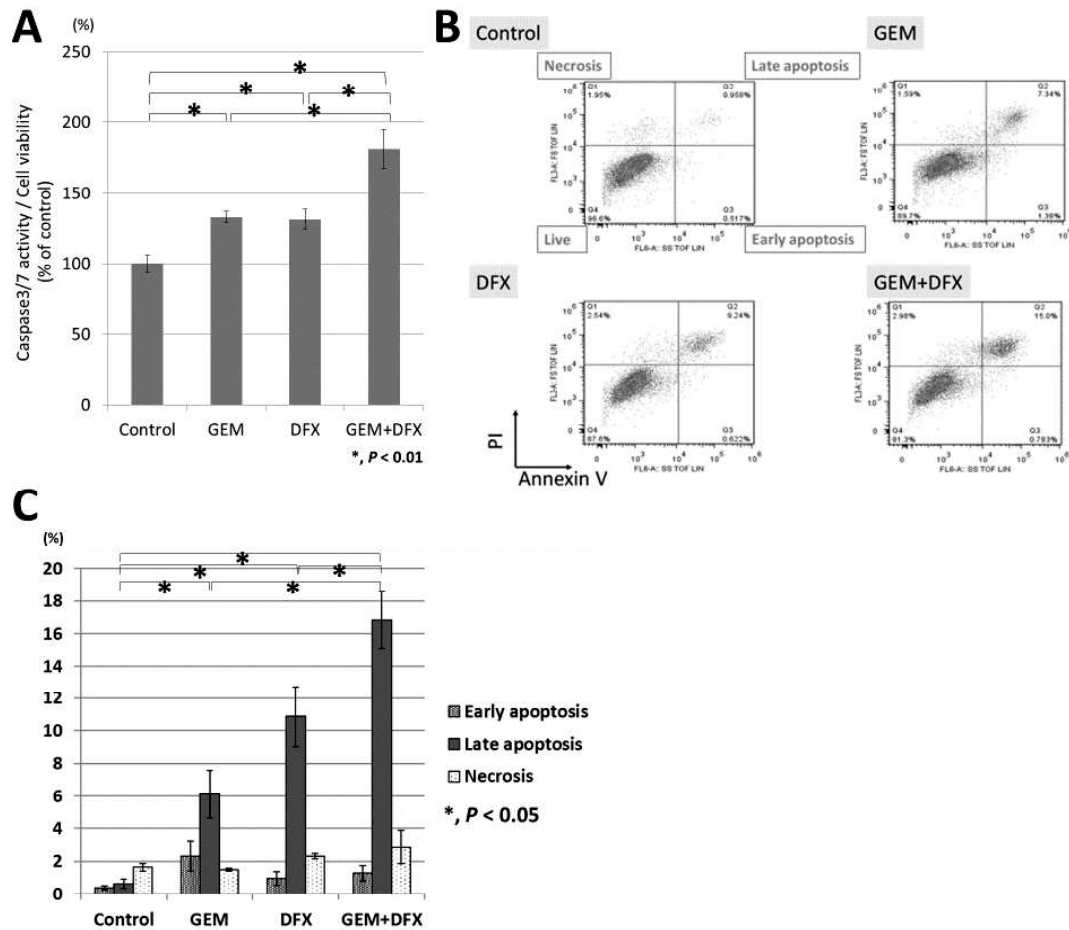
Fig. 1



##### (2) *in vitro*でのApoptosis誘導の評価

細胞増殖抑制効果の検討結果を念頭に、 $20 \text{ nM}$  GEM単剤群、 $20 \mu\text{M}$  DFX単剤群、or  $20 \text{ nM}$  GEM and  $20 \mu\text{M}$  DFX併用群で検討を行った。GEM+DFX併用群はGEM単剤群と比較し、有意に高いカスパーゼ活性を示した (Fig. 2A)。PIとAnnexin V染色を用いたFlow cytometryでの解析でもGEM+DFX併用群はGEM単剤群と比較し、有意なLate apoptosis細胞数の上昇を認めた (Fig. 2B, C)。

Fig. 2



### (3) in vivoでの腫瘍増殖抑制効果

ヌードマウスを用いた膀胱癌細胞株皮下移植モデルを用いてin vivoでの腫瘍増殖抑制効果を評価した。平均腫瘍径はcontrol群、GEM単剤群、DFX単剤群、GEM+DFX併用群はそれぞれ  $697 \pm 244$ ,  $372 \pm 136$ ,  $372 \pm 166$ , and  $234 \pm 107 \text{ mm}^3$ であった (Fig. 3A)。有意な体重減少や血液検査異常(albumin, AST, ALT, Cre, AMY)はなく (Table1)、GEM+DFX併用群はGEM単剤群と比較し有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。また、血清フェリチン値に関して、DFX単剤群 ( $16.0 \pm 4.1 \text{ ng/ml}$ )、GEM+DFX群 ( $14.6 \pm 3.8 \text{ ng/ml}$ )はControl群 ( $26.8 \pm 15.1 \text{ ng/ml}$ )、GEM単剤群 ( $26.1 \pm 9.4 \text{ ng/ml}$ )と比較し有意な低下を認めた (Table1)。またTUNEL染色で評価を行うと、GEM+DFX併用群はGEM単剤群と比較し、有意なアポトーシス細胞数の上昇を認めた (Fig. 3B and C)。

Fig.3



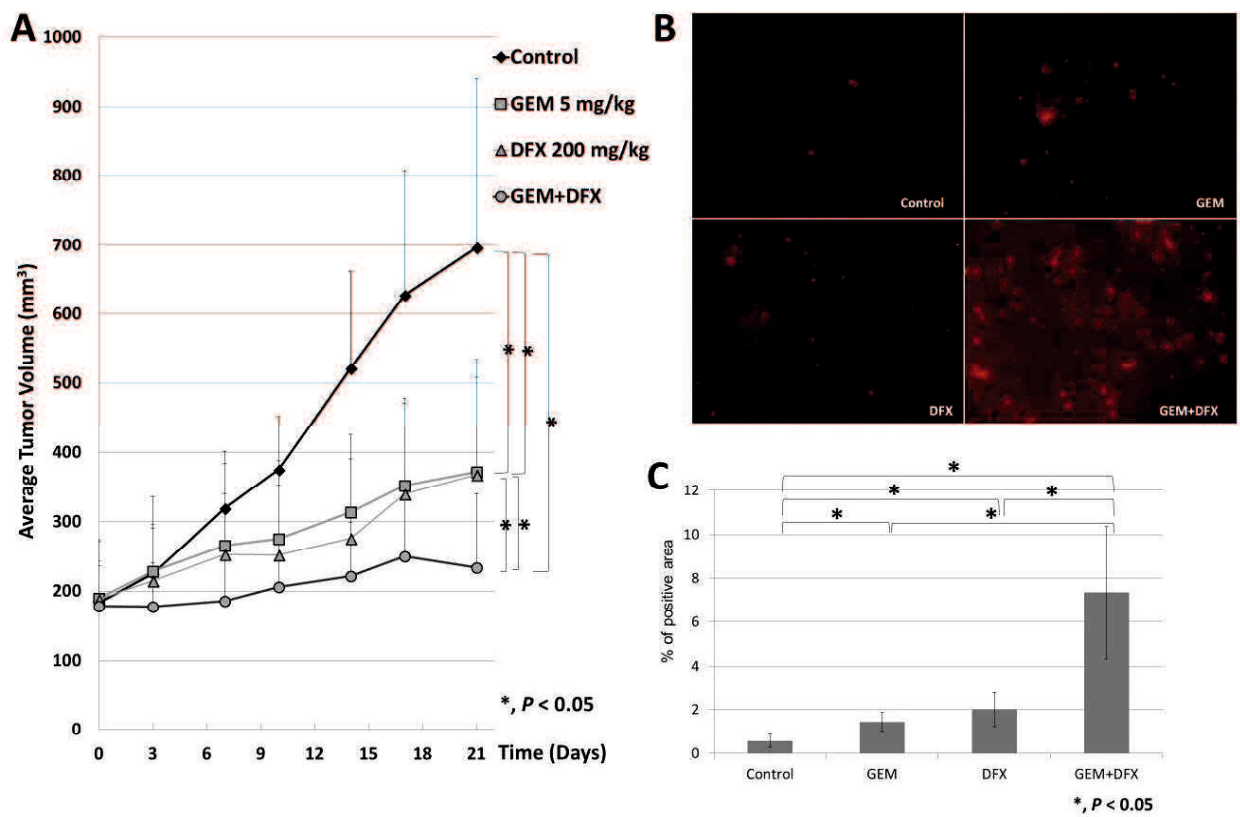


Table.1

		Treatment groups			
	Units	Control	GEM	DFX	GEM+DFX
Body weight	g	21.8 ± 2.5	22.2 ± 2.0	22.4 ± 1.7	22.3 ± 2.3
Serum biochemistry					
Ferritin	ng/ml	26.8 ± 15.1	26.1 ± 9.4	16.0 ± 4.1 <sup>a,b</sup>	14.6 ± 3.8 <sup>a,b</sup>
Albumin	g/dl	3.6 ± 0.2	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1 <sup>a,b</sup>
Aspartate aminotransferase	U/l	141.7 ± 44.6	147.3 ± 36.1	132.8 ± 37.4	139.2 ± 28.5
Alanine transaminase	U/l	25.9 ± 9.4	26.3 ± 10.2	27.0 ± 7.1	30.9 ± 8.5
Creatinine	mg/dl	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00 <sup>a</sup>

Amylase U/l 907.5 ± 146.0 841.7 ± 74.9 894.8 ± 139.8 951.9 ± 112.2

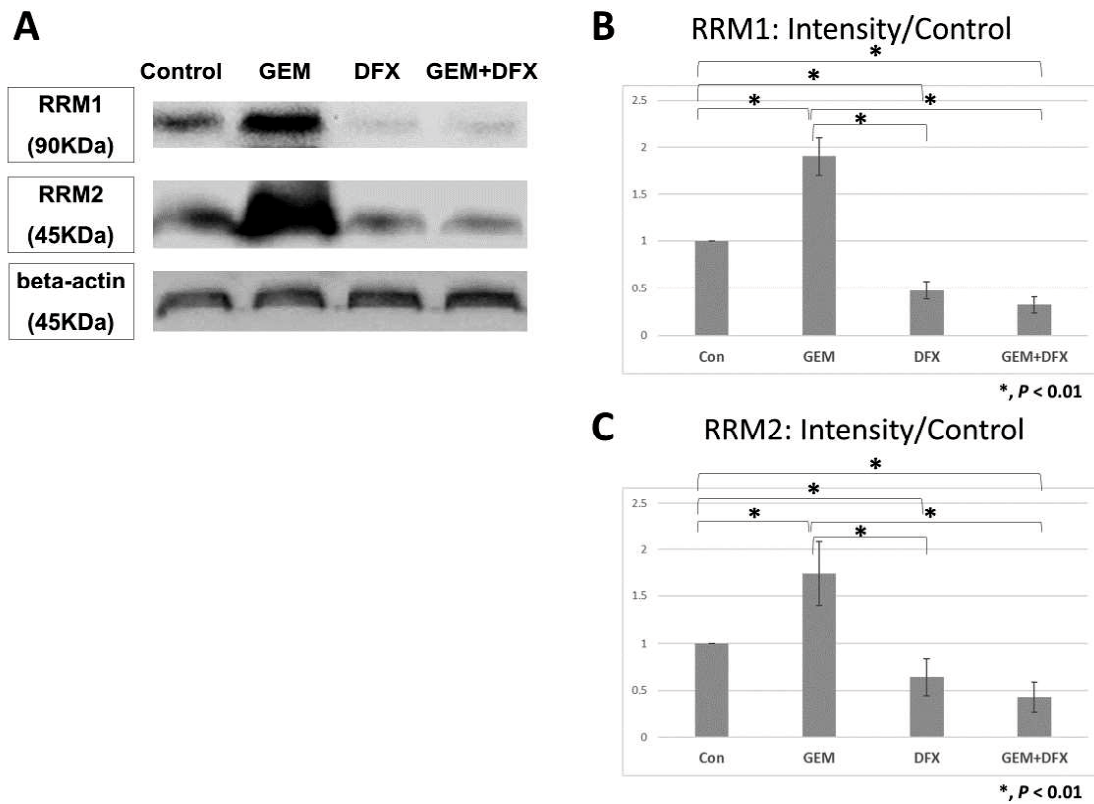
<sup>a</sup>p<0.05 vs control

<sup>b</sup>p<0.05 vs GEM

#### (4) in vitroでのDFXによるRRM1、RRM2タンパク質発現抑制

Ribonucleotide reductase (RR) subunit 1 (RRM1)とRR subunit 2 (RRM2)のタンパク質発現レベルをWesternblot法で評価を行った。RRM1タンパク質の発現強度(intensity/control)はGEM単剤群、DFX単剤群、GEM+DFX併用群それぞれ1.90 ± 0.20, 0.48 ± 0.09, 0.32 ± 0.08であった。RRM2タンパク質の発現強度(intensity/control)はGEM単剤群、DFX単剤群、GEM+DFX併用群それぞれ1.74 ± 0.34, 0.64 ± 0.19, 0.43 ± 0.16であった。RRM1とRRM2タンパク質発現レベルはGEM単剤群で有意に上昇し、DFX単剤群とGEM+DFX併用群で有意に低下していた(Fig. 4A, B, C)。

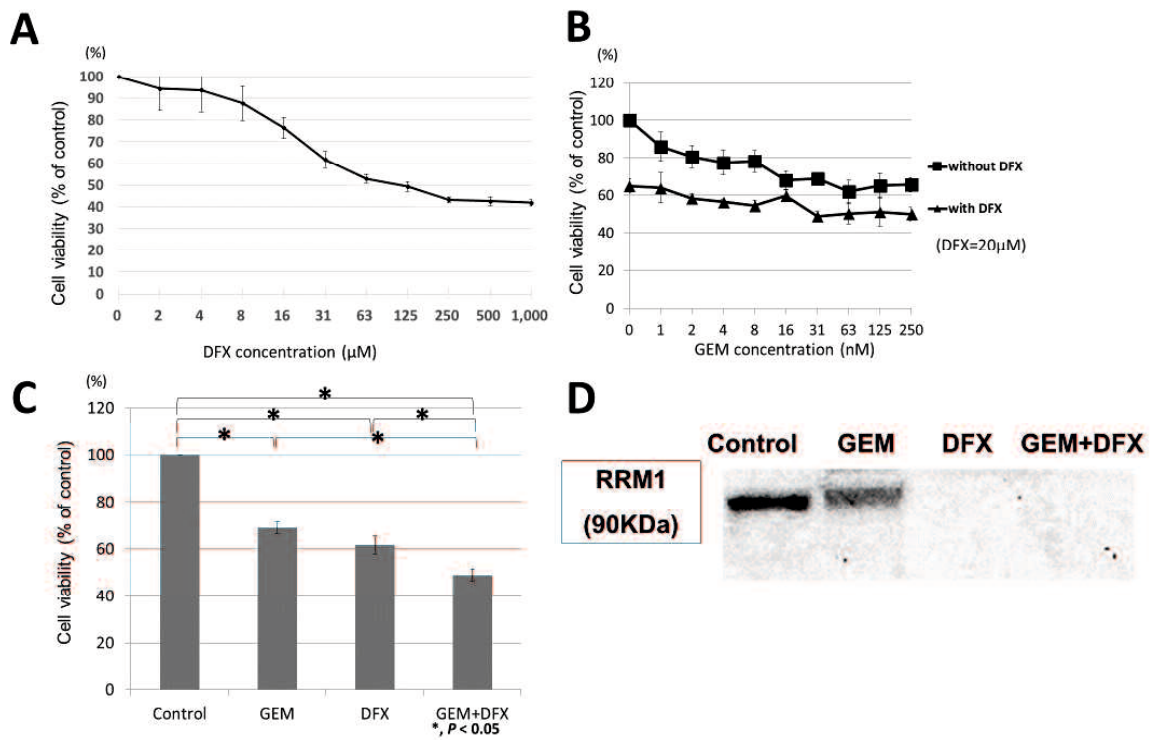
Fig.4



#### (5) 他の膵癌細胞株 (Panc-1) での細胞増殖抑制効果、RRM1タンパク質発現の評価

Panc-1でも同様にMTS assayを用いた評価を行い、BxpC-3と同様に濃度依存性に細胞増殖抑制効果を示した。DFXのIC50値は $23.4 \pm 3.7 \mu\text{M}$ であった(Fig. 5A)。次にPanc-1に対するGEM+DFXの細胞増殖抑制効果を評価するため、GEM (0, 1, 2, 4, 8, 16, 20, 31, 63, 125, 250 nM) with  $20 \mu\text{M}$  DFX or without DFXで評価を行った(Fig. 5B)。また、 $20 \text{ nM}$  GEM+ $20 \mu\text{M}$  DFX併用群では $20 \text{ nM}$  GEM単剤群と比較し有意に高い細胞増殖抑制効果を示した (Fig. 1C)。Panc-1のRRM1タンパク質発現レベルをWestern blot法で評価すると、DFX群とGEM+DFX併用群で有意に低下しており (Fig. 5D)、BxPC-3と同様の傾向を示す結果であった。

Fig.5



## 5. 考察

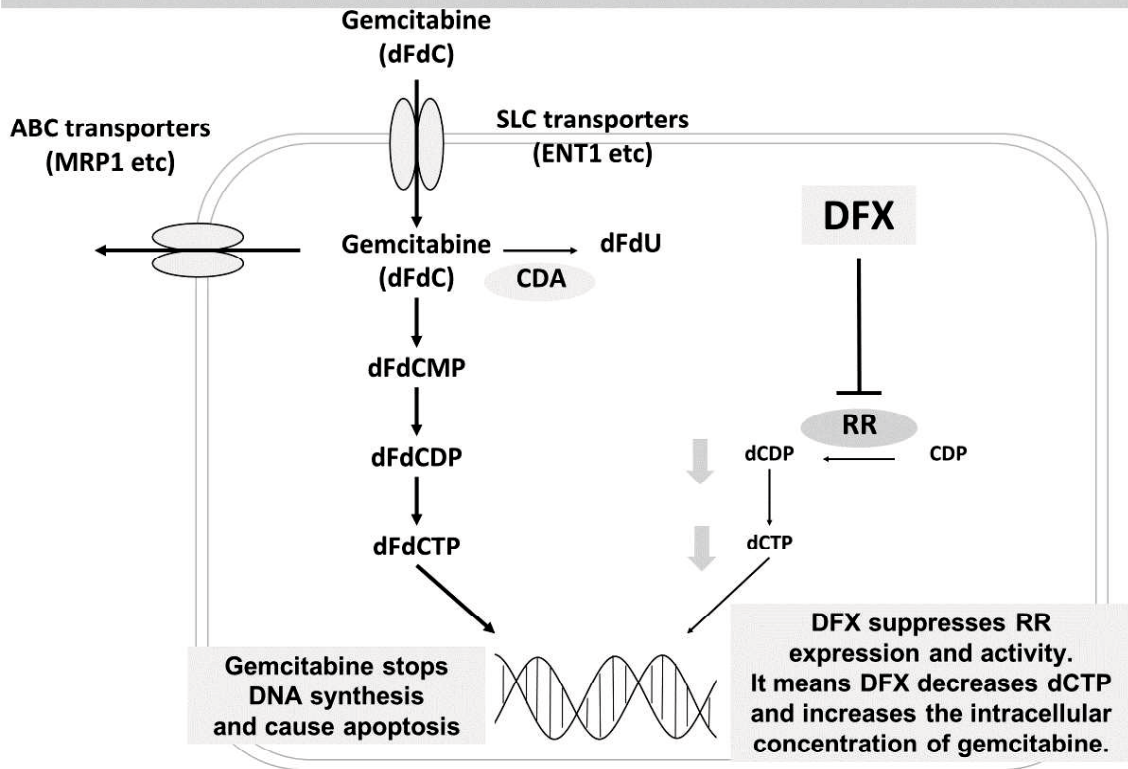
GEMは膵癌においてKey drugであり、GEM耐性機序に関してこれまで多くの検討がされてきた(14)。GEMは細胞内で代謝され、difluorodeoxycytidine triphosphate (dFdCTP) としてDNA合成に取り込まれることで、癌細胞のDNA合成を阻害する。DNA合成の際に本来必要であるdeoxynucleotide (dNTP)とdFdCTPは競合することから、dNTPの増加はGEM耐性に繋がる。RRはdNTPを維持する上で重要な働きをしており、RR増加はGEM耐性に繋がるとされている(15, 16)。臨床研究においても、RR増加によるGEM耐性機構は肺癌(17, 18)、乳癌(19)で確認されている。そして膵癌では膵癌組織中のRRM1発現レベルが生存率に関与するという報告もある(20)。

癌に対する鉄キレート剤の有用性は1986年に白血病で初めて報告され(21, 22)、その後様々な癌種でも、DFXの有効性が報告された(7, 8, 10, 23, 24, 25)。鉄キレート剤は癌のRRを不活化することで腫瘍増殖抑制効果を示すことが知られている(26)。DNA合成で律速段階となるribonucleotidesがdeoxyribonucleotidesへと変化する反応を、RRは触媒する(5)。RRはRRM1とRRM2で構成されており、RRM1は細胞周期のどの段階でも一定の発現が見られるが(27)、RRM2はS期に限局して発現し(27)、M期では分解される(28)。また、RRM2は鉄が補酵素として安定性に寄与している(29)。RRの機能はRRM1とRRM2の発現量と活性の程度で規定されており(30)、RRM2への鉄供給低下と、それに伴うRRM2不安定化は、結果としてRRM1の活性低下に繋がる(29)。また、*in vitro*の検討でGEM耐性細胞にRR inhibitorであるhydroxyureaとGEMを併用して投与すると単剤と比較し有意な細胞増殖抑制効果があったとする報告もある(31)。しかし、鉄キレート剤によるRRM1とRRM2のタンパク質発現量の変化に関して検討されたものはこれまでない(30)。

本検討では、このGEM耐性機序を克服する目的で、膵癌細胞に対する、*in vitro*, *in vivo*でのGEM+DFX併用療法による腫瘍増殖抑制効果の検討を行った。GEM+DFX併用療法はGEM単剤と比較し、有意に腫瘍増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を示すことを確認した。さらにDFX単剤群、GEM+DFX併用群では有意にRRM1, RRM2タンパク質発現量を低下させることも確認した。以上のことから、DFXはRR活性とタンパク質発現を抑制することで腫瘍増殖抑制効果を示すだけでなく、GEMと競合するdNTPを減少させることで潜在的にGEMの効果を増強する可能性が示唆された(Fig. 6)。鉄キレート剤は鉄過剰症に対して使用されている既存の薬剤である。そして抗癌剤でないことからGEMと有害事象が重ならないことが大きな利点となる。さらには、GEM+DFX併用療法はその作用機序から非小細胞肺癌や卵巣癌、血液疾患などへの将来的な応用も期待できるかもしれない。さらにはGEM+DFX+albumin-bound paclitaxelの三剤併用療法が膵癌に対して有効である可能性がある。そして、作用機序の面からDFXは膵癌でのFOLFIRINOX療法で用いられるfluorouracilとの相乗効果も十分に予想される。以上のことからGEM以外の抗癌剤との併用による相乗効果が、他の癌種でも同様に期待でき、多方面での広がりが期待できる。

Fig.6

**Ribonucleotide reductase (RR) and Gemcitabine and iron chelator**



## 6. 結語

鉄キレート剤は抗癌剤ではないため、副作用も少ない。また、鉄キレート剤の腫瘍増殖抑制効果だけでなく、RRの発現を抑制することでGEMによるApoptosis効果も増強するという相乗効果が期待できる。今後も作用機序解明の基礎的検討を行うことで、膵癌に対するGEM+DFX併用療法は将来的に臨床応用が可能と考えられる。

## 7. 謝辞

本稿を作成するに当たり指導頂いた坂井田功教授、および共著者の先生方、そして学位審査を引き受けて頂いた先生方に厚く御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

- 1) SEER. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program: cancer statistics review 1975-2013. National Cancer Institute; 201 [cited 2016]. Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/)
- 2) Burris HA 3rd, Moore MJ, Anderson J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13.
- 3) Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul J L, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1817-25.
- 4) Von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ, Laheru DA, Smith LS, Wood TE, Korn RL, Desai N, Trieu V, Iglesias JL, Zhang H, Soon-Shiong P, Shi T, et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2011;29:4548-54.
- 5) Kalinowski DS and Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2005;57:547-83.
- 6) Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013;13:342-55.
- 7) Yamasaki T, Terai S, Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:576-8.
- 8) Harima H, Kaino S, Takami T, Shinoda S, Matsumoto T, Fujisawa K, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Deferasirox, a novel oral iron chelator, shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2016;16:702.
- 9) Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Uchida K, Fujisawa K, Matsumoto T, Saeki I, Terai S, Sakaida I. Deferasirox, an oral iron chelator, prevents hepatocarcinogenesis and adverse effects of sorafenib. *J Clin Biochem Nutr* 2016;58:202-9.
- 10) Saeki I, Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Maeda M, Fujisawa K, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I, Ishikawa T, Uchida K, Tani K, Sakaida I. Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2016;22:8967-77.
- 11) Kovacevic Z, Chikhani S, Lovejoy DB, Richardson DR. Novel thiosemicarbazone iron chelators induce up-regulation and phosphorylation of the metastasis suppressor N-myc down-stream regulated gene 1: a new strategy for the treatment of pancreatic cancer. *Mol Pharmacol* 2011;80:598-609.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

- 13) Suenaga S, Kuramitsu Y, Kaino S, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. Active hexose-correlated compound down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Anticancer Res* 2014;34:141-6.
- 14) Yoav Binenbaum, Shorook Na'ara, Ziv Gil. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resistance Updates* 2015;23:55-68.
- 15) Lecca P. Methods of biological network inference for reverse engineering cancer chemoresistance mechanisms. *Drug Discov Today* 2014;19:151-63.
- 16) Goan YG, Zhou B, Hu E, Mi S, Yen Y. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 1999;59:4204-7.
- 17) Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, Gautam A, Cantor A, Sharma A, Simon G. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:4731-7.
- 18) Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, Cambieri A, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, Papotti M, Scagliotti GV. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 2006;17:1818-25.
- 19) Jordheim LP, Guittet O, Lepoivre M, Galmarini CM, Dumontet C. Increased expression of the large subunit of ribonucleotide reductase is involved in resistance to gemcitabine in human mammary adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1268-76.
- 20) Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Okami J, Yoshioka S, Yamasaki M, Marubashi S, Takemasa I, Miyamoto A, Takeda Y, Nagano H, Dono K, et al. Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1355-63.
- 21) Kontoghiorghes GJ, Piga A, Hoffbrand AV. Cytotoxic and DNA-inhibitory effects of iron chelators on human leukaemic cell lines. *Hematol Oncol* 1986;4:195-204.
- 22) Estrov Z, Tawa A, Wang XH, Dubé ID, Sulh H, Cohen A, Gelfand EW, Freedman MH. In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia. *Blood* 1987;69:757-61.
- 23) Ford SJ, Obeidy P, Lovejoy DB, Bedford M, Nichols L, Chadwick C, Tucker O, Lui GY, Kalinowski DS, Jansson PJ, Iqbal TH, Alderson D, Richardson DR, et al. Deferasirox (ICL670A) effectively inhibits oesophageal cancer growth in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 2013;168:1316-28.
- 24) Lui GY, Obeidy P, Ford SJ, Tselepis C, Sharp DM, Jansson PJ, Kalinowski DS, Kovacevic Z, Lovejoy DB, Richardson DR. The iron chelator, deferasirox, as a novel strategy for cancer treatment: oral activity against human lung tumor xenografts and molecular mechanism of action. *Mol Pharmacol* 2013;83:179-90.



- 25) Ohyashiki JH, Kobayashi C, Hamamura R, Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. The oral iron chelator deferasirox represses signaling through the mTOR in myeloid leukemia cells by enhancing expression of REDD1. *Cancer Sci* 2009;100:970-7.
- 26) Lui GY, Kovacevic Z, Richardson V, Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Targeting cancer by binding iron: dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget* 2015;6:18748-79.
- 27) Chabes A, Thelander L. Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* 2000;275:17747-53.
- 28) Thelander L, Reichard P. Reduction of ribonucleotides. *Annu Rev Biochem* 1979;48:133-58.
- 29) Thelander L, Gräslund A. Mechanism of inhibition of mammalian ribonucleotide reductase by the iron chelate of 1-formylisoquinoline thiosemicarbazone. Destruction of the tyrosine free radical of the enzyme in an oxygen-requiring reaction. *J Biol Chem* 1983;258:4063-6.
- 30) Le NT, Richardson DR. The role of iron in cell cycle progression and the proliferation of neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1603:31-46.
- 31) Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y, Tabata S, Ikeda R, Kawahara K, Tsujikawa K, Chijiwa K, Yamada K, Akiyama S, et al. Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors. *J Pharmacol Sci* 2015;127:319-25.