

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16126

研究課題名(和文) DNA損傷トレランス機構をターゲットとした新規がん分子標的治療の展開基盤

研究課題名(英文) A study on DNA damage tolerance pathways as novel targets for cancer therapy

研究代表者

櫻井 靖高 (Sakurai, Yasutaka)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：50733101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷トレランス(DDT)をターゲットとした分子標的治療の可能性を示すことを目的として、DDTに関連する分子の一つであるREV7の生理的機能の解析を行った。精巣胚細胞腫瘍細胞株ではREV7が高発現しており、REV7をノックダウンすることで細胞増殖が低下し、シスプラチンに対して高感受性を示した。さらに、REV7ノックダウン細胞では、シスプラチン処理によりヒストンH2AXのリン酸化および切断型PARPの増加が認められた。CRISPR/Cas9システムを用いてREV7をノックアウトしたところ、シスプラチン感受性細胞だけでなく、シスプラチン耐性細胞に対してもシスプラチン感受性を高めることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

REV7の機能抑制はシスプラチンの抗腫瘍活性を高めるだけでなく、シスプラチン抵抗性腫瘍に対しても有効であり、DNA損傷トレランスが分子標的として有用であることが示唆された。シスプラチンの腫瘍縮小効果の増強は投薬量の減少につながり、相対的にシスプラチンによる副作用の低減に大きく寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：To provide the evidence that DNA damage tolerance (DDT) pathways could be novel targets for cancer therapy, I analyzed the physiological function of REV7 involved in DDT pathways. REV7 was highly expressed in testicular germ cell tumor (TGCT) cells, and depletion of REV7 decreased cell proliferation and enhanced sensitivity to cisplatin. After cisplatin treatment, phosphorylation of H2AX and cleaved-PARP were more increased in REV7 knockdown cells. Additionally, CRISPR/Cas9 inactivation of REV7 in TGCT cells enhanced cisplatin sensitivity of cisplatin-resistant cells as well as cisplatin-sensitive cells. These results indicate that depletion of REV7 enhances sensitivity to cisplatin in TGCTs, suggesting that REV7 is a potential candidate of molecular target for TGCT therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷トレランス 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シスプラチンは数多くの固形癌に有効性が認められている白金製剤であり、抗癌剤治療において中心的な役割を果たしている。その薬効は、癌細胞の DNA 鎖に架橋を生じさせることで DNA 複製を妨げ、癌細胞を細胞死に導くことによるものである。シスプラチンは高い腫瘍縮小効果を示す一方、治療抵抗性や激しい副作用が投与する上で大きな問題となっている。

DNA 鎖架橋をはじめとする DNA 損傷は DNA 修復機構によって取り除かれるが、修復されずに残った損傷、または DNA 複製期に生じた損傷は DNA 複製を阻害する。DNA 複製の阻害は細胞死や突然変異といったゲノム不安定化を引き起こすため、一時的に複製阻害を回避し、複製の完了を保障する機構として DNA 損傷トレランスが存在する。この機構は、細胞の損傷ストレスに対する耐性に大きく貢献する一方、DNA 複製をターゲットとした抗癌剤の効果に対して抑制的に働き、結果的に副作用の増強に関与している可能性がある。

近年、シスプラチンによる DNA 鎖架橋の DNA 損傷トレランスに関して、REV7 複合体が関与していることが生化学的に明らかにされた。(Gregory et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014)。従って、REV7 複合体はシスプラチンによって生じた DNA 鎖架橋に対する細胞の生存に寄与する反面、シスプラチンに対する抵抗性に関与し、投薬量の増加による副作用の増強に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、シスプラチンによる腫瘍縮小効果と治療抵抗性およびその副作用における REV7 の生理的意義を細胞およびマウスを用いて多面的に解析し、DNA 損傷トレランスの分子標的治療としての有効性および実行可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) REV7 のノックダウンによるシスプラチン感受性の検討

REV7 を高発現している精巣腫瘍由来の細胞株 (NEC8) に対して、shRNA を用いて REV7 をノックダウンした細胞株を樹立した。樹立した細胞株に対して、細胞増殖速度、および抗がん剤感受性、DNA 損傷応答について解析を行った。

(2) シスプラチン耐性細胞の樹立と REV7 ノックアウト細胞の作成

長期間シスプラチンに曝露することでシスプラチン耐性を獲得した細胞株を樹立した。樹立した細胞株に対して CRISPR/Cas9 システムを利用して REV7 ノックアウトし、(1)と同様の解析を行った。

(3) REV7 の遺伝子発現抑制によるシスプラチンの腫瘍縮小効果の検討

(2)で樹立した細胞を SCID マウスに移植した移植腫瘍モデルにシスプラチンを投与して、REV7 のノックアウトによる腫瘍縮小効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 種々の癌細胞株における REV7 の発現をウエスタンブロットで検出したところ、精巣腫瘍由来の細胞株において REV7 の発現が顕著に認められた。そのため、本研究では精巣腫瘍細胞株 (NEC8) を用いて解析を進めることにした。REV7 の発現を shRNA で抑制したところ、REV7 ノックダウン細胞はコントロールを比較して細胞増殖速度が有意に低下していた。次に、細胞の増殖能を指標としたコロニー形成試験法により、REV7 ノックダウン細胞の抗がん剤に対する感受性を解析した。REV7 ノックダウン細胞はコントロール細胞よりもシスプラチンだけでなく、種々の抗がん剤に対して高い感受性を示した。また、シスプラチン処理後の細胞から細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法でタンパク質の挙動を解析したところ、REV7 ノックダウンにより p53 や pH2AX、切断型 PARP の顕著な増加が認められた。さらに、アポトーシスによる DNA の断片化を TUNEL 法で調べたところ、REV7 ノックダウン細胞ではコントロールと比較して、シスプラチン処理による TUNEL 陽性細胞が増加した。これらの結果から、REV7 は本研究で用いた NEC8 においてシスプラチンによる DNA 損傷の抵抗性に関与しており、REV7 を抑制するとシスプラチンによる二本鎖切断が増加し、細胞死が誘導されることがわかった。

(2) 治療抵抗性を獲得した腫瘍に対しても REV7 の機能不全が有効であるかを調べるために、シスプラチン耐性細胞株の作成を行った。NEC8 をシスプラチン含有培地で培養し、徐々にシスプラチン濃度を上げて、最終的には親株が死滅する濃度でも培養できるシスプラチン耐性細胞の樹立に成功した。樹立したシスプラチン耐性細胞に対してウエスタンブロット法でタンパク質の挙動を解析したところ、シスプラチン耐性細胞では、シスプラチン処理後、pH2AX の増加は親株と同程度に見られるものの、p53 や切断型 PARP の増加が親株よりも抑制されていた。このことから、シスプラチン耐性細胞は、親株と同様にシスプラチンによる二本鎖切断が誘発されるが、アポトーシスが抑制されることによりシスプラチンに対して抵抗性を示している可能性が考えられた。コロニー形成法による感受性試験では、シスプラチン耐性細胞はシスプラチン処理に対して抵抗性を示したが、siRNA で REV7 を一

過的にノックダウンすることによりシスプラチン感受性が高まった。さらに、長期的な REV7 の抑制効果を検討するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて REV7 ノックアウト細胞を作製した。REV7 をノックアウトすることにより、シスプラチン耐性細胞と親株はシスプラチンに対して高感受性を示し、シスプラチンの耐性に関係なく同程度の感受性を示した。さらに、ウエスタンブロット法でタンパク質の挙動を解析したところ、シスプラチン耐性細胞は親株と比較してシスプラチン処理によるアポトーシスが減少していたが、REV7 をノックアウトすることにより、pH2AX とアポトーシスの増加が認められた。以上の結果から、シスプラチンに抵抗性を示す細胞に対しても REV7 の機能抑制を有効な手段であることが示唆された。

- (3) これまでに得られたデータを生体内において証明するために、移植腫瘍モデルを用いた実験を行なった。親株とシスプラチン耐性細胞、およびそれらの REV7 ノックアウト細胞を SCID マウスの皮下に移植して腫瘍を形成させ、シスプラチンの投与による腫瘍縮小効果を経時的に観察した。親株とその REV7 ノックアウト細胞はともにシスプラチン処理により腫瘍縮小効果が認められ、REV7 をノックアウトすることにより腫瘍重量が有意に減少した。一方、シスプラチン耐性細胞はシスプラチン処理による腫瘍縮小効果は見られなかったが、REV7 ノックアウトによりシスプラチン処理により有意に腫瘍の縮小が認められた。したがって、シスプラチンに対して抵抗性を示す腫瘍に対しても REV7 の機能抑制は有効な手段であることが示唆された。

以上のことから、REV7 の機能抑制はシスプラチンの抗腫瘍活性を高めるだけでなく、シスプラチン抵抗性腫瘍に対しても有効であり、DNA 損傷トランスが分子標的として有用であることが示唆された。今後は、DNA 損傷トランスをターゲットとすることによる副作用や遺伝毒性への影響を評価し、治療への応用の可能性を検討していく予定である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Yokoyama M, Ichinoe M, Okina S, Sakurai Y, Nakada N, Yanagisawa N, Jiang SX, Numata Y, Umezawa A, Miyazaki K, Higashihara M, Murakumo Y.

CD109, a negative regulator of TGF- β signaling, is a putative risk marker in diffuse large B- cell lymphoma.

Int. J. Hematol. (2017) 105, 614-622. (査読有)

櫻井靖高、村雲芳樹.

DNA 修復機構をターゲットとした癌の治療戦略.

病理と臨床 (2017) 35, 382-384. (査読無)

Okina S, Yanagisawa N, Yokoyama M, Sakurai Y, Numata Y, Umezawa A, Higashihara M, Murakumo Y.

High expression of REV7 is an independent prognostic indicator in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab.

Int. J. Hematol. (2015) 102, 662-669. (査読有)

Kanao R, Yokoi M, Ohkumo T, Sakurai Y, Dotsu K, Kura S, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Masutani C, Hanaoka F.

UV- induced mutations in epidermal cells of mice defective in DNA polymerase δ and/or

DNA Repair (2015) 29, 139-146. (査読有)

Zhang JM, Murakumo Y, Hagiwara S, Jiang P, Mii S, Kalyoncu E, Saito S, Suzuki C, Sakurai Y, Numata Y, Yamamoto T, Takahashi M.

CD109 attenuates TGF- β 1 signaling and enhances EGF signaling in SK-MG-1 human glioblastoma cells.

Biochem Biophys Res Commun. (2015) 459, 252-258. (査読有)

[学会発表](計7件)

櫻井靖高、仲田典広、高橋雅英、村雲芳樹.

REV7 の発現抑制は抗癌剤抵抗性胚細胞腫瘍のシスプラチン感受性を増強する.

第 107 回日本病理学会総会 (2018 年 6 月、札幌)

七浦奈都実、櫻井靖高、島田裕子、村雲芳樹.

GPI アンカー型蛋白 CD109 の肺扁平上皮癌細胞における発現意義の解析.
第 106 回日本病理学会総会 (2017 年 4 月、東京)

島田裕子、櫻井靖高、村雲芳樹.
Characterization of the Promoter Region of DNA Repair Protein REV7.
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月、横浜)

櫻井靖高、仲田典広、高橋雅英、村雲芳樹.
Depletion of REV7 sensitizes testicular germ cell tumors to chemotherapy.
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月、横浜)

櫻井靖高、吉田和樹、仲田典広、高橋雅英、村雲芳樹.
ヒト REV7 の抑制は抗癌剤抵抗性胚細胞腫瘍のシスプラチン感受性を増強する.
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年 12 月、神戸)

櫻井靖高、高橋雅英、村雲芳樹.
Suppression of REV7 enhances sensitivity to DNA-damaging treatments in testicular germ cell tumors.
第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月横浜)

櫻井靖高、高橋雅英、村雲芳樹.
Suppression of REV7 enhances cisplatin sensitivity in testicular germ cell tumors.
第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年 10 月、名古屋)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/murakumo/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。