様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 ２０ 日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０２９５２

研究課題名（和文）新規DNA修復阻害剤を活用したメカニズム解析と癌治療への応用

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of novel DNA repair inhibitors and their possible application to anticancer therapy

研究代表者
松永　司（Matsunaga, Tsukasa）

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：６０１９２３４０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　14,000,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair; NER）の必須因子ERCC1またはXPBを分解誘導する２種類の低分子化合物の作用機序を詳細に解析し、両反応に関わるユビキチンE3リガーゼ（SCF複合体）を各々同定した後、プロテインキナーゼの関与も明らかにした。また、NER阻害化合物を癌治療に応用する試みとして、シスプラチンの抗腫瘍効果に対する増強作用を示すこと、またオラパリブ（PARP阻害剤）との併用により相乗的な細胞障害性が得られることを示した。一方、新たな化合物ライブラリースクリーニングを行い、新規のNER阻害化合物を２種類同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　ヌクレオチド除去修復は発がんを抑制する重要なゲノム安定化機構の一つであり、基本反応は試験管内再構成系を用いた解析から概ね理解されている。しかし、ヒト細胞内におけるNER反応はさらに複雑であり、様々なレベルの調節因子・反応がわかり始めているが、現段階では断片的な知見が多く全容解明には程遠い。本研究におけるケミカルバイオロジーを利用した新しいアプローチから得た新規NER阻害化合物やその作用機序の知見は、細胞内NER関連反応の理解に寄与する学術的意義があったとともに、NER阻害化合物を癌治療へと応用できる可能性も示すことができ、社会的意義も大きいと言える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have tried to uncover the detailed mechanisms underlying the protein degradation of nucleotide excision repair (NER) factors, ERCC1 or XPB, induced by two kinds of small-molecule compound. We have identified two different SCF complexes responsible for each reaction and also suggested the involvement of protein kinases. Futhermore, we have found that the ERCC1 degrader potentiates the cytotoxicity of cisplatin or olaparib to cancer cells. On the other hand, we have newly identified two natural compounds inhibiting NER with different mechanisms after another chemical library screening.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー　ヌクレオチド除去修復　低分子化合物　シスプラチン　オラパリブ

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９、CK－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

紫外線や化学物質で誘発される DNA 損傷は、ヌクレオチド除去修復（nucleotide excision repair; NER）機構で修復される。NER は大腸菌からヒトに至るすべての生物種に存在する普遍的な修復機構であり、2015 年ノーベル化学賞受賞に至ったように大腸菌や高等動物においてその基本反応が明らかにされている。ヒトでは、DNA 損傷の認識から切断（DNA 損傷の除去）に至る過程に XPC-RAD23B-CETN2、TFIIH、XPA、RPA、ERCC1-XPF、XPG の６つのコンポーネント（20 種のポリペプチド）が必須であり(Mu et al., 1995)、DNA ポリメラーゼ等による修復合成過程が続いて完結する(Aboussekhra et al., 1995)。

一方で、ヒトを含む高等動物における細胞内の NER 反応は非常に複雑であり、クロマチンリモデラー、ヒストン修飾、修復関連因子のリン酸化・ユビキチン化・SUMO 化・ポリ ADP リボシル化等の翻訳後修飾や量的調節、プロテアソーム系や分子シャペロンの関与など、様々なレベルの調節因子・反応が報告されている。また、DNA 損傷周辺では複製や転写等も起きており、これらの機構とのクロストークも重要な課題であるが、いずれも現時点では断片的な知見が多く、その一端を見ているに過ぎない状況にある。

最近、我々はケミカルバイオロジーを利用したアプローチでヒト細胞内 NER 反応の解明に取り組み、公的な化合物ライブラリーから NER 阻害活性を有する物質を探索・同定し、その細胞内ターゲットを特定して未知の修復関連因子を明らかにすることを目指している。これまでに、理化学研究所の天然化合物ライブラリー（NPDepo）、東京大学・創薬オープンイノベーションセンター（OCDD、現・創薬機構）のコアライブラリー、金沢大学がん進展制御研究所のキナーゼ／ホスファターゼ阻害剤ライブラリーのスクリーニングを行い、確認中のものも含めて７種類の NER 阻害剤を得た（H25～27 基盤研究(B)の成果）。また他のグループから、アルドステロン拮抗性のカリウム保持利尿薬であるスピロノラクトンが TFIIH のサブユニットである XPB をプロテアソーム依存的に分解誘導し、NER を阻害することが報告された(Alekseev et al., 2014)。これらの NER 阻害剤の作用機序の解明は、ヒト細胞中の NER 反応の解明に寄与すると考えられる。

一方、DNA 損傷に働く DDR（DNA damage response）経路の阻害剤は、癌の分子標的治療薬、あるいは DNA 傷害性抗癌剤の補助薬として今日注目されている。代表例として、DNA の一本鎖切断等に応答して生じるポリ ADP リボース化を触媒する PARP1/2 の阻害剤オラパリブがあり、BRCA1/2 を欠損（DNA 二重鎖切断の相同組換え修復経路を欠損）している乳癌の治療薬として認可されている。その他にも多くの DDR 阻害剤が現在臨床試験中であり、我々が見出した NER 阻害剤も癌治療に応用できる可能性を秘めており、検討する必要がある。

２．研究の目的

本研究では、これまでに得られた NER 阻害化合物の作用機序を解明し、その知見から細胞内における NER 反応の制御機構の解明に寄与することを第一の目的とした。また、これらの化合物は、シスプラチン等の DNA 傷害性抗癌剤の作用増強剤になると考えられ、予備実験でポジティブな結果も得ていることから、この可能性を追究するとともに、近年注目されている合成致死戦略に基づく癌治療への応用についても同時に検討することを第二の目的とした。

３．研究の方法

申請後の解析から、確認中だった OCDD 由来候補化合物について、メカニズム解析に耐えうる十分な NER 阻害活性を持たないことが判明したため断念し、新たに本学がん進展制御研究所の天然化合物ライブラリーの提供を受け、従来と同様に、我々が開発した M-CINUP (Nishinaga et al., 2012)を用いてスクリーニングを行った。

以前に同定した、NER 因子を分解誘導して NER を阻害するタイプの化合物の作用機序解析には、広島大学原爆放射線医科学研究所との共同研究のもと siRNA ライブラリーを利用してこの反応に関与するユビキチン E3 リガーゼの同定を突破口とした。また、新しく同定した、それ以外のタイプの NER 阻害化合物については、化合物結合ビーズを用いて単離したタンパク質の同定、ならびに化合物処理後の NER 因子の翻訳後修飾の同定を MS 解析を利用して試みた。

A6 の癌治療への応用については、インビトロ試験として LDH アッセイとコロニー形成法を、インビボ試験としてマウス肺癌細胞 LLC のマウス移植系を用いて評価した。

４．研究成果

（１）NER 因子を分解誘導する低分子化合物の作用メカニズムの解析

我々が見出した ERCC1 を分解誘導する化合物 A6 と、文献で報告のある TFIIH 複合体の XPB サブユニットを分解誘導するスピロノラクトン（SP）について、siRNA ライブラリーによるスクリーニングを行ったところ、ユビキチン E3 リガーゼである SCF 複合体の F-box タンパク質がヒットした（前者は未発表のため以後「X」と表記、後者は FBXL18）。SCF 複合体の阻害剤 MLN4924 の処理や Cul1 のノックダウンによっても分解誘導が抑制されること、再構成された各 SCF 複合体が標的 NER 因子をポリユビキチン化することが確認できたことから、各低分子化合物が誘導する分解反応に SCF^{X} と SCF^{FBXL18} が各々関与することを明らかにした。

また、キナーゼ阻害剤ライブラリーを用いた解析から、両分解誘導反応には特定のプロテインキナーゼが関与する可能性が示唆され、実際に SP による XPB 分解誘導経路では、TFIIH 複合

体に含まれる CDK7 サブユニットが関わることを明らかにした。さらに、XPB の Ser90 をアラニンに置換した変異体は SP 誘導分解に抵抗性を示すことから、この部位が CDK7 の標的である可能性が示唆された。これらの成果は、2019 年に Genes to Cells に発表された(Ueda et al., 2019)。

以上の結果より、２種類の化合物で誘導される異なる NER 因子の分解反応が非常に類似した因子とステップで進行することがわかった。

（２）A6 の癌治療への応用の検討

LDH アッセイを用いて、様々な DNA 傷害性抗がん剤と A6 との併用効果を調べたところ、シスプラチンとの併用が最も高い増感を示すことがわかった。また、マウス肺癌細胞 LLC を移植したインビボ実験系でもシスプラチンの抗腫瘍作用を A6 が有意に増強することを明らかにした。

一方、A6 と他の DDR 因子阻害剤との併用によりがん細胞に合成致死を引き起こす可能性を検討し、２種類の DDR 因子阻害剤が該当することを見つけた。そのうちの一つは PARP 阻害剤のオラパリブであり、ゲノム編集を用いて PARP1 ノックアウト HCT116 細胞を作製して A6 に対する感受性を親細胞と比較したが、顕著な高感受性を示さなかったことから、PARP 活性の阻害と ERCC1 の減少が相乗効果に必要であることが示唆された。

また、A6 の各種構造類縁体を用いて定量的構造活性相関解析を実施し、その知見からデザイン・合成した構造類縁体は A6 よりも ERCC1 分解誘導活性が 10 倍以上高いことがわかり、高活性体の創製に成功した。

（３）新規 NER 阻害物質の探索と解析

本学がん進展制御研究所の天然化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、NER 阻害活性を有する２種の化合物を新たに同定した（特願 2019-54753)。これまでのメカニズム解析から、いずれの化合物処理も DNA 損傷認識因子（DDB や XPC 複合体）のリクルートには影響を与えないものの、その後の TFIIH 複合体のリクルートが起きていないことがわかった。また、化合物処理後、DNA 損傷認識因子に高度な翻訳後修飾が生じている可能性が示唆され、NER の初期ステップへの作用と推測して詳細なメカニズムの解析を進めている。

＜引用文献＞

① Mu, D., Park, C.-H, Matsunaga, T., Hsu, D.S., Reardon, J.T. and Sancar, A. (1995). Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system., J. Biol. Chem. 270, 2415-2418.

② Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protić, M., Hübscher, U., Egly, J.M. and Wood, R.D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components., Cell 24, 859-868.

③ Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.M., Larsen, A.K. and Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum., Chem. Biol. 20, 398-407.

④ Nishinaga, M., Kurata, R., Onishi, K., Kuriyama, K., Wakasugi, M. and Matsunaga, T. (2012). Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells., Photochem. Photobiol. 88, 356-362.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

① Ueda, M., Matsuura, K., Kawai, H., Wakasugi, M. and Matsunaga, T. (2019). Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF^{FBXL18} E3 ligase., Genes Cells, *58*, 2378-2389.（査読有）DOI: 10.1111/gtc.12674

② Tsuda, M., Ogawa, S., Ooka, M., Kobayashi, K., Hirota, K., Wakasugi, M., Matsunaga, T., Sakuma, T., Yamamoto, T., Chikuma, S., Sasanuma, H., Debatisse, M., Doherty, A. J., Fuchs, R. P. and Takeda, S. (2019). PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching., PLoS One, *14 (3),* e0213383.（査読有）DOI: 10.1371/journal.pone.0213383

③ Inagaki, F., Momose, M., Maruyama, N., Matsuura, K., Matsunaga, T. and Mukai, C. (2018). Activation of disulfide bond cleavage triggered by hydrophobization and lipophilization of functionalized dihydroasparagusic acid., Org. Biomol. Chem., 16, 4320-4324.（査読有）DOI: 10.1039/c8ob01055b

④ Sakasai, R., Isono, M., Wakasugi, M., Hashimoto, M., Sunatani, Y., Matsui, T., Shibata, A., Matsunaga, T. and Iwabuchi, K. (2017). Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair., Sci. Rep., *7 (1),* 13808.（査読有）DOI: 10.1038/s41598-017-13695-4

⑤ Mishima, T., Fukaya, S., Toda, S., Ando, Y., Matsunaga, T. and Inobe, M. (2017). Rapid G0/1 transition and cell cycle progression in $CD8^+$ T Cells compared to $CD4^+$ T Cells

following in vitro stimulation., Microbiol. Immunol., *61*, 168-175.（査読有）DOI: 10.1111/1348-0421.12479

〔学会発表〕（計 14 件）

① 福本　唯、宮崎由里圭、上田将信、松浦顕教、若杉光生、松永　司：ヌクレオチド除去修復阻害活性を有する低分子化合物の同定、日本薬学会第 139 回年会、平成 31 年 3 月 21 - 23 日、幕張メッセ（千葉）

② 松永　司：ERCC1-XPF を標的とした DNA 修復阻害剤の作用メカニズムと癌治療への応用、日本薬学会第 138 回年会・シンポジウム「DNA 損傷（応答）研究最前線–創薬・治療戦略の可能性を探る–」、平成 30 年 3 月 26 - 28 日、石川県立音楽堂（金沢）

③ 赤堀　稜、高森千枝、小田桐周平、若杉光生、松永　司：XPF-ERCC1 ヘテロダイマーの細胞内局在性を決定する要因の解析、日本薬学会第 138 回年会、平成 30 年 3 月 26 - 28 日、ホテル金沢（金沢）

④ 上田将信、小田桐周平、西永真理、若杉光生、松永　司：低分子化合物による NER 因子分解誘導のメカニズム解析、日本薬学会第 138 回年会、平成 30 年 3 月 26 - 28 日、ホテル金沢（金沢）

⑤ 若杉光生、田中秀樹、宮口裕子、石井利実、松永　司：休止期細胞で生じる NER ギャップ中間体の Exo1 によるプロセッシング、第 40 回日本分子生物学会年会（2017 年度生命科学系学会合同年次大会）、平成 29 年 12 月 6 - 9 日、神戸国際展示場（神戸）

⑥ 若杉光生、田中秀樹、宮口裕子、石井利実、松永　司：休止期の NER 依存的な DNA 損傷応答における Exo1 の関与、日本放射線影響学会第 60 回大会、平成 29 年 10 月 25 - 28 日、京葉銀行文化プラザ（千葉）

⑦ 上田将信、小田桐周平、西永真理、若杉光生、松永　司：低分子化合物で誘導される NER 因子分解反応のメカニズム解析、第 16 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2017（日本薬学会・生物系薬学部会主催）、平成 29 年 9 月 9 - 10 日、北海道大学（札幌）

⑧ 田中秀樹、石井利実、若杉光生、松永　司： NER 依存的な二次的 DNA 損傷生成における EXO1 の関与の検討、日本薬学会第 137 回年会、平成 29 年 3 月 25 - 27 日、東北大学（仙台）

⑨ 上田将信、大澤琢郎、小田桐周平、福島直紀、西永真理、若杉光生、松永　司：DNA 修復因子の細胞内安定性を制御する機構の解析、日本薬学会第 137 回年会、平成 29 年 3 月 25 - 27 日、東北大学（仙台）

⑩ 松永　司：DNA 修復因子を不安定化する低分子化合物の作用機序とその応用、日本環境変異原学会第 46 回大会・シンポジウム「DNA 損傷による変異とその防御」、平成 29 年 11 月 6 - 7 日、一橋大学一橋講堂（東京）

⑪ 松永　司:新しい紫外線 DNA 損傷解析系とケミカルバイオロジーを利用したヌクレオチド除去修復研究、日本放射線影響学会第 59 回大会・ワークショップ「UV 損傷モノクローナル抗体 25 年：紫外線生物影響研究の今昔」、平成 28 年 10 月 26 - 28 日、JMS アステールプラザ（広島）

⑫ 堀田侑希、若杉光生、善岡克次、田中亀代次、松永　司：マウス皮膚におけるヌクレオチド除去修復に依存した二次的 DNA 損傷の生成と応答反応、日本放射線影響学会第 59 回大会、平成 28 年 10 月 26 - 28 日、JMS アステールプラザ（広島）

⑬ 岩崎真波、須田愛子、本田愛美、若杉光生、松永　司：ヌクレオチド除去修復欠損細胞で見られる紫外線誘発 DNA 損傷の消失、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 - 12 月 2 日、パシフィコ横浜（横浜）

⑭ 小田桐周平、三島観知、若杉光生、上田将信、川原弘明、西永真理、河合秀彦、長田裕之、松永　司：NER 阻害化合物 A6 の ERCC1-XPF 分解誘導メカニズムの解析、第 39 回日本分子生物学会年会、平成 28 年 11 月 30 - 12 月 2 日、パシフィコ横浜（横浜）

〔図書〕（計 1 件）

① 日本光生物学協会 光と生命の事典編集委員会 編（2016）光と生命の事典、朝倉書店

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ヌクレオチド除去修復阻害剤、それを含有する腫瘍治療の増強剤及び抗腫瘍剤
発明者：松永　司、宮崎由里圭、福本　唯
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：特願 2019-54753
出願年：2019 年 3 月 22 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猪部　学
ローマ字氏名：（INOBE, Manabu）
所属研究機関名：金沢大学
部局名：薬学系
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：10312414

研究分担者氏名：若杉 光生
ローマ字氏名：（WAKASUGI, Mitsuo）
所属研究機関名：金沢大学
部局名：薬学系
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：80345595

研究分担者氏名：後藤 享子
ローマ字氏名：（GOTO, Kyoko）
所属研究機関名：金沢大学
部局名：薬学系
職名：准教授
研究者番号（8 桁）：70634179

※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。