

令和元年5月16日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09287

研究課題名(和文) DNA修復機構を標的とした新規消化器癌治療の開発

研究課題名(英文) The utility of cancer therapy targeting DNA damage repair system against gastrointestinal cancer

研究代表者

久保田 英嗣 (KUBOTA, EIJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30405188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNA修復機構の重要な因子であるATMおよびATRを標的とした消化管癌に対する新規治療の有用性について検討を行った。ATMおよびATRの下流因子であるChk1の阻害は単独で抗腫瘍効果を示すこと、既存の抗腫瘍薬であるL-OHPの効果を増強させることを明らかとした。またATM阻害剤およびChk1阻害剤の併用は相乗的な抗腫瘍効果を示し、in vivoの検討から、これらのDNA修復機構を標的とした薬剤により腫瘍免疫が誘導される可能性が示された。今回の検討では、DNA修復機構を標的とした薬剤のバイオマーカーとしてKRASやBRAFの遺伝子変異が有用であるかについては明らかとされなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、DNA修復機構を標的とした新規抗腫瘍薬が消化管癌に対して有効であることを示した。またDNA修復機構を標的とした薬剤が、単独での抗腫瘍効果だけでなく既存の抗がん剤に対する増感作用を有することや、最近注目されている腫瘍免疫の誘導作用をも有することを明らかとした。本研究でえられた知見は、消化管癌に対する新規治療薬の開発に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the usefulness of novel therapies for gastrointestinal cancers targeting ATM and ATR, which play crucial role in DNA repair mechanisms. We found that inhibition of ATM and Chk1, a downstream factor of ATR, alone had antitumor effects and enhanced the effects of L-OHP, a conventional antitumor drug. Combinations of ATM and Chk1 inhibitors showed synergistic antitumor effects, and in vivo studies have shown that drugs that target these DNA repair mechanisms may induce tumor immunity. In this study, the usefulness of KRAS and BRAF gene mutations as biomarkers for anticancer drugs targeting DNA repair mechanisms was not clear.

研究分野：消化器病

キーワード：DNA修復機構 消化管癌

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

1. 研究開始当初の背景

DNA 修復機構に関連した因子は DNA 損傷に应答し DNA 修復、細胞周期制御、アポトーシスなどの誘導を介し発がんに対し抑制的に作用しているが、ひとたび癌が形成されると、癌の進展や治療への抵抗性を促進することが報告されている。これまでに申請者らは、DNA 障害型の抗腫瘍薬に対する抵抗性獲得の要因として DNA 修復遺伝子の発現が関与していることを明らかとし報告してきた (*BMC Cancer, 2013*)。さらに DNA 修復機構を標的とした薬剤が、CPT-11 や CDDP などの DNA 障害誘導型の抗癌剤や放射線照射などに対する増感作用を有することを確認している (*Cell Cycle, 2014*)。また、DNA 修復機構に関連した遺伝子の変異や、*KRAS* や *BRAF* など細胞増殖シグナルに関連した遺伝子の変異を伴う癌では、常に DNA 損傷が誘導されており、その生存が DNA 修復に関連した遺伝子に依存的であるため、DNA 修復機能の阻害により選択性の高い殺細胞効果、いわゆる合成致死が誘導されることが予測される。さらに最近注目されている腫瘍免疫においても、DNA 修復機構は細胞内 DNA センサーの活性化を介した腫瘍免疫誘導と関連していることが報告されている。以上の背景から DNA 修復機構を標的とした治療は、新たながん治療として有用であると推察される。

2. 研究の目的

本研究は、消化管癌への DNA 修復機構を標的とした新規治療の臨床応用に向けた研究を行うことを目的として立案した。研究対象とした DNA 損傷修復因子は、これまで研究をすすめてきた Ataxia telangiectasia (ATM) および Ataxia telangiectasia and RAD3-related (ATR) に焦点を絞り、これらの DNA 損傷修復因子の阻害によりもたらされると予測される、化学療法の増感作用、合成致死の誘導、腫瘍免疫誘導の点から研究を行った。ATR は主に一重鎖 DNA 損傷の修復機能を有するが、同時に ATM と協調、一部の機能はオーバーラップし DNA 損傷修復に重要な役割を果たしている。本研究では ATR 阻害については、すでに開発され臨床研究に使用されている ATR の下流シグナル因子である Chk1 の阻害剤を用いて、ATR 阻害の有効性を評価した。

3. 研究の方法

本研究では、消化管癌における DNA 修復機構、なかでも ATM、ATR を標的とした治療の有効性、作用メカニズムについて解析した。

ATM 阻害、Chk1 阻害による抗腫瘍薬増感作用の解析

ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤による既存の化学療法の増強作用についてヒト大腸癌細胞株、マウス腫瘍移植モデルを用いて検討した。DNA 障害を誘導する抗腫瘍薬 L-OHP を各細胞株に投与し、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイを用い、抗腫瘍効果について評価した。次に抗腫瘍薬と ATM 阻害剤 (KU-559403, KU-60019) もしくは Chk1 阻害剤 (LY2606268) を併用投与し、抗腫瘍効果を評価し、ATM、Chk1 阻害剤による抗腫瘍薬への感受性増感作用を解析した。細胞実験で増感作用が確認された薬剤については、マウス腫瘍移植モデルを用いた検討も行った。免疫不全マウスの皮下に細胞株を移植し、抗腫瘍薬単独もしくは ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤と併用で投与し、経時的に腫瘍の大きさを測定し、阻害剤による抗腫瘍薬への増感作用について評価した。

ATM 阻害、Chk1 阻害による合成致死誘導の解析

大腸癌細胞株を用い、DNA 障害の誘因となる活性酸素種、Reactive Oxygen species (ROS) の定常状態における活性を、細胞透過性プローブ DCFH-DA および H₂O₂ アッセイにより評価した。さらに γ H2AX 抗体、リン酸化 ATM 抗体、リン酸化 ATM 抗体による蛍光免疫染色を用い、DNA 損傷、ATM、ATR 活性について評価した。ATM 阻害剤もしくは Chk1 阻害剤単独での殺細胞効果を評価し、DNA 障害ストレス強度と薬剤効果の相関について解析した。大腸癌の治療薬選択の指標である *KRAS* や、予後予測因子の *BRAF* の遺伝子変異を有する大腸癌細胞への ATM 阻害

剤もしくは Chk1 阻害剤による合成致死の誘導について検討した。

ATM 阻害、Chk1 阻害による腫瘍免疫賦活化作用の解析

大腸癌細胞株を用いた実験により、ATM 阻害による細胞内 DNA センサーを介した I 型 INF 産生による腫瘍免疫の誘導について検証した。ATM 発現大腸癌細胞に抗腫瘍薬 L-OHP を単独もしくは ATM 阻害剤と併用で投与し、薬剤により刺激した細胞から細胞質成分を抽出、アガロースゲル電気泳動法により細胞質内の DNA 断片を測定し、ATM 阻害による細胞質内への DNA 断片の蓄積を評価した。また大腸癌細胞株に L-OHP 単独もしくは ATM 阻害剤と併用で投与し、培養液中の INF- β mRNA を定量 PCR により計測した。ATM 阻害による腫瘍免疫誘導についてマウス同種移植モデルを用いて検討した。免疫不全のない BALB/c マウスにマウス大腸癌細胞株 CT26 を皮下移植した。L-OHP を単独もしくは ATM 阻害剤もしくは Chk1 阻害剤と併用でマウスに投与し、経時的に腫瘍径を計測し、薬剤の併用効果について検討した。同時にマウスから採血し、ELISA 法により血中 INF- β 濃度についても経時的に測定した。薬剤投与した担癌マウスから腫瘍を核出し、腫瘍組織の単細胞懸濁液を調整し、各種マーカーを用い、フローサイトメトリーにより腫瘍に浸潤した免疫細胞のフェノタイプを解析した。

4. 研究成果

ヒト大腸癌細胞 HCT-116 を用いて、ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤の抗腫瘍効果を検討した。ATM 阻害剤としては、KU-55933、より ATM 選択性の強い KU-60019 を使用し、Chk 1 阻害剤としては、LY2606268 を使用した。ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤はともに単独で濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。また ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤はともに L-OHP との併用により、その抗腫瘍効果を増強させた。さらに ATM knockdown HCT-116 細胞では、Chk1 阻害剤に対する抗腫瘍効果が増強され、Chk1 の感受性に ATM 発現が関与している可能性が示された。マウス腫瘍移植モデルを用いた検討でも、同様の結果が得られた。大腸癌細胞株における *KRAS* や *BRAF* の遺伝子変異と ATM 阻害剤、Chk1 阻害剤に対する薬剤感受性については、明らかな相関は認められなかった。

次にマウス大腸癌細胞株 CT26 を用いて同様の検討を行った。In vitro の検討では、DNA 修復阻害剤の単独および併用効果について検討した。CT26 に対し L-OHP 単独および ATM 阻害剤、または Chk 1 阻害剤との併用を、さらに ATM 阻害剤、Chk 1 阻害剤の併用投与による腫瘍細胞の増殖抑制効果を検討した。ATM 阻害剤、Chk 1 阻害剤はともに L-OHP の殺細胞効果を増強した。さらに ATM 阻害剤、KU-55933 と Chk1 阻害剤、LY2606268 の併用では相乗的な抗腫瘍効果は認められなかったが、ATM 選択性の高い ATM 阻害剤、KU-60019 と LY2606268 との併用では相乗的な抗腫瘍効果が認められた。また抗酸化能の測定では、KU-60019 と LY2606268 との併用により腫瘍細胞の ROS 活性が誘導され、カスパーゼアッセイでは、強力なアポトーシスが誘導されていることを確認した。In vitro の実験で得られた結果から ATM 阻害剤、KU-60019 と Chk 1 阻害剤、LY2606268 との併用が強力な抗腫瘍効果をもたらす可能性が高いと判断し、in vivo での検討を行った。In vivo の検討では、腫瘍免疫についても検討するため、マウス大腸がん細胞株、CT26 を用いた同種移植大腸癌モデルマウスを作製して実験を行った。薬剤を担癌マウスの腹腔内に投与し抗腫瘍効果および腫瘍免疫の誘導について検証した。抗腫瘍効果は経時的な腫瘍径の計測および、腫瘍の免疫染色により評価した。また腫瘍免疫の誘導については、抗腫瘍薬投与後の担癌マウスから摘出した腫瘍から単細胞懸濁液を調整し、CD3, CD4, CD8, CD11b, CD25, Gr-1, FoxP3 などなどの各免疫細胞の表面マーカーで染色し、FACS により免疫細胞のプロファイリングを行った。In vivo の検討では、ATM 阻害剤、KU-60019 と Chk 1 阻害剤、LY2606268 の併用による優れた抗腫瘍効果が認められ、腫瘍免疫の検討では、両薬剤の投与により、癌微小環境において、細胞傷害性 T 細胞の集積が誘導されること、すなわち両薬剤の併

用により腫瘍免疫が賦活化されることが示された。またマウス血漿中の INF- β 濃度が薬剤投与により上昇していることから、両薬剤の併用が腫瘍免疫活性をもたらしている可能性が示された。以上から、ATM および Chk1 の阻害により強力な抗腫瘍効果をもたらされること、また腫瘍免疫が誘導される可能性が示された。一方、今回の検討では、DNA 修復機構の阻害剤が *KRAS* や *BRAF* の遺伝子変異をもつ大腸癌に対して優れた有効性をもつことは示されなかった。

DNA 修復機構を標的としたがん治療薬は、これまでに臨床実用化された薬剤としては PARP 阻害剤のみで、その殆どが開発段階にある。また、その作用機序や効果判定バイオマーカー、がん免疫療法への有効性などについては不明な点が多く残されている。本研究では、これらの明らかとされていない課題の解明に取り組み、いくつかの新たな知見を得ることができた。本研究の成果は、DNA 修復機構を標的とした新規がん治療、特に消化管癌への治療薬開発に貢献しうるものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

久保田英嗣, 片岡洋望, 城卓志, ATM をバイオマーカーとした胃癌に対する PARP 阻害剤の有効性の検討, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年 4 月 21 日, 京王プラザホテル (東京都, 新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 片岡 洋望

ローマ字氏名: KATAOKA hiromi

所属研究機関名: 名古屋市立大学

部局名: 大学院医学研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 40381785

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。