

令和元年6月14日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18964

研究課題名(和文) PARP阻害剤を用いた食道癌セカンドライン化学療法の構築に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Establishment of the second line chemotherapy for esophageal cancer using poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors

研究代表者

峯垣 哲也 (Minegaki, Tetsuya)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10549306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道癌化学療法へのPoly (ADP-ribose) polymerase (PARP)阻害剤の有効性を明らかにすることを目的としている。本研究では、食道癌細胞株の抗癌剤感受性がPARP阻害剤であるオラパリブによって相乗的に増強すること、またその増強作用は特にDNAを損傷させる抗癌剤で認められることを明らかにした。さらに、オラパリブによる抗癌剤の感受性増強作用は、p53結合タンパク質1 (53BP1) が関連したシグナルを介していることも明らかとなった。本研究成果は、食道癌セカンドライン化学療法を構築する上で有益な情報を提供できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、食道癌化学療法においてオラパリブのようなPARP阻害剤が有用であること、また特に癌細胞のDNAを損傷させる抗癌剤と併用することで相乗的な抗腫瘍効果を得ることができる可能性が示唆された。本研究結果が、食道癌化学療法において薬剤選択の幅を広げるための一助となることが期待される。また、この成果により食道癌のみならず他の癌種への検討に繋がる学術的な波及効果も期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the efficacy of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in esophageal cancer chemotherapy. This study indicated that PARP inhibitors such as olaparib synergistically potentiates the sensitivity to anticancer drugs, especially DNA-damaging agents, in human esophageal cancer cell lines. In addition, the potentiation of sensitivity to anticancer drugs by olaparib was involved in cell signals related to p53-binding protein (53BP1).

研究分野：臨床薬学、医療薬剤学

キーワード：食道癌 PARP阻害剤 相乗効果 DNA損傷修復

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において食道癌の罹患率は男性で第7位、女性で第15位であり、肺癌や大腸癌等の主要なものと比較すると患者数は多くはないものの、5年相対生存率は約30%と他の癌と比較してもかなり低く、悪性度の高いものの一つとなっている[公益財団法人がん研究振興財団、がんの統計 2014]。食道癌に対する治療法として、一般的な固形癌の場合と同様、手術療法、放射線療法、抗癌剤治療などが用いられている。中でも、抗癌剤を用いた癌化学療法は、CDDP及び5-FUに放射線治療を併用したFP-RT療法や、CDDP、5-FUにドセタキセル(DOC)を併用したDCF療法などがファーストライン(一次療法)として用いられており、その奏効率は約30-70%と比較的高い。しかしながら、このような食道癌化学療法においても、その有効性が認められない時または進行・再発時などにおけるセカンドライン以降の薬剤選択が確立されていない。すなわち、食道癌化学療法には使用できる薬剤が極端に少ないという大きな問題点が存在する。したがって、食道癌治療における生存率のさらなる向上には、有効性の高いセカンドライン化学療法の確立が急務である。

2. 研究の目的

今回、食道癌治療に応用できる可能性がある薬剤として、新規分子標的薬 Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) 阻害剤に着目した。PARP 阻害剤は、DNA 損傷を修復する過程で重要な役割を担うタンパク質、PARP を阻害する薬剤である。現在、多くの PARP 阻害剤が、乳癌をはじめ様々な癌種における臨床試験で良好な成績を収めており、欧米においては、BRCA 遺伝子変異のある卵巣癌や乳癌に対して PARP 阻害剤であるオラパリブが承認された。また、本邦においても 2018 年に卵巣癌や BRCA 遺伝子変異のある乳癌に対して承認されている。

PARP 阻害剤は、DNA の損傷修復機構を阻害する薬物であるため、他の抗癌剤の作用を増強できることが考えられる。本研究は、PARP 阻害剤との併用により相乗的な抗腫瘍作用を示す抗癌剤とそのメカニズム解明することにより、食道癌化学療法において高い有効性を示す新規治療法の確立を目指すことを目的としている。

具体的には、ヒト食道癌細胞株を用い、PARP 阻害剤と併用することにより相乗効果を示す抗癌剤を明らかにする。また、明らかとなった相乗的な増殖抑制作用を示す薬物の組み合わせについて、その相乗的作用メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

細胞は、ヒト食道癌由来 KYSE70 及び KYSE140 細胞を用い、抗癌剤は 5-FU、CDDP、ドキシソルピシン(DOX)、ドセタキセル(DOC)、イリノテカンの活性代謝物である SN-38 及びテモゾロミド(TMZ)を用いた。また、PARP 阻害剤としてオラパリブを選択した。

薬物の食道癌細胞に対する細胞増殖抑制作用は、薬物処置後の細胞生存率を CellQuanti-Blue™ cell viability kit で計測すること並びにコロニー形成法により評価した。また、薬物による DNA 損傷は蛍光免疫染色法によりリン酸化ヒストン H2AX タンパク質(γH2AX)を検出することで評価した。具体的には、γH2AX に対する 1 次抗体を Alexa Fluor® 488 で標識した 2 次抗体で検出し、薬物処置後の細胞核内の Alexa Fluor® 488 の蛍光強度を測定した。細胞の抗癌剤感受性に及ぼす p53 結合タンパク質 1 (53BP1) の影響は、53BP1 を siRNA にてノックダウンした後の細胞増殖抑制作用を検討することで評価した。

4. 研究成果

1) PARP 阻害剤による抗癌剤感受性の増強

検討した 6 種類全ての抗癌剤は、KYSE70 及び KYSE140 細胞に対して濃度依存的な細胞増殖抑制作用を示した。PARP 阻害剤であるオラパリブは、CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ による細胞増殖抑制曲線を低濃度側にシフトさせたものの、5-FU 及び DOC の細胞増殖抑制作用への影響は軽微であった(図 1)。また、オラパリブと CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ の共存は、細胞のコロニー形成能を相乗的に減弱させた(図 2)。

以上の結果より、PARP 阻害剤は、ヒト食道癌細胞株において CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ のような薬物の感受性を増強させることが示唆された。

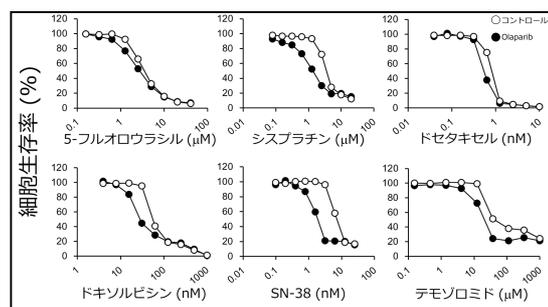


図 1. KYSE70 細胞の抗癌剤感受性に及ぼすオラパリブの影響

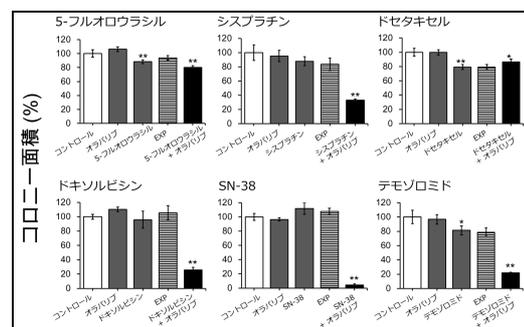


図 2. 抗癌剤のコロニー形成阻害活性に及ぼすオラパリブの影響

2) 抗癌剤による DNA 損傷に及ぼす PARP 阻害剤の影響

CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ は、濃度依存的に DNA 損傷の指標である γ H2AX の核内集積量を増大させた。一方で、5-FU 及び DOC による γ H2AX の集積は認められなかった。オラパリブは、CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ による γ H2AX の集積量を相加的に増大させた (図 3)。

以上の結果は、オラパリブによる CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ の細胞増殖抑制作用増強メカニズムに DNA の損傷増大が一部関与していることを示唆している。

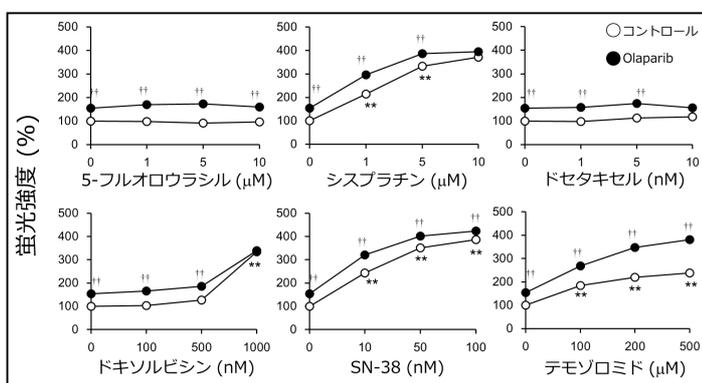


図 3. 抗癌剤による DNA 損傷に及ぼすオラパリブの影響

3) PARP 阻害剤と抗癌剤の相乗的な細胞増殖抑制作用に及ぼす DNA-PKcs 阻害剤の影響

PARP 阻害剤は、DNA 修復エラー頻度の高い修復機構である古典的非相同末端結合 (c-NHEJ) を亢進させることで細胞毒性を示すことが報告されている。そこで、c-NHEJ に中心的な因子である DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PKcs) の阻害剤 NU7441 がオラパリブによる抗癌剤の細胞増殖抑制作用増強に及ぼす影響を検討した。その結果、NU7441 は、DOX とオラパリブによる細胞増殖抑制作用をさらに増強させたものの、CDDP、SN-38 及び TMZ とオラパリブの細胞増殖抑制作用に影響を及ぼさなかった (図 4)。したがって、ヒト食道癌細胞株において PARP 阻害剤による抗癌剤の細胞増殖抑制作用増強メカニズムには、DNA 依存性プロテインキナーゼは関与しない可能性が示唆された。

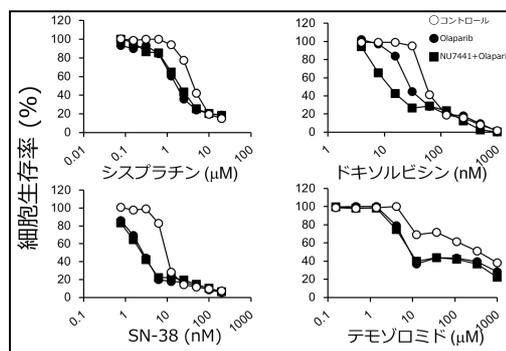


図 4. オラパリブによる抗癌剤感受性増強作用に及ぼす DNA-PKcs 阻害剤の影響

4) 53BP1 ノックダウンによる相乗的な細胞増殖抑制作用の消失

DNA 二重鎖損傷部位に集積する 53BP1 の発現を siRNA でノックダウンしたところ、オラパリブによる CDDP、DOX、SN-38 及び TMZ 感受性増強作用は消失した (図 5)。したがって、食道癌細胞株における PARP 阻害剤による抗癌剤感受性の増強は、53BP1 を介して生じていることが示唆された。

以上まとめると、PARP 阻害剤オラパリブは、ヒト食道癌細胞株において DNA を損傷させる抗癌剤の感受性を相乗的に増強させること、そのメカニズムとして、DNA-PKcs の活性には依存しないものの 53BP1 を介して抗癌剤感受性を増強させることが示唆された。今後は、食道癌に対するオラパリブの有用性を *in vivo* において検証することが必要であると考えられる。

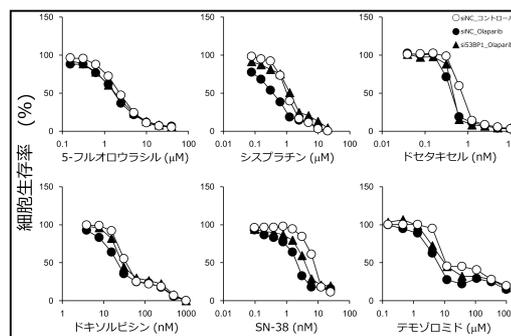


図 5. オラパリブによる抗癌剤感受性増強作用に及ぼす 53BP1 ノックダウンの影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) Keisuke Miyamoto, Tetsuya Minegaki, Mami Tanahashi, Ayaka Yamamoto, Yumi Moriyama, Akari Wada, Ayaka Matsumoto, Keisuke Ota, Mai Tanaka, Utako Masuda, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi: Synergistic Effects of Olaparib and DNA-damaging Agents in Oesophageal Squamous

Cell Carcinoma Cell Lines, *Anticancer Research*, **39**, 1813-1820 (2019). DOI: 10.21873/anticancer.13288.

〔学会発表〕(計3件)

- 1) Tetsuya Minegaki, Keisuke Miyamoto, Mami Tanahashi, Ayaka Yamamoto, Yu Araki, Megumi Inagaki, Eri Hayashi, Masayuki Tsujimoto, Kohshi Nishiguchi: The Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor, Olaparib, Potentiates the Cytotoxic Effects of Anti-Cancer Drugs in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition (Denver, Colorado, USA), 2016. 11.
- 2) 宮本恵輔、峯垣哲也、森山由美、和田明莉、松本彩夏、太田圭祐、田中麻衣、増田詩子、棚橋真実、山本彩佳、荒木 悠、稲垣恵未、林 絵里、辻本雅之、西口工司: ヒト食道癌細胞株におけるポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ阻害剤オラパリブの影響. 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会(神戸), 2017. 10.
- 3) 平野沙耶香、峯垣哲也、宮本恵輔、林逸佳、青山淑美、西野翔太、辻本雅之、西口工司: 53BP1の発現抑制は食道癌細胞株におけるPARP阻害剤と抗癌剤との相乗的な細胞毒性を減弱させる. 日本薬学会第139年会(千葉), 2019. 3.

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byouyaku/byouin-j.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

峯垣 哲也 (Minegaki Tetsuya)

京都薬科大学・臨床薬学分野・助教

研究者番号：10549306

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。