

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06172・19K21280

研究課題名（和文）シスプラチン耐性卵巣癌の新規治療標的分子TIE-1の機能解析

研究課題名（英文）The molecular mechanism of Tyrosine kinase receptor TIE-1 as the therapeutic target for ovarian cancer.

研究代表者

石橋 ますみ（ISHIBASHI, Masumi）

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20821383

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：先行研究では大規模siRNAスクリーニングにより卵巣癌治療のkey drugであるシスプラチンの感受性を高める分子としてチロシンキナーゼ受容体型蛋白であるTIE-1が抽出された。本研究ではその作用機序として、TIE-1が細胞のDNA損傷修復システムであるヌクレオチド除去修復機構を亢進させ、DNAに結合したシスプラチンを積極的に除去して抗腫瘍効果を減弱させていることが明らかとなり、TIE-1阻害とシスプラチンの併用が新たな治療戦略として示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科悪性腫瘍のなかで最も死亡率の高い卵巣癌に対する治療において、主に用いられる抗がん剤がシスプラチンであるが、その薬剤耐性が大きな課題であり、新規治療戦略の開発が必要とされている。本研究ではTIE-1阻害がシスプラチンの感受性を高め、新規治療標的となることが示された。TIE-1はこれまで血管内皮細胞の増殖に関与することが知られていたが、がん細胞における動態は明らかでなく、本研究は世界で初めてTIE-1ががん細胞において遺伝子修復に関与することを示したものである。また本研究の成果は今後の卵巣癌の予後の改善に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Platinum resistance is one of the most challenging problems in ovarian cancer treatment. High-throughput functional siRNA screening identified tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 (TIE-1) as a gene that confers cells resistant to cisplatin in my previous experiment. In this study, I deciphered the mechanisms that TIE-1 contributes to platinum sensitivity. TIE-1 up-regulates the nucleotide excision repair (NER) system mediated by xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC), thereby leading to decreased susceptibility to cisplatin-induced cell death without affecting cisplatin uptake and excretion. Therefore, TIE-1 is suggested to promote XPC-dependent NER, rendering ovarian cancer cells resistant to platinum. Accompanied with novel findings, TIE-1 could represent as a novel therapeutic target for platinum-resistant ovarian cancer.

研究分野：卵巣癌の新規治療標的や抗がん剤耐性について主に研究を行っている

キーワード：TIE-1 cisplatin chemo-resistance DNA repair

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科領域で最も予後の悪い疾患であり、全女性の死亡原因では5番目に多い。白金製剤とタキサン系薬剤の併用による化学療法は卵巣癌に有効であるが、多くの症例で治療後に耐性が生じ(Yap TA et al. *Nat Rev Cancer* 2009)、予後不良の原因とされる。シスプラチンは、DNA と架橋形成して DNA 複製を阻害、細胞分裂を阻害して アポトーシスへ誘導する(Fichtinger-Schepman AM, et al. *Cancer Res* 1987)。シスプラチンが DNA に結合した際、まず働く DNA 修復機構がヌクレオチド除去修復(Nucleotide Excision Repair,NER) であり、シスプラチン結合部位を含む 20-30 塩基が除去される。NER による DNA 修復が行われない場合、DNA の複製フォークが停止し DNA 二重鎖切断が起こり、二重鎖切断に対する修復機構である 遺伝子相同組換え(Homology Directed Repair, HDR)や非相同末端連結(Non- Homologous End Joining, NHEJ)が行われる(Shadia J, et al. *Clin Cancer Res* 2011)。この DNA 修復機構をはじめとした様々なシスプラチン耐性機序がこれまでに報告されてきた(Galluzi L, et al. *Oncogene* 2012)。卵巣癌患者の予後を改善するため、卵巣癌における新規治療標的の探索や抗癌剤耐性の克服は婦人科腫瘍領域で喫緊の課題であった。

### 2. 研究の目的

卵巣癌のシスプラチン耐性を克服する新たな治療標的となる分子を探索し、その作用機序を明らかにして新たな創薬基盤を創出すること。

### 3. 研究の方法

今回の研究において既に siRNA 大規模スクリーニングからシスプラチン感受性に関与する新規標的分子を同定している。その手法は 16550 遺伝子の siRNA ライブラリを用い、卵巣癌のシスプラチン耐性株 A2780CP 細胞で 6550 遺伝子をそれぞれノックダウンし、シスプラチン投与有無で細胞生存率を比較、シスプラチンによる細胞増殖抑制効果を増強する上位 30 遺伝子を候補として抽出。さらに一次スクリーニングとは異なる配列の siRNA を用い、30 遺伝子でシスプラチン投与前後の細胞生存率を比較し、最もシスプラチンの作用を高める遺伝子を同定するというものである。この手法で TIE-1 を同定した。

本研究では、以下の方法で研究を行なった。

- (1) TIE-1 が DNA 修復機構に関与する機序を解明する。
  - ・卵巣癌細胞に TIE-1 を強制発現またはノックダウンし、DNA 損傷修復に関連する分子の蛋白及び遺伝子発現を比較し、TIE-1 に発現が制御される分子を検索する。
  - ・DNA 損傷修復(核内)に関与する分子を TIE-1(細胞膜にのみ局在)が制御する機序として、転写因子が介在する可能性が考えられる。TIE-1 によって制御される DNA 損傷修復関連分子が同定された後は、その分子のプロモーター領域の配列に結合する転写因子を in silico (JASPAR データベースを使用)で推定し、クロマチン免疫沈降法で実際に転写因子が結合するか、さらにその転写因子の活性が TIE-1 に制御されるかを検討する。
- (2) TIE-1 依存的なシスプラチン耐性化の普遍性を検証する。

・シスプラチン感受性卵巣癌細胞株(A2780, PE01, IGROV1)と、それぞれに対応したシスプラチン耐性株(A2780CP, PE04, IGROVCP)を用い、TIE-1 の蛋白と mRNA 発現をそれぞれ計測し、シスプラチンの IC50 と相関するか検討する。

(3) 白金製剤耐性化における TIE-1 の臨床的意義を明らかにする。

・東北大学産婦人科で保管している卵巣癌の手術検体 50 症例(2007-2016 年の手術症例)で、癌組織における TIE-1 発現と臨床情報(抗癌剤耐性、予後)との関連を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) TIE-1 が DNA 修復機構に関与する機序

卵巣癌細胞において TIE-1 をノックダウンしシスプラチンに曝露すると、DNA 損傷のマーカーである H2AX の発現が増強し、TIE-1 が DNA 損傷修復に関与することが明らかとなった。DNA 損傷修復機構と TIE-1 の関連をさらに詳細に検討するため、シスプラチンが DNA に結合した際に起こる修復機構であるヌクレオチド除去修復(Nucleotide Excision Repair, NER)に関与する複数の蛋白の発現を確認したところ、TIE-1 阻害により NER に関与する蛋白である Xeroderma Pigmentosum C (XPC) の発現が抑制されていることが明らかになった。また TIE-1 を強制発現すると XPC 発現も増強した。以上より、TIE-1 が XPC 発現を調節して DNA 損傷修復に関与することが明らかとなった。さらに、in silico および既報の文献的考察から TIE-1 と XPC を介在する転写因子として Krüppel-like factor 5 (KLF-5) を推定した。TIE-1 抑制により KLF-5 細胞内局在の変化が確認され、またクロマチン免疫沈降法により TIE-1 が KLF-5 へ作用することも明らかとなった。

(2) TIE-1 依存的なシスプラチン耐性化の普遍性を検証する。

シスプラチン感受性卵巣癌細胞株(A2780, PE01, IGROV1)と、それぞれに対応したシスプラチン耐性株(A2780CP, PE04, IGROVCP)を用い、TIE-1 の蛋白と mRNA 発現をそれぞれ計測したところ、いずれの細胞株ペアでもシスプラチン耐性株において TIE-1 発現が高いことが明らかとなった。

(3) 白金製剤耐性化における TIE-1 の臨床的意義を明らかにする。

東北大学病院で手術を行った卵巣癌患者の癌組織において TIE-1 蛋白の発現を組織化学染色で確認したところ、同一患者の組織で TIE-1 発現の高い癌細胞と低い癌細胞が混在していることが明らかとなった。癌組織全体における TIE-1 高発現細胞の割合を比較したところ、抗がん剤感受性症例の癌組織において TIE-1 高発現癌細胞の割合が 23%であったのに対し、抗がん剤耐性症例では 59%と優位に高かった。これは TIE-1 が抗がん剤耐性に関与することを臨床的に示す結果であった。

本研究で、TIE-1 が卵巣癌の新たな治療標的となる可能性およびシスプラチン耐性の有無を予測するバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi Masumi, Toyoshima Masafumi, Zhang Xuwei, Hasegawa-Minato Junko, Shigeta Shogo, Usui Toshinori, Kemp Christopher J., Grandori Carla, Kitatani Kazuyuki, Yaegashi Nobuo	4. 巻 8
2. 論文標題 Tyrosine kinase receptor TIE-1 mediates platinum resistance by promoting nucleotide excision repair in ovarian cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1038/s41598-018-31069-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----