

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04333

研究課題名(和文) DNA修復を標的とした合成致死療法における獲得耐性克服に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Development of novel cancer treatment to overcome acquired resistance mechanisms in synthetic lethal therapy targeting DNA repair

研究代表者

砂田 成章 (Sunada, Shigeaki)

順天堂大学・健康総合科学先端研究機構・特任助教

研究者番号：70807677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん化学療法において多様に見出される薬剤耐性獲得を克服する治療法の開発基盤構築を目指し、化合物併用により相乗的抗腫瘍効果を示す併用法の探索を遂行した。細胞増殖性及びDNA損傷性を指標としたスクリーニング解析を実施した結果、PARP阻害剤に対する併用化合物候補としてTioxolone(TIO)、Etoposide(ETP)に対する併用化合物候補としてMedroxyprogesterone Acetate(MPA)を同定した。両併用法は、DNA二本鎖切断(DSB)の修復に依存しない経路により相乗的抗腫瘍効果を示し、従来の併用法とは異なる戦略による新規併用治療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷を指標とした化合物スクリーニングは、化合物の多様性や標的を絞り込まない点で、未知のDNA損傷修復制御因子の探索に貢献し得る。例として、本研究で見出したETPとMPA併用による相乗効果の作用機序は、従来の機能ゲノミクススクリーニングでは見出すことが困難な現象であり、新たな戦略による治療法開発の展開が期待される。当該研究基盤をもとに探索研究を推し進めることで、多様かつ革新的なDNA損傷修復制御因子の発見が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to develop treatments to overcome the diverse mechanisms of acquired resistance found in cancer chemotherapy, we have explored the combination methods of compounds that exhibit synergistic anti-tumor effects. Our screening analysis based on cell proliferation and DNA damage formation identified Tioxolone (TIO) as a combination candidate for PARP inhibitors and Medroxyprogesterone Acetate (MPA) as a combination candidate for etoposide, respectively. Both combination methods caused synergistic anti-tumor effects through a pathway independent of DNA double-strand break (DSB) repair, and are expected to lead to the development of novel combination therapies that differ from conventional methods.

研究分野：DNA損傷修復、腫瘍生物学、創薬科学

キーワード：化合物スクリーニング DNA二本鎖切断 化合物併用 相乗的抗腫瘍効果 トポイソメラーゼII阻害剤 ステロイド PARP阻害剤 Tioxolone

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんの進行や治療に伴うゲノムの可塑性やがん細胞の進化が、腫瘍内に治療を困難にする不均一な細胞集団を生み出す。これこそ、がんが治療抵抗性を獲得する原因であり、臨床上の憂慮すべき問題である。BRCA1・BRCA2等のDNA相同組換え(homologous recombination; HR)修復関連遺伝子の生殖細胞系列変異は、遺伝性乳がん・卵巣がんを発生させる。一方、正常細胞と比べ、これらがん細胞は、DNA修復機能に異常を有している特徴から、PARP阻害剤をはじめとするDNA障害型抗がん剤に対して特異的な感受性を示す、いわゆる合成致死を利用した治療法の臨床開発が行われた。しかし、DNA障害型抗がん剤に対して当初は高い感受性を示していたBRCA変異腫瘍組織が、後に耐性を獲得し、再発、転移を引き起こす治療困難症例が多数報告されている。一部の耐性獲得がんに対しては、化合物併用により再度耐性経路を標的として抗がん剤の効果を増強させる臨床研究が報告された。しかし、その他多様に見出される耐性獲得機構に対する有効な治療法について報告はなく、耐性克服に向けた治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

本研究は、合成致死療法をはじめ、がん化学療法において見出される多様な耐性獲得機構を克服する治療法の開発基盤構築を目的に、以下の課題を遂行する。

- (1) DNA障害型抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させる新規併用化合物の探索
- (2) 併用化合物による相乗的抗腫瘍効果の作用機序の解析
- (3) in vivoにおける化合物併用法の相乗的抗腫瘍効果の検証

本研究を達成することで、臨床応用へ向けた新規薬剤併用法の基礎を構築するとともに、化学療法後に見られる多様な薬剤耐性機構を克服する戦略の提案を目指す。

3. 研究の方法

- (1) DNA障害型抗がん剤の抗腫瘍効果を増強させる新規併用化合物の探索

はじめに、細胞増殖性およびDNA損傷レベルを指標として、DNA障害型抗がん剤による抗腫瘍効果を相乗的に増強させる化合物を探索するハイスループットスクリーニング法を構築した。一段階目のスクリーニングでは、多様な化合物ライブラリーを対象に、PARP阻害剤(Talazoparib: TLZ)やトポイソメラーゼII(Top2)阻害剤(Etoposide: ETP)と併用することで、細胞増殖抑制効果(比色法, Neutral red uptake assay)を相乗的に増強させる化合物を探索した。さらに、二段階目のスクリーニングでは、フローサイトメトリー法によるDNA二本鎖切断(DSB)形成の定量解析(DSB形成試験)を利用した。DSBの検出は、H2AXを指標として用いた。併用によりDSB量を相乗的に増加させる化合物を探索し、詳細な解析対象の併用化合物候補を選定した。スクリーニングにおける培養細胞は、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞株を用いた。解析対象の化合物ライブラリーは、東京医科歯科大学・医療機能分子開発室保有の機能既知化合物及び、日本医療研究開発機構・創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(AMED BINDS)支援のもと、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを利用した。

- (2) 併用化合物による相乗的抗腫瘍効果の作用機序の解析

はじめに、複数の細胞株を用いて細胞増殖性試験及びDSB形成試験により、併用化合物候補による相乗的抗腫瘍効果を再確認した。さらに、細胞周期解析によりDSB形成時に頻りに観測されるG2/Mアレストの頻度を解析した。

その後、併用化合物が相乗的にDSB量を増加させる作用機序を調べた。レポーター遺伝子(DR-GFP, EJ5-GFP)を利用し、相同組換え(HR)や非相同末端結合(NHEJ)等の主要なDSB修復経路への影響を解析した。さらに、個々のDNA障害型抗がん剤の影響解析に適したアッセイ系を利用し、詳細な作用機序解明を目指した。

- (3) in vivoにおける化合物併用法の相乗的抗腫瘍効果の検証

相乗的抗腫瘍効果を示す化合物の組み合わせについて、in vivo腫瘍移植モデルを用いて検証した。はじめに、マウスに対する毒性試験により各化合物の投与量・方法を決定した。次に、免疫不全マウス(BALB/c-nu/nu)に腫瘍細胞を移植し、化合物を投与、体重及び腫瘍径を経時的に測定し、化合物併用による相乗効果を評価した。

4. 研究成果

- (1) 相乗的抗腫瘍効果を示す化合物併用法の同定

合計約12,000種類の低分子化合物を対象に、細胞増殖性及びDSB形成量を指標としたスクリーニングを実施し、DNA障害型抗がん剤との併用により相乗的抗腫瘍効果を示す複数の併用法を同定した。中でも特に相乗効果が高い併用の組み合わせとして、TLZと炭酸脱水酵素阻害剤Tioxolone(TIO)の併用法(図1)及び、ETPとステロイドの一種のMedroxyprogesterone Acetate(MPA)の併用法(図2)を選出し、その後の解析対象とした。さらに、当該スクリー

ニング解析の一環で、単剤処理により高い DNA 損傷性を示す複数のユニークな化合物を見出した。一部の化合物は解析を進め、トポイソメラーゼ II の特異的阻害剤候補 DDA-1 (Zhang D et al, *Cancer Sci* 2023) や、特定の標的分子 X の発現量依存的に抗腫瘍効果を示す新規化合物を同定した。これらは、文部科学省・学術変革領域研究・学術研究支援基盤形成・先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援活動の解析支援を受けた。

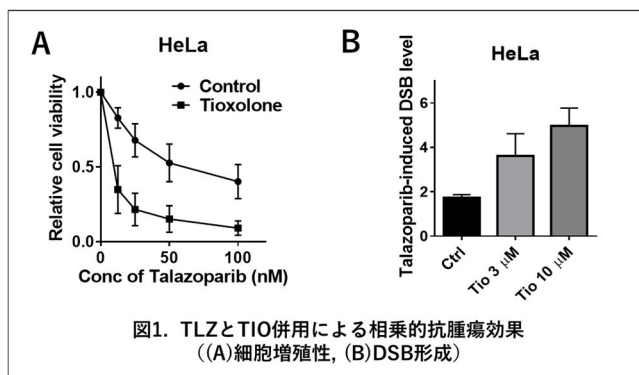


図1. TLZとTIO併用による相乗的抗腫瘍効果 (A)細胞増殖性, (B)DSB形成

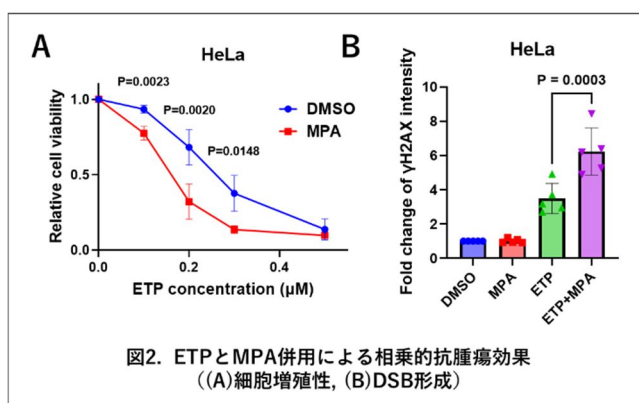


図2. ETPとMPA併用による相乗的抗腫瘍効果 (A)細胞増殖性, (B)DSB形成

(2) 化合物併用により相乗的に DSB 量が増加する作用機序の解明

TLZ と TIO の併用効果

多様な細胞株に対し、TLZ と TIO 併用による相乗的抗腫瘍効果を検証した結果、一部の細胞株でのみ当該効果が見られた。当該効果を示した全ての細胞株で相乗的な DSB 量の増加および G2/M アレストの亢進が見られた。一方で、TIO による HR 及び NHJE 修復能への影響を調べた結果、両 DSB 修復経路への影響は確認されなかった。すなわち、TIO は特定の細胞株において、DSB 修復に依存しない経路を標的として、TLZ 形成の DSB 量を増加させ、相乗的抗腫瘍効果を引き起こすことが示唆された。

さらに、相乗的な DSB 量の増加に関し、様々なタイプの DNA 障害型抗がん剤 (Etoposide, Camptothecin, Cisplatin 等) 及び種々 PARP 阻害剤 (Olaparib, Niraparib 等) と TIO との併用による DSB 形成量を解析した。その結果、TIO は PARP 阻害剤、特に PARP1 を DNA にトラップさせる (PARP trapping) タイプの阻害剤との併用時のみ、相乗的な DSB 量の増加及び抗腫瘍効果が見られた。以上の結果から、TIO は特異的な分子を標的として、PARP 阻害剤による PARP trapping を増強していると考えられた。

さらなる詳細な機構解明は今後の課題であるが、DNA 修復に依らない経路を標的として PARP 阻害剤の抗腫瘍効果を増強する新たな併用法の開発が今後期待される。

ETP と MPA の併用効果

多様な細胞株に対し、ETP と MPA 併用による相乗的抗腫瘍効果を検証した結果、検証した全ての細胞株で当該効果が見られた。これら全ての細胞株で相乗的な DSB 量の増加および G2/M アレストの亢進が見られた。一方で、MPA による HR 及び NHJE 修復能への影響を調べた結果、両 DSB 修復経路への影響は確認されなかった。すなわち、MPA は DSB 修復に依存しない経路を標的として、ETP 形成の DSB 量を増加させ、相乗的抗腫瘍効果を引き起こすことが示唆された。

さらに、相乗的な DSB 量の増加に関し、様々なタイプの DNA 障害型抗がん剤 (Talazoparib, Camptothecin, Cisplatin 等) 及び種々 Top2 阻害剤 (Doxorubicin, Merbarone 等) と MPA との併用による DSB 形成量を解析した。その結果、MPA は Top2 阻害剤、特に Top2 と DNA の共有結合 (Top2 cleaved complex; Top2cc) を形成するタイプの阻害剤との併用時のみ、相乗的な DSB 量の増加及び抗腫瘍効果が見られた。さらに、ETP の併用化合物として、ステロイドの中でも MPA 特異的に当該効果が見られるかを検証するため、多様なステロイド骨格を有する 53 種の化合物を対象に、ETP との併用による DSB 量の増減をスクリーニング解析した。その結

果、53 種中、52 種のステロイド化合物が、ETP との併用により相乗的に DSB 量を増加させることを見出した(図 3)。すなわち、ステロイド全般で Top2cc の形成を促進させることが示唆された。

さらに、転写活性が ETP による Top2cc 形成に強い影響を与える知見(A. Canela et al, Mol Cell 2019)をもとに、ステロイドによる転写制御の影響を調べた。そこで、H2AX 抗体による CHIP-seq により、DSB 形成箇所を解析した結果、ETP と MPA を併用は、転写開始点 (TSS) 付近における DSB 量を増加させる傾向を示した。さらに検証として、RNA ポリメラーゼ II 阻害剤 DRB の添加下において、当該相乗的な DSB 量の増加が抑制されることが確認された。以上の結果から、ステロイドにより転写が活性化される領域では、DNA に結合した Top2 が Top2cc へと変換され、最終的に DSB 形成に伴う細胞死が誘導される併用効果モデルが提案できる。

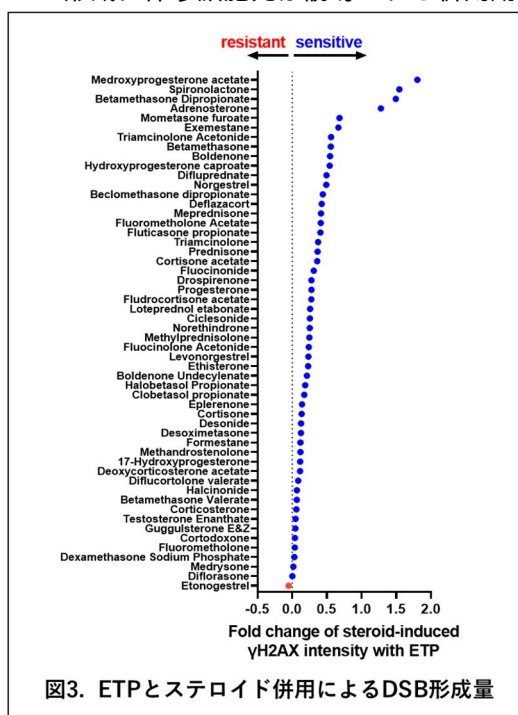


図3. ETPとステロイド併用によるDSB形成量

(3) in vivo における化合物併用法の相乗的抗腫瘍効果の評価

本項では、化合物併用の作用機序が明確な ETP と MPA の併用について、in vivo における相乗的抗腫瘍効果を検証した。マウスに対し移植可能な細胞株のうち、ETP に対する細胞感受性が比較的低い A549 を利用し、腫瘍移植モデルを作製した。Control、ETP 単剤 (20 mg/kg, 週 3 回投与)、MPA 単剤 (1 mg/匹, 週 1 回投与)、ETP+MPA 併用の 4 群について、腫瘍径を観測した。その結果、ETP 単剤群では Control 群と比べ、腫瘍サイズについて有意差は見られず、抗腫瘍効果が確認できない条件であったが、ETP+MPA 併用群では ETP 単剤群と比べ、有意に腫瘍サイズが小さくなる傾向が見られた。以上から、in vitro において確認された相乗的抗腫瘍効果が in vivo でも検証され、臨床応用へ向けた新規治療法の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sunada Shigeaki, Miki Yoshio	4. 巻 1
2. 論文標題 PARP Inhibitors: Mechanism of Action	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hereditary Breast and Ovarian Cancer	6. 最初と最後の頁 281 ~ 292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-16-4521-1_18	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sunada Shigeaki, Saito Hiroko, Zhang Doudou, Xu Zeyu, Miki Yoshio	4. 巻 550
2. 論文標題 CDK1 inhibitor controls G2/M phase transition and reverses DNA damage sensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 56 ~ 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.02.117	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 -

1. 著者名 Zhang Doudou, Shimokawa Takashi, Guo Qianqian, Dan Shingo, Miki Yoshio, Sunada Shigeaki	4. 巻 114
2. 論文標題 Discovery of novel DNA damaging agents through phenotypic screening for DNA double strand break	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1108 ~ 1117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15659	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張 抖抖, 砂田 成章, 三木 義男
2. 発表標題 Tioxoloneによる新たな合成致死療法の開発
3. 学会等名 第79回癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 趙 ニン, 砂田 成章, 三木 義男
2. 発表標題 ステロイドホルモンはトポイソメラーゼ2機能不全に伴う毒性を増強する
3. 学会等名 第79回癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郭 倩倩, 徐 澤宇, 齊藤 広子, 砂田 成章, 三木 義男
2. 発表標題 臨床的意義不明なBRCA2バリエーションの相同組換え活性
3. 学会等名 第79回癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郭倩倩, 徐澤宇, 齊藤広子, 砂田成章, 三木義男
2. 発表標題 臨床的意義不明なBRCA2バリエーションの相同組換え活性
3. 学会等名 第80回癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 砂田 成章, 趙 ニン, 張 抖抖, 三木 義男
2. 発表標題 ステロイドはTop2毒を促進することでトポイソメラーゼ2阻害剤による細胞感受性を増強する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 郭 信信, 姫 しゅうてい, 斉藤 広子, 三木 義男, 砂田 成章
2. 発表標題 臨床的意義不明なBRCA1/2パリアントの相同組み換え活性
3. 学会等名 第81回癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 悪性腫瘍治療剤	発明者 砂田成章、三木義男	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-144405	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

優秀ポスター賞 文部科学省 学術変革領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会（2023年2月@琵琶湖ホテル（滋賀））

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
研究分担者	下川 卓志 (Shimokawa Takashi) (20608137)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・量子医科学研究 所 物理工学部・研究統括 (82502)	
研究分担者	三木 義男 (Miki Yoshio) (10281594)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------