

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16316

研究課題名（和文）多くの癌での予後不良因子PLK1の過剰発現とPARP阻害剤とDNA損傷修復の関係

研究課題名（英文）The effects of Overexpression of PLK1, a poorer prognostic factor in many types of malignancies, on DNA repair and a sensitivity to PARP inhibition

研究代表者

佐倉 杏奈 (Sakura, Anna)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・研究技術員

研究者番号：80626698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベース、およびCancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)データベースを用いbioinformaticsでの検討、および癌細胞株を用いた検討でPLK1過剰発現が相同組換え修復を抑制することを証明した。またCCLEデータベースを用いたbioinformaticsでの検討でPLK1過剰発現がPARP阻害剤感受性に対し高い感受性を示すことを証明した。この結果は卵巣癌臨床検体を用いた検討で再現性を証明した。以上よりPLK1 過剰発現が相同組換え修復を抑制しPARP阻害剤に高感受性であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の報告でPLK1が相同組換え修復に関わることが明らかになりつつあるが、PLK1過剰発現が相同組換え修復に及ぼす影響は不明であった。本研究にてPLK1過剰発現が相同組換え修復を抑制することが明らかになった。これによりPLK1の相同組換え修復への関わりの理解が深まることが予想される。またPLK1過剰発現は多くの癌でみられ、予後不良と関連があるが、PLK1過剰発現癌に対する効果的治療方法は確立されていない。本研究により予後不良であるPLK1過剰発現癌に対し、PARP阻害薬という合成致死に基づく理論上副作用のない理想的な抗癌剤を用いた薬剤が効果的治療方法となりうることを示した。

研究成果の概要（英文）：The overexpression of PLK1 has been found to be associated with poor clinical outcomes in many types of cancer, making it an attractive target for therapy. While recent studies have shown that PLK1 is involved in homologous recombination (HR), it is not clear how its overexpression affects HR. Analysis of The Cancer Genome Atlas dataset in combination with HR deficiency (HRD) score has revealed that overexpression of PLK1 suppresses HR. This finding is also supported by analysis of the Cancer Cell Line Encyclopedia dataset. Additionally, overexpression of PLK1 has been found to attenuate RAD51 focus formation in U2OS cells. Cells with HR defects are more sensitive to PARP inhibitors. Analysis of the CCLE dataset has shown a positive correlation between PLK1 expression levels and sensitivity to PARP inhibitors. Overexpression of PLK1 has been linked to increased sensitivity to PARP inhibition in U2OS cells. This has also been observed in ex-vivo analysis of ovarian cancer specimens.

研究分野：腫瘍学

キーワード：乳癌

1. 研究開始当初の背景

PLK1 はセリン、スレオニンリン酸化酵素であり、細胞周期の制御の上で重要な役割を果たす。PLK1 の過剰発現は多く悪性腫瘍で散見され、予後不良と相関がある。このため PLK1 は抗癌剤開発の上で魅力的なターゲットであり、PLK1 阻害薬が多数開発されてきた。しかし最も臨床試験で進んだ volasertib でさえ PLK1 発現量とは無関係に腫瘍細胞を死滅させるため、PLK1 過剰発現を伴う癌の効果的治療方法とはなり得ない。

PARP 阻害薬は合成致死に基づく新規抗癌剤で、理論的に副作用のない理想的な抗癌剤である。PARP 阻害薬は相同組換え修復不全を伴う悪性腫瘍のみを選択的に死滅させる。現在のところ相同組換え修復にかかわる家族性乳癌、卵巣癌の原因遺伝子である BRCA1、または BRCA2 遺伝子に変異を伴う卵巣癌が PARP 阻害薬の適応となっている。実際に臨床においてこれまで良好な成績を示している。大変魅力的な抗癌剤であるが適応が限られている点が問題である。

相同組換え修復は CtIP 制御下にて ssDNA generation から始まる。近年の報告で、PLK1 が CtIP と共に働き相同組換え修復に関わることが明らかになってきた。しかしながら癌で散見される PLK1 過剰発現が相同組換え修復にどのような影響を及ぼすかは不明である。PLK1 過剰発現が相同組換え修復に影響を及ぼすと PARP 阻害薬への感受性に影響を及ぼす可能性があり、相同組換え修復の理解という基礎研究だけでなく、臨床面への影響を及ぼす可能性もある。

2. 研究の目的

癌で散見される PLK1 過剰発現は予後不良と相関がある。近年の報告で PLK1 は相同組換え修復において重要な役割を果たす。本研究は PLK1 過剰発現が相同組換えに及ぼす影響を検討し、相同組換え修復に影響を及ぼす場合は PLK1 過剰発現が PARP 阻害薬への感受性に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) PLK1 過剰発現が相同組換え修復に及ぼす影響

Bioinformatics :

TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースを用い bioinformatics で検討する。相同組換え修復不全はヘテロ接合性消失、テロメアアレルの不均衡、大規模な状態遷移をひきおこす。Homologous Recombination Deficiency スコア(HRD スコア)はこれらの現象を数値化したものである。TCGA データベースにある PLK1 発現量と HRD スコアの関連を統計学的に検討する。次に約 1000 種類の癌細胞株における遺伝子発現データと抗癌剤感受性データを含む Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データセットでも同様に PLK1 発現量と HRD スコアの関連を統計学的に検討する。

癌細胞株での検討:

①U2OS 細胞株で PLK1 安定過剰発現株を作成し相同組換え修復への影響を次の方法で確認する。相同組換え修復不全がある場合、recombinase である RAD51 focus formation が抑制されるため、PLK1 過剰発現の RAD51 focus formation への影響を確認する。バイアス排除のため Focus formation は免疫染色で得られた画像を ImageJ plugin で自動的にカウントし検討する。

②Assay for Site-Specific HR Activity (ASHRA)を用い再現性をさらに検討する。ASHRA は CRISPR/Cas9 システムを用い genome に FLAG-tag を integration させ、integration の効率から相同組換え修復の効率を推測するものである。PLK1 安定過剰発現株を用い、integration を定量し PLK1 過剰発現が相同組換え修復に与える影響を検討する。

(2) PLK1 過剰発現が PARP 阻害薬感受性に与える影響

Bioinformatics :

Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データセットは PLK1 発現量と PARP 阻害薬に対する感受性のデータがある。これらのデータを用い、両者の関係を統計学的に検討する。

癌細胞株での検討:

①作成した PLK1 安定過剰発現 U2OS 株を用い、PARP 阻害薬への感受性を clonogenic assay で in vitro で検討する。

②卵巣癌手術余剰検体は免疫染色で PLK1 発現量を測定しつつ、collagenase を用い単細胞分離をする。単細胞分離された細胞を用い ex-vivo での PARP 阻害薬に対する感受性を検討する。

4. 研究成果

本研究は多くの癌でみられ、予後不良と関連がある PLK1 過剰発現が、1) 相同組替え修復に与える影響、(2) PARP 阻害剤感受性への影響、を検討するものである。1) PLK1 過剰発現が相同組替え修復に与える影響は、TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースを用い bioinformatics で検討した。TCGA dataset に組替え修復不全を示す HRD score を算出し元データに integrate した上で検討した。これにより多くの癌種において PLK1 発現量が HRD スコアと正の相関があることを証明した。これは PLK1 過剰発現が相同組換え修復を抑制することを示唆する。次に約 1000 種類の癌細胞株における遺伝子発現データと抗癌剤感受性データを含む Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データベースでも同様に bioinformatics で検討した。この検討でも PLK1 発現量と HRD スコアに正の相関があることを証明した。さらに U2OS 癌細胞株を用い、PLK1 安定過剰発現株を作成し、これを用いた研究で再現性を確認した。PLK1 過剰発現を伴う U2OS 細胞株では RAD51 foci formation を parental または vector control を integrate した株に比べて抑制されていることを証明した。本研究では PLK1 発現量が gamma-H2AX の induction に影響を及ぼさないことを証明しているため、PLK1 が直接 RAD51 foci formation に影響を及ぼしていることを証明している。このように PLK1 過剰発現が相同組換え修復を抑制することを証明した。

(2) PLK1 過剰発現が PARP 阻害剤感受性に与える影響は、CCLE データセットを用い bioinformatics で検討した。この検討で PLK1 発現量が Ic_{50} で示す PARP 阻害剤に対する感受性に負の相関があることを証明した。この結果は PLK1 過剰発現が PARP 阻害薬に高い感受性を示すことを示唆する。先に作成した PLK1 過剰発現を伴う U2OS 細胞株でも PARP 阻害薬への *in vitro* での感受性を clonogenic assay を用いた実験系で検討した。本研究でも bioinformatics で得られた結果の再現性を得た。さらに卵巣癌手術検体の余剰検体を用いた検討を行った。本検討では、手術余剰検体での PLK1 発現量を免疫染色で確認、さらに単細胞分離し *ex vivo* での PARP 阻害薬への感受性を検討した。この検討でも PLK1 発現量が多いと PARP 阻害薬に高い感受性を示すことを証明した。

上記のごとく、本研究にて PLK1 過剰発現が相同組換え修復を抑制することが明らかになった。これにより PLK1 の相同組換え修復への関わりが理解が深まることが予想される。また PLK1 過剰発現は多くの癌でみられ、予後不良と関連があるが、PLK1 過剰発現癌に対する効果的治療方法は確立されていない。本研究により予後不良である PLK1 過剰発現癌に対し、PARP 阻害薬という合成致死に基づく理論上副作用のない理想的な抗癌剤を用いた薬剤が効果的治療方法となりうることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Iwata Teppei, Sedukhina Anna S., Kubota Manabu, Oonuma Shigeo, Maeda Ichiro, Yoshiike Miki, Usuba Wataru, Minagawa Kimino, Hames Eleina, Meguro Rei, Cho Sunny, Chien Stephen H. H., Urabe Shiro, Pae Sookhee, Palanisamy Kishore, Kumai Toshio, Yudo Kazuo, Kikuchi Eiji, Sato Ko	4. 巻 11
2. 論文標題 A new bioinformatics approach identifies overexpression of GRB2 as a poor prognostic biomarker for prostate cancer	5. 発行年 2021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) 10.1038/s41598-021-85086-9	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 Michal M Hoppe, Patrick Jaynes, Joanna D Wardyn, Sai Srinivas Upadhyayula, Tuan Zea Tan, Stefanus Lie, Diana G Z Lim, Brendan N K Pang, Sherlly Lim, Joe P S Yeong, Anthony Karnezis, Derek S Chiu, Samuel Leung, David G Huntsman, Anna S Sedukhina, Ko Sato and Anand D Jeyasekharan	4. 巻 13
2. 論文標題 Quantitative imaging of RAD51 expression as a marker of platinum resistance in ovarian cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e13366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/emmm.202013366	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------