

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：17201  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22501031  
 研究課題名（和文）DNA 依存性キナーゼを標的とした癌治療の構築と効果予測因子の探索

研究課題名（英文）Establishment of cancer therapy targeted for DNA dependent protein kinase and investigation of its predictive factor

研究代表者

荒金 尚子（ARAGANE NAOKO）  
 佐賀大学・医学部・講師  
 研究者番号：20321846

研究成果の概要（和文）：DNA 依存性キナーゼ(DNA-PK)とトポイソメラーゼ II $\alpha$ 抑制の dual-inhibitor である NK314 は、成人 T 細胞性白血病細胞株と肺癌細胞株に対し強い細胞増殖抑制効果を示した。NK314 は DNA 二重鎖切断量の増加と DNA 修復抑制の持続的効果を介して殺細胞作用をもたらしたと考えられた。DNA-PK 阻害剤の効果予測因子の検索では、DNA-PKcs 量と RNA 結合蛋白 hnRNP B1 量とで強い相関関係を認めたが、DNA-PK 阻害剤の増殖抑制効果とこれらの蛋白量は有意な相関は見られず、今後更なる検討が必要と考える。

研究成果の概要（英文）：NK314, a dual inhibitor of DNA dependent protein kinase (DNA-PK) and topoisomerase II $\alpha$  potently inhibited cell growth of adult T cell leukemia and lung cancer cell lines. The inhibitory effect was mediated through enhancement of DNA double strand breaks and prolonged inhibitory effect of DNA repair. As for the predictive factors for DNA-PK inhibitors, protein level of hnRNP B1, an RNA binding protein, was strongly associated with that of DNA-PKcs. However, the inhibitory effect of cell growth of lung cancer cells was not statistically associated with protein levels of DNA-PKcs nor hnRNP B1. Further investigation for seeking the predictive factors would be needed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2011年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2012年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	990,000 円	4,290,000 円

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

|

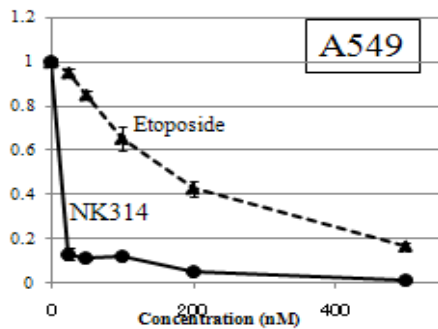


図1 NK314の細胞増殖抑制

(1) 癌細胞における DNA 修復阻害と制癌作用

癌治療において治療抵抗性は解決すべき重要な課題である。放射線や種々の抗がん剤によって DNA 損傷が生じるが、その修復能の亢進が抗がん剤や放射線に対する耐性化をもたらす。DNA 依存性キナーゼ (DNA-PK) は DNA 二重鎖切断を non-homologous end joining にて修復する主要因子である。更に、DNA-PK は Akt/PKB の Ser473 のリン酸化を通じてアポトーシスの阻害を起こすことが報告されている (Bozulic, Mol Cell 2008)。以上より、DNA-PK は制癌剤の新しい分子標的として、化学療法・放射線療法耐性化を克服する可能性があると考えに至った。我々は、新規抗癌剤 NK314 の殺細胞効果の解析の

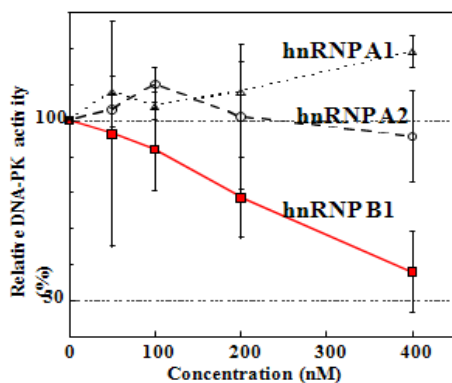


図2 DNA-PK活性の抑制

中で、同剤がトポイソメラーゼ II $\alpha$ 抑制と DNA-PK 抑制の dual-inhibitor であり、種々の癌細胞株に対し強い細胞増殖抑制効果 (IC<sub>50</sub>

20-60nM) があることを見出した (図1)。この抑制機構の解析を行い、治療抵抗性腫瘍に対する DNA-PK 阻害剤の有効性の検討を行うことが本研究の目的である。

(2) DNA 修復阻害剤の効果予測因子の開発

分子標的薬の探索と同時に、効果予測因子の検索を行う。DNA-PK 阻害剤の効果予測因子として DNA-PK 活性測定が重要だが、臨床サンプルを用いた測定は容易ではないため、代理マーカーが必要となる。我々はこれまで、RNA 結合蛋白質である hnRNP B1 が種々の癌で高発現していること、DNA-PK 複合体と会合すること、DNA-PK 活性を濃度依存的に抑制すること (図2)、hnRNP B1 高発現群で予後良好であることを報告してきた (Cancer Res 1999, 2001, Biochem. Biophysic. Res. Comm. 2005)。以上の結果を踏まえ hnRNP B1 が DNA-PK 抑制剤の効果予測因子となり得るのかについて検討する。

2. 研究の目的

(1) 癌細胞における DNA 修復阻害と制癌作用

1. トポイソメラーゼ II $\alpha$ と DNA-PK を標的とした dual-inhibitor NK314 の殺細胞効果解析

種々の肺癌細胞株、ATL 細胞株を用いて NK314 の殺細胞効果を検討する。また、その効果と DNA-PK 量、および活性との相関を検討する。NK314 処理後の DNA-PK 量、活性、その下流である Akt/PKB 経路について検討する。

2. DNA-PK inhibitor の効果と、抗癌剤および放射線との併用効果

NK314以外のDNA-PK inhibitorについても上記と同様の効果について検討する。また、抗癌剤および放射線との併用効果についても検討する。

### 3. 抗癌剤耐性細胞株に対する DNA-PK inhibitor の効果

(2) DNA 修復阻害剤の効果予測を可能とするバイオマーカーの探索

#### 1. hnRNP B1 発現と DNA-PK inhibitor の効果との関連 (分子マーカーとしての hnRNP B1 の有用性)

hnRNP B1 発現量の違いにより、DNA-PK inhibitor 感受性が異なるか、細胞株を用いて検討する。

#### 2. hnRNP B1 簡易測定法の確立

現在は癌組織を用いた免疫組織化学法にて hnRNP B1 の発現量を検討しているが、末梢血を用いて血漿 hnRNP B1 RNA の簡易定量法を確立する (一部共同研究にて開始済)。

### 3. 研究の方法

(1) トポイソメラーゼ II $\alpha$  と DNA-PK を標的とした dual-inhibitor NK314 の殺細胞効果の解析

- ① 肺癌細胞株、ATL 細胞株など種々の腫瘍細胞株の細胞増殖抑制効果
- ② 細胞周期解析; Propidium iodide と BrdU 二重染色 (フローサイトメトリー)
- ③ アポトーシス誘導; AnnexinV 発現およびミトコンドリア膜電位測定 (フローサイトメトリー)
- ④ DNA-PK 複合体量 (Western blotting)、DNA-PK 活性と細胞増殖抑制効果との相関
- ⑤ NK314 処理後の  $\square$  の変動
- ⑥ NK314 による DNA-PK 活性抑制機構の解析

⑦ DNA-PK 欠損細胞株 M059J と親株 M059K に対する NK314 の細胞増殖抑制効果の比較

⑧ DNA-PK 遺伝子導入により  $\square$  の現象が打ち消されるか

(2) DNA-PK inhibitor の効果と、抗癌剤および放射線との併用効果

① 他の DNA-PK inhibitor について上記と同様の解析を行う

② 放射線照射、抗癌剤 (トポイソメラーゼ II 阻害剤、プラチナ製剤) との併用にて同様の解析

(3) 抗癌剤耐性細胞株に対する DNA-PK inhibitor の効果

(4) hnRNP B1 発現と DNA-PK inhibitor の効果との関連 (バイオマーカーとしての hnRNP B1 の有用性)

hnRNP B1 発現量と DNA-PK inhibitor 感受性の相関を細胞株を用いて検討する。

(5) hnRNP B1 簡易測定法の確立

臨床サンプルを用いて以下の検討を行う。

① 血漿 hnRNP B1 RNA の簡易定量法を確立

現在は癌組織を用いた免疫組織化学法にて hnRNP B1 の発現量を検討しているが、末梢血を用いて血漿 hnRNP B1 RNA の簡易定量法を確立する (共同研究にて開始済)。

② 血漿 hnRNP B1 RNA 量と肺癌組織での hnRNP B1 量との相関

血漿 hnRNP B1 RNA 量と免疫組織化学法 (組織アレイ) における hnRNP B1 量と相関するか検討する。

③ 血漿 hnRNP B1 RNA 量と抗癌剤あるいは放射線に対する感受性をレトロスペクティブに検討する。

#### 4. 研究成果

[トポイソメラーゼ II $\alpha$ 抑制と DNA-PK 抑制の dual-inhibitor である NK314 の、成人 T 細胞性白血病(ATL)細胞株における抗腫瘍効果についての検討]

##### 1. NK314 の ATL 細胞株における細胞増殖抑制効果

IL-2 依存性株 4 株、非依存性株 4 株を含む 8 種の ATL 細胞株について NK314 の細胞増殖抑制効果を検討した。いずれも強い抗腫瘍効果がみられ、IC<sub>50</sub> は 23-71 nM であった。一方、正常末梢血単核球では IC<sub>50</sub> は 500nM 以上であり白血病細胞特異的に抗腫瘍効果がみられた。ATL 細胞を用いた xenograft でも腫瘍増殖抑制効果を認めた(図 1)。

##### 2. 細胞周期解析及びアポトーシス誘導

細胞周期の解析では、ATL 細胞株 8 株全て G2/M 停止を生じたが、正常末梢血単核球では見られなかった。アポトーシスは IL-2 非依存性 ATL 細胞株で見られたが、IL-2 依存性 ATL 細胞株ではその効果は弱かった。

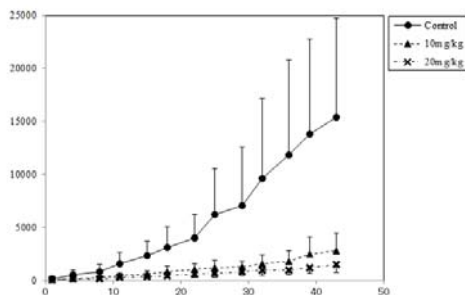


図 1 ATL 細胞を用いた xenograft での腫瘍増殖抑制効果

##### 3. NK314 により DNA 損傷と修復能の検討

ATL 細胞に NK314 を処理し、DNA 二重鎖切断量をフローサイトメトリーを用いた

$\gamma$ H2AX 定量により解析した。NK314 はエトポシドと比較し、どの細胞株においても  $\gamma$ H2AX 定量は高値であり、48 時間まで回復しなかった。また、放射線照射により誘導した DNA 二重鎖切断は、照射後 5 分 (DNA 損傷)、2 時間 (DNA 修復) 共に NK314 で多くみられた (図 2)。

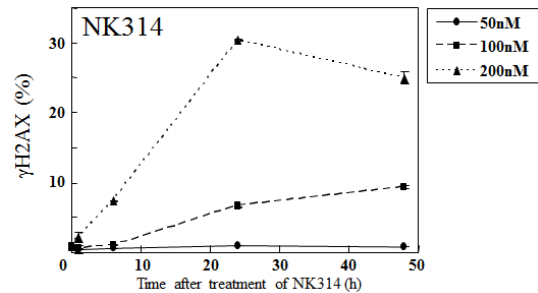


図 2 NK314 による DNA 二重鎖切断量の経時的変化

##### 4. NK314 による DNA-PK 活性抑制機構の解析

全 ATL 細胞株で DNA-PK 複合体は高発現しており、細胞増殖抑制効果と DNA-PK 複合体量との相関はなかった。しかし、細胞増殖抑制効果、アポトーシスが強くみられた IL-2 非依存性 ATL 細胞株では、NK314 処理後、DNA-PKcs の分解が生じた。

以上の結果より、新規抗癌剤 NK314 は、ATL に強い抗腫瘍効果を認め、正常細胞には殺細胞効果は見られず、有望な治療薬として期待できる。

[トポイソメラーゼ II $\alpha$ 抑制と DNA-PK 抑制の dual-inhibitor である NK314 の、肺癌細胞株における抗腫瘍効果と、hnRNP B1 の代理マーカーとしての有用性についての検討]

### 1. NK314 の肺癌細胞株における細胞増殖抑制効果

20種の肺癌細胞株についてNK314の細胞増殖抑制効果を、トポソメラーゼ阻害剤であるエトポシドと比較検討した。NK314のIC<sub>50</sub>は53-427nMであり、6細胞株では500nM以上であった。一方エトポシドは、2細胞株のみIC<sub>50</sub>は100-200nMだったが、残り18細胞株は500nM以上であった。

### 2. 細胞周期解析及びアポトーシス誘導

細胞周期及びアポトーシスの解析では、IC<sub>50</sub>500nM以上の耐性株、感受性株共にG2/M停止を生じたが、耐性株ではアポトーシスは見られなかった。

### 3. RNA結合蛋白、hnRNP B1のDNA-PK活性、及びDNA-PK複合体に対する効果

これまで、hnRNP B1がDNA-PK複合体に会合し、*in vitro* DNA-PK活性を抑制したことを報告してきたが、本年は、さらに、hnRNP B1がDNA-PK catalytic subunit (DNA-PKcs)に結合し、複合体の形成を阻害することを明らかにした(図3)。

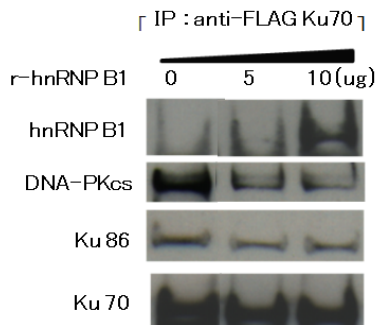


図3 hnRNP B1のDNA-PK複合体形成阻害

### 4. hnRNP B1とDNA-PKcs蛋白量の相関

20種の肺癌細胞株について、hnRNP B1とDNA-PKcs蛋白量をWestern blot法にて解析し、densitometryにて定量化した。両者は正の相関(相関係数0.995)を示したが(図4)、他のDNA修復分子であるATM、ATRとは相関しなかった。さらに、肺癌患者217人の肺癌組織を用いてtissue arrayを作成し、免疫組織化学法にてhnRNP B1とDNA-PKcs蛋白量を検討したが、同様に正の相関がみられた(相関係数0.492)

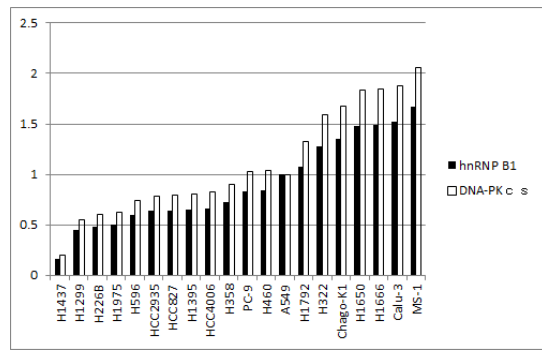


図4 hnRNP B1とDNA-PKcsの相関

以上の結果より、新規抗癌剤NK314は、肺癌細胞に対して細胞増殖抑制効果は様々であった。hnRNP B1蛋白量はDNA-PKcs蛋白量と相関関係にあり、DNA-PK阻害剤の代理マーカーとしての可能性が推測された。

[DNA-PK特異的阻害剤であるNU7026とNU7441について、肺癌細胞株における抗腫瘍効果と、DNA-PKcs蛋白量との相関、hnRNP B1の代理マーカーとしての有用性についての検討]

### 1. NU7026、NU7441の肺癌細胞株における細胞増殖抑制効果

NU7026、NU7441はDNA-PK特異的阻害剤であり、IC<sub>50</sub>は各々230nM、14nMと報告されている。20種の肺癌細胞株について細胞増殖抑制効果を検討した。NU7026のIC<sub>50</sub>は12.0-48.3・Mであり、6細胞株では500・M以上であった。NU7441は、3.4-18.6・Mであった。

### 2. DNA-PK特異的阻害剤とDNA-PK量、hnRNP B1量との相関

NU7026の肺癌細胞株増殖抑制効果(IC<sub>50</sub>)とDNA-PKcs量との相関を検討した。DNA-PKcs量が多いとIC<sub>50</sub>は高い、つまり抑制効果が弱い傾向が見られたが、有意差は認めなかった。hnRNP B1量とIC<sub>50</sub>との関連は、DNA-PKcs量と同様の傾向であった。NU7441についても上記と同様の傾向がみられた。

### 3. NU7441の肺癌細胞株における細胞増殖抑制効果

増殖抑制効果が比較的強くみられたNU7441について、肺癌細胞株48種(扁平上皮癌9種、腺癌25種、小細胞癌9種、その他5種)を用いて検討した。IC<sub>50</sub>の平均値は各々8.5・M、10.9・M、9.2・M、8.6・Mと組織型で差は見られなかった。

### 4. NU7441とVP-16との併用効果

2種の肺癌細胞株(H1975、Chago-K1)について、NU7441とVP-16との併用効果につい

て検討した。H1975 では相加効果が見られたが、Chago-K1 では併用効果はみられなかった。

以上の結果より、DNA-PK 阻害剤は肺癌細胞株に対し一定の増殖抑制効果をもたらすが、その効果は十分でない。DNA double strand break をきたすような抗癌剤との併用が必要と考えられるが、至適薬剤の選択が重要である。また、効果予測因子として、DNA-PKcs 量は、DNA-PK 阻害剤の IC<sub>50</sub> と逆相関する傾向がみられたが、相関しない細胞株もありその相違について検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II $\alpha$  and DNA-dependent protein kinase. Blood. 2011;117:3575-84. 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

1. Naoko Sueoka-Aragane, Akemi Sato, Kentaro Iwanaga, Naomi Kobayashi, Shinya Kimura, Eisaburo Sueoka. DNA dependent protein kinase as a new molecular target for treatment of non-small cell lung cancer. American Association for Cancer Research 2012 3.31-4.4
2. Takashi Hisatomi, Naoko Aragane, Akemi Sato, Masaru Ide, Kazuya Okamoto, Shinya Kimura, Eisaburo Sueoka. Dual targeting therapy on topoisomerase II $\alpha$  and DNA-dependent protein kinase is a promising strategy for adult T cell leukemia-lymphoma. The 10<sup>th</sup> Japan-Korea Joint symposium on Cancer and Ageing Research, February 14-15, 2012.
3. Sueoka E, Ide M, Sueoka-Aragane N, Sato A, Nakamura H, Sotomaru Y, Taya C, Yonekawa H, Nakachi K, Kubota Y, Kimura S, Tanimoto K. The role of hypoxia inducible factors on maintenance of hematopoietic stem cells and leukemogenesis. 2012 Tumor Microenvironment GCRC

International Symposium, Aug 23-24, 2012, Seoul

4. Takashi Hisatomi, Naoko Sueoka-Aragane, Akemi Sato, Rika Tomimasu, Masaru Ide, Shinya Kimura and Eisaburo Sueoka. DNA-dependent protein kinase as a promising molecular target for the treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma. ヨーロッパ血液学会 2011.6.9~12 ロンドン(英国)
5. Eisaburo Sueoka, Takashi Hisatomi, Naoko Sueoka-Aragane, Akemi Sato, Rika Tomimasu, Masaru Ide<sup>2</sup>, Shinya Kimura. Overexpression of hnRNP B1 inhibits DNA repair by interaction with DNA-dependent protein kinase complex in adult T-cell leukemia. The XXV Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases. 2011.9.17
6. 末岡 栄三朗. DNA-dependent protein kinase as a molecular target of chemotherapy on hematological malignancy. 第 32 回日本分子生物学会年会 2010.12.10 神戸国際会議場

[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) 研究代表者

荒金 尚子 (ARAGANE NAOKO)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：20321846

### (2) 研究分担者

末岡 栄三朗 (SUEOKA EIZABURO)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：00270603

岩永 健太郎 (IWANAGA KENTARO)

佐賀大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60380755