

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24年 5月18日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650233

研究課題名（和文） がん精巣抗原による個別化がん治療の開発

研究課題名（英文） Individualized Cancer Therapy Using Cancer Testis Antigens

研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA KIYOSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40200133

研究成果の概要（和文）：がん精巣抗原は、正常細胞では生殖細胞のみに発現するが、多様な種類のがんにおいて発現することから、治療のよい標的となる。そこで、このような分子の機能を解析することによって、治療戦略を検討した。その結果、減数分裂期のシナプトネマ複合体を形成する分子である SYCP3 と SMC1 β は、がん精巣抗原であることが確認され、ヒト細胞における機能解析によって、これらの分子の体細胞における発現は、DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復を抑制することが判明した。この結果により、これらのがん精巣抗原を発現するがんは、DNA 二本鎖切断によって抗腫瘍効果を発揮する治療に感受性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cancer testis antigens are assumed to be excellent targets for cancer treatment because their expression is limited to germ cells and cancers of various origins. We investigated therapeutic strategies for cancer expressing these molecules by analyzing their functions. We confirmed that SYCP3 and SMC1 β , components of synaptonemal complexes formed during meiosis, are cancer testis antigens, and found that their expression in somatic cells inhibits homologous recombination repair of DNA double-stranded breaks. This result indicates that cancers expressing these cancer testis antigens are hypersensitive to treatments that exert anti-tumor activities by inducing DNA double-stranded breaks.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：がん精巣抗原、相同組換え修復、放射線治療、化学療法、個別化治療

1. 研究開始当初の背景

がんにおける染色体不安定性、および化学療法と放射線による DNA 損傷性治療の分子機

構は、これまですべて体細胞において発現している分子の機能変化の観点から研究が行われてきた。しかし、それだけでがんにおけ

るこれらの現象をすべて説明できているわけではない。その理由としては、がん精巣抗原のような体細胞における研究対象とならない分子が、がんにおいては異所性に発現しているために、染色体不安定性や放射線感受性を制御している可能性があるからである。

本研究によって、がん精巣抗原のがんにおける DNA 損傷修復機構および染色体安定化機構への影響を証明することに成功すれば、がんの病態や治療の基盤となる分子医学において、がん精巣抗原の生物学的重要性を世界で初めて提唱できることになる。また、その情報を基盤として、これまで個別化治療が困難であった放射線治療と化学療法において、がん組織におけるこれらの分子の発現による治療選択が可能となることが期待されている。

2. 研究の目的

がんと生殖細胞のみに特異的に発現するがん精巣抗原が近年多数同定されるようになり、免疫治療などでは治療の良い標的として注目されている。その一方で、それらががん治療およびがんの進展における生物学的意義はほとんど不明である。そこでこれらの中で減数分裂特異的な相同組換えに関与する分子に着目し、これらを体細胞において異所性に発現させることによって、相同組換え修復が制御する化学療法と放射線感受性への感受性の変化とがん細胞の特徴である染色体不安定性誘導を解析する。

本研究により、がん治療の感受性を制御するがん精巣抗原が同定されることが期待される。そして、その成果はこれらの発現レベルに応じた個別化がん治療の実現を可能にするとともに、その発現量を制御する分子機構を解明することによって、これらの分子の発現調節による化学療法と放射線の増感法の開発にも応用できることが期待される。

3. 研究の方法

最初に、生殖細胞における減数分裂期に形成されるシナプトネマ複合体の構成分子のがん細胞株における発現を、RT-PCRによって解析する。その結果、がん細胞における発現が認められた分子については、ヒト細胞における機能解析の対象とし、そのために、精巣 RNA より、これらの遺伝子の cDNA を RT-PCR によって作製する。

次に、これらががん精巣抗原に分類される分子の発現ベクターを作製し、正常上皮細胞 RPE に導入し、これらの発現細胞と非発現細胞を得る。一方、がん培養細胞株におけるこれらの分子の発現を解析し、発現細胞においては siRNA を使用してノックダウン細胞を作製する。これらの細胞系を用いて、以下の事項を検討する。

(1) DNA 損傷作用への感受性

これらの細胞に放射線照射およびシスプラチン暴露を行った後に、1 週間から 10 日後のコロニー形成を観察し、細胞生存率を評価する。

(2) DNA 修復機能

DNA 二本鎖切断修復に対する修復機構の中で、相同組換えによって修復する機構においては、放射線照射後の RAD51 の核内フォーカス形成を、これに対する抗体を用いた蛍光免疫によって可視化し、DNA 修復能を評価する。

(3) 染色体数的異常

染色体の特定の部位にハイブリダイズする蛍光プローブを用いた FISH 法によって、特定の染色体の 1 細胞あたりの数を計数する。正常では 2 つの染色体が存在するが、2 つ以外の染色体数を有するものを異数体とする。

(4) PARP 阻害剤への感受性

PARP 阻害剤に対する高い感受性は、相同組換え修復機能が低下した際の重要な特徴である。細胞に PARP 阻害剤である NU1025 を 150 μ M までの最終濃度において添加し、1 週間後のコロニー数を計数し、細胞生存率を評価する。

(5) 姉妹染色分体の早期解離

細胞をコルヒチンで処理し、分裂中期に同調した後に、染色体を展開する。ギムザ染色によって染色体を可視化し、姉妹染色分体間の距離を計測する。

4. 研究成果

(1) SYCP3 の相同組換え修復への影響

減数分裂特異的な構造物であるシナプトネマ複合体を構成する SYCP3 は、多様な種類のがんで発現するがん精巣抗原である。この遺伝子の体細胞における役割を理解するために、ヒト正常上皮細胞に外来性にこの cDNA を発現させたところ、その遺伝子産物は核内に局在するとともに、DNA 損傷のマーカーである γ H2AX の核内フォーカス形成が増加し、DNA 修復機能の低下の存在が示唆された。また、染色体の数的異常である異数性の増加が確認された。

次に、放射線とシスプラチンに対する感受性を解析したところ、SYCP3 の発現により、これらに対する感受性が亢進することが明らかとなった。この感受性のパターンは DNA 二本鎖切断に対する相同組換え修復の機能低下の可能性を示唆するために、その修復の中心的分子である RAD51 の機能を放射線照射後の核内フォーカス形成で検討したところ、SYCP3 発現細胞で低下が見られた。この結果

は、SYCP3 の発現によって相同組換え修復が阻害されることを示唆するものである。

相同組換え修復が低下している場合には、DNA 二本鎖切断が増加するが、これに対しては poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) による別の修復経路も関与する。そして、BRCA1 や BRCA2 の変異を有するがんは、PARP 阻害に対して非常に感受性が高くなることが知られている。そこで、PARP 阻害剤によって、相同組換え機能低下との合成致死アプローチによる感受性の変化を解析した。SYCP3 発現細胞は PARP 阻害剤に対して感受性が著しく亢進し、確かに発現細胞では相同組換え修復機能が低下していることが裏付けられた。このような結果を確認するために、SYCP3 発現がん細胞株において、RNA 干渉によって SYCP3 の発現を低下させたところ、RAD51 のフォーカスは増加し、PARP 阻害剤に対しては抵抗性となった。また、この SYCP3 発現による PARP 阻害剤に対する感受性が、BRCA2 によって媒介される相同組換え修復機構と関係することを証明するために、BRCA2 の変異を有していることが報告されている膵臓がん細胞株 Capan1 において同様の実験を行った。その結果、BRCA2 が欠損している場合には、SYCP3 による PARP 阻害剤感受性の変化は認められず、この SYCP3 の作用において、BRCA2 が関与することが示唆された。

SYCP3 非発現がん細胞にメチル化阻害剤を添加すると、その発現が誘導された。この結果より、体細胞では低メチル化で発現が誘導されるがん精巣抗原 SYCP3 は、相同組換え修復機能を抑制することによって、放射線、シスプラチンを代表とする DNA 架橋剤、PARP 阻害剤に対する感受性を亢進させていることが明らかとなった。

PARP 阻害剤は、相同組換え修復機能が低下したがんにおいて有効性が報告されているが、このようながんは BRCA1 あるいは BRCA2 に変異を有するがんに限られている。しかし、このような遺伝子の変異を有していない症例においても相同組換え修復の機能が低下していることが想定されていた。本研究によって、SYCP3 が発現している場合は、BRCA の変異を有する場合と同じ治療戦略を考慮できる可能性が示唆された。

これらの結果は、ヒト細胞を用いた基盤的な研究であるために、今後の課題としては、どの程度の SYCP3 発現レベルが認められる場合に PARP 阻害剤の有効性が発揮されるのかを知る必要がある。また、相同組換え修復機能の低下がどのような機序によって誘導されるのかについても詳細な解析が必要である。

(2) SMC1βの体細胞機能への影響

減数分裂特異的 cohesin である SMC1β は、正

常組織では生殖細胞においてのみ発現しているが、一部のがんにおいて発現していることが確認されたために、がん精巣抗原であると言える。体細胞においては、cohesin は相同組換えによる DNA 二本鎖切断修復に重要な役割を果たすことから、がんにおける SMC1β の発現が、どのように体細胞の機能に影響を及ぼすのかについて、ヒト細胞を用いて検討を行った。

正常上皮細胞 RPE に SMC1β を外来性に発現させた場合には、放射線とシスプラチンに対して細胞の感受性は亢進した。逆に、この分子が発現しているがん細胞において、SMC1β をノックダウンすると、細胞はこれらの作用に対して抵抗性となった。このような感受性のパターンから、この分子の発現細胞では、DNA 二本鎖切断に対する修復機能が低下していることが想定された。

そこで、DNA 二本鎖切断に対する修復に関わる分子の機能を、放射線照射後の核内におけるフォーカス形成によって検討した。その結果、相同組換え修復の中心的な分子である RAD51 の放射線照射後の核内フォーカス形成は、SMC1β の発現によって低下することが判明した。これらの結果から、この分子の発現は、相同組換え修復を抑制することが想定された。

相同組換え修復は、DNA 損傷に応答する分子経路の中では、時間的にはかなり後期において作用する機構であり、その前段階として、情報伝達経路の活性化が存在する。cohesin の DNA 損傷に応答する情報伝達経路への関与については、SMC1α のセリン 957 や SMC3 のセリン 1083 のリン酸化が知られている。そこで、SMC1β の発現による、これらのリン酸化分子の変化を解析したが、非発現細胞と比べて明らかな差異は観察されなかった。

次に、cohesin の役割である姉妹染色分体間の結合について、分裂中期の染色体を展開して形態を解析したところ、SMC1β の発現によって、その結合は解離し、逆に、ノックダウンによって姉妹染色分体解離の頻度は減少した。また、染色体分配の異常によって発生する異数体についても、SMC1β 発現細胞においては増加が観察された。以上の結果により、体細胞において cohesin の役割を担う SMC1α が形成する複合体の機能は、SMC1β が発現された場合には抑制されることが示唆された。

SMC1 は SMC3 と RAD21 とともに複合体を形成して cohesin の役割を果たすために、体細胞において SMC1β が発現した場合に、このような複合体を形成するのを免疫沈降によって解析した。その結果、確かにその複合体が存在す

ることが確認された。この場合には、体細胞において本来存在するSMC1 α が構成する複合体形成に影響が及ぶことが想定される。そこで、SMC1 β が発現した状態において、SMC1 α とSMC3あるいはRAD21との結合を免疫沈降によって検討したが、SMC1 β 非発現時と比べて明らかな変化は観察されなかった。したがって、体細胞においてこれら2種類のSMC1が存在する場合は、各々の複合体形成には変化がない状態において、染色体上の近接した部位で機能的に競合する可能性が想定された。

このような研究成果が得られたことによつて、がん精巣抗原として同定されたSMC1 β が発現しているがんにおいては、相同組換え修復の機能が低下していることが判明した。そして、放射線、シスプラチンを代表とするDNA架橋剤、PARP阻害剤は、これらのがんに対して有効性が高いことが想定され、今後のがん個別化治療にとって基盤となる情報が得られた。

がんにおけるcohesinを構成する分子の異常としては、大腸癌や脳腫瘍などにおいてSMC1 α 、STAG2、STAG3などの変異が既に報告されている。SMC1 β が発現した場合には、これらの分子の変異と効果が完全に同じであるのか、それとも異なる効果が存在するのかについても検討が必要になる。特に、cohesinの機能としての遺伝子発現の制御については、これまでのがんにおける報告では議論のあるところであり、がん病態の多様性を考慮すると、この点はこれからの課題となるであろう。

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 Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J, Tashiro S, Miyagawa K: Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2. EMBO Rep 13:44-51, 2012 査読有
DOI:10.1038/embor.2011.221

[学会発表] (計6件)

- ① Hosoya N, Miyagawa K: The synaptonemal complex protein SYCE2 induces chromosome instability in mitotic cells through activation of the ataxia-telangiectasia-mutated kinase. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜 (神奈川県

横浜市)

- ② Goto Y, Hosoya N, Miyagawa K: Expression of the meiosis-specific cohesion SMC1beta interferes with mitotic cohesion. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場 (愛知県 名古屋市)
- ③ Hosoya N, Miyagawa K: The synaptonemal complex protein SYCE2 induces chromosome instability through activation of ATM in cancer. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋国際会議場 (愛知県 名古屋市)
- ④ Hosoya N, Miyagawa K: SYCP3 is a novel BRCA2-interacting protein that induces genomic instability in cancer. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)
- ⑤ Goto Y, Hosoya N, Miyagawa K: Expression of the meiosis-specific cohesion SMC1beta impairs genomic stability in mitotic cells. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場 (大阪府 大阪市)
- ⑥ Hosoya N, Miyagawa K: The synaptonemal complex protein SYCP3 inhibits the intrinsic homologous recombination pathway in cancer. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場 (大阪府 大阪市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA KIYOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40200133

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無