

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 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890095

研究課題名（和文）ファンconi貧血修復経路を分子標的とした脳腫瘍アルキル化剤の増感効果の検討

研究課題名（英文）*FANCD1* plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ.

研究代表者

近藤 夏子（KONDO NATSUKO）

京都大学 原子炉実験所 助教

研究者番号：00582131

研究成果の概要（和文）：テモゾロミド(TMZ)、ニムスチン(ACNU)は悪性グリオーマ（膠芽腫、退形性星細胞腫）の化学療法に使用されるアルキル化剤である。これらの治療効果は薬剤抵抗性の獲得のために限界がある。薬剤抵抗性のメカニズムには、多くの DNA 修復経路が関与し、薬剤効果はその寄与に強く左右されることが示唆されてきた。TMZ および ACNU による DNA 損傷の修復に DNA-DNA 鎖間修復として知られている Fanconi anemia 修復経路が関与し、その因子である *FANCD1* が増感の標的候補となることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Nimustine (ACNU) and temozolomide (TMZ) are DNA alkylating agents which are commonly used in chemotherapy for glioblastomas. ACNU is a DNA cross-linking agent and TMZ is a methylating agent. The therapeutic efficacy of these agents is limited by the development of resistance. In this work, the role of the Fanconi anemia (FA) repair pathway for DNA damage induced by ACNU or TMZ was examined. Cultured mouse embryonic fibroblasts were used: *FANCA*^{-/-}, *FANCC*^{-/-}, *FANCA*^{-/-}*C*^{-/-}, *FANCD2*^{-/-} cells and their parental cells, and Chinese hamster ovary and lung fibroblast cells were used: *FANCD1/BRCA2mt*, *FANCG*^{-/-} and their parental cells. Cell survival was examined after a 3 h ACNU or TMZ treatment by using colony formation assays. All FA repair pathways were involved in ACNU-induced DNA damage. However, *FANCG* and *FANCD1/BRCA2* played notably important roles in the repair of TMZ-induced DNA damage. The most effective molecular target correlating with cellular sensitivity to both ACNU and TMZ was *FANCD1/BRCA2*. In addition, it was found that *FANCD1/BRCA2* small interference RNA efficiently enhanced cellular sensitivity toward ACNU and TMZ in human glioblastoma A172 cells. These findings suggest that the down-regulation of *FANCD1/BRCA2* might be an effective strategy to increase cellular chemo-sensitization towards ACNU and TMZ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：FANCD1、テモゾロミド(TMZ)、塩酸ニムスチン(ACNU)、Homologous Recombination 修復経路、グリオブラストーマ

1. 研究開始当初の背景

(1)テモゾロミド(TMZ)、ニムスチン(ACNU)は悪性グリオーマ(膠芽腫、退形性星細胞腫)の化学療法に使用されるアルキル化剤である。20年以上ACNUを放射線治療と併用していたが、放射線単独の治療に比べて生存期間延長効果を認めていなかった。2005年TMZを使用した臨床試験では、放射線単独の治療に比べて、平均生存期間が12カ月から14.5カ月と2.5カ月延長した(1)。その後、2006年より日本でTMZが使用されるようになり、ACNUは再発の治療に用いられている。しかし、いまだ膠芽腫の生存期間は1年半に満たず、治癒にはほど遠い。これら治療効果は薬剤抵抗性の獲得のために限界がある。薬剤抵抗性のメカニズムは複雑で、多くのDNA修復経路が関与し、薬剤効果はDNA修復の寄与に強く左右されることが示唆されてきた。

(2) TMZはDNAのグアニンのO6部位をメチル化しO6-methylGにする。このO6-methylGはTとミスマッチペアを形成し、ミスマッチリペアが働きますが、修復できず複製の停止、崩壊、DNA二本鎖切断(DSB)に至る。ACNUはグアニンのO6部位をクロロエチル化しO6-chloroethylGとなり、DNA鎖間架橋を形成する。この鎖間架橋も複製の停止、崩壊、DSBに至る。

(3)O6メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)はこのO6-methylGまたはO6-chloroethylGをO6-Gに修復する酵素です。この修復酵素のMGMTはアルキル化剤の効果を増強する分子標的として注目され色々な試みがなされてきましたが、多くの腫瘍細胞ではMGMTの発現量、活性に差があるために十分な成果は得られていません。新たなアルキル化剤の増感効果を高める標的が求められています。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍の治療効果の向上を目的とする。アルキル化剤であるテモゾロミド(TMZ)およびニムスチン(ACNU)によるDNA損傷の修復にDNA-DNA鎖間修復として知られているFanconi anemia修復経路が関与するかどうか、増感の標的候補となるかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ノックアウトマウスから確立されたMEF細胞FANCA^{-/-}、FANCC^{-/-}、FANCD2^{-/-}CHO

細胞由来のFANCD1mt、FANCGmtおよびそれぞれの親株細胞を用いる。TMZ、ACNUを培地中に添加して3時間、37℃処理し、コロニー形成法にて生存率を算出する。

(2)標的とするsiRNAによって、ヒトグリオブラストーマA172細胞のACNU、TMZによるがん治療効果が増感するのかを検討する。

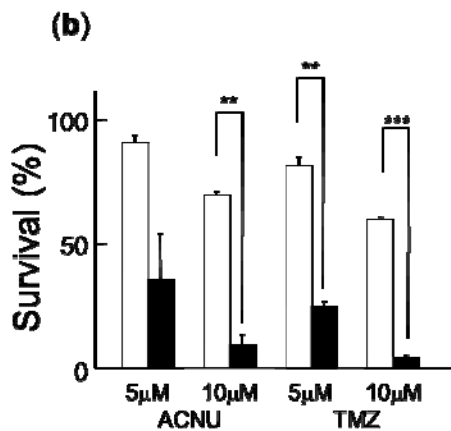
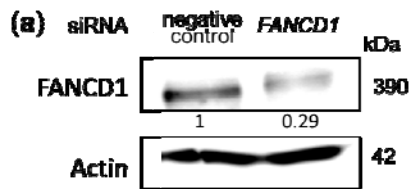
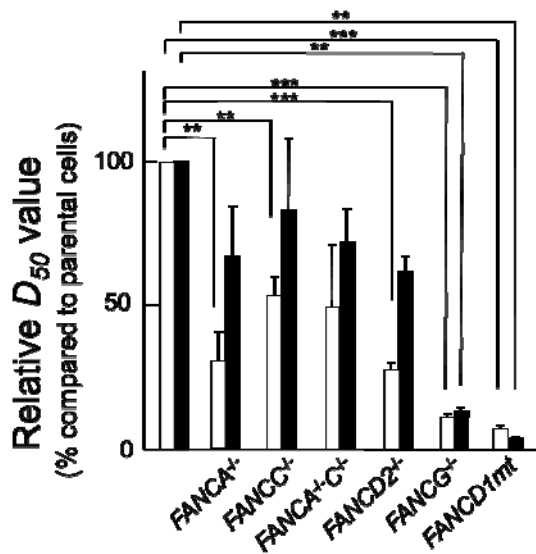
(3)FA修復経路を介して、Homologous Recombination(HR)修復が進むことが知られているので、TMZおよびACNU処理後に生じたDNA損傷がHR修復経路によって修復されるかどうかをRecombination Assay(Helleday T, et al, Carcinogenesis 19: 973-978, 1998.)によって調べる。

(4)さらに薬剤の増感の標的となるFANCD1のsiRNAを、A172細胞に導入した場合TMZおよびACNU処理後、HR修復経路にどのように影響するかを免疫細胞染色法によってHRの因子であるRad51のfociを定量的に数えて検討する。

4. 研究成果

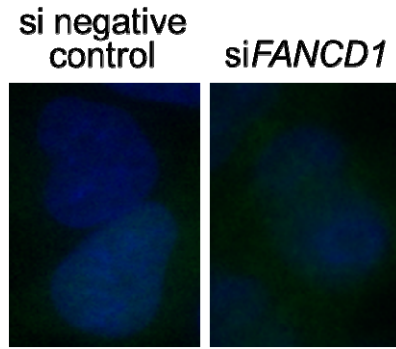
(1)それぞれの細胞のD50(50%生存率の薬剤濃度)を正常型のD50と比較し、%表示した相対的D50値を用いて細胞間で比較検討した。その結果、FANCGmt、FANCD1mtのTMZの相対的D50値は13.3%、4%を示した。FANCGmt、FANCD1mtのACNUの相対的D50値は10%、5.7%を示した。相対的D50値はTMZおよびACNUでFANCD1mtが最小となった。FANCD1はグリオブラストーマをTMZおよびACNUで治療する際の増感の標的候補となることが示唆された。このことから、薬剤の増感の標的となるFANCD1のsiRNAを、ヒトグリオブラストーマA172細胞に導入し、TMZおよびACNUによる殺細胞効果が増感するのかを検討する。

(2)FANCD1のsiRNAを、ヒトグリオブラストーマA172細胞に導入し、TMZおよびACNUによる殺細胞効果が増感するのかを検討してみた。その結果、FANCD1のノックダウンによって、TMZおよびACNUの殺細胞効果は著しく増感されることが確認できた。

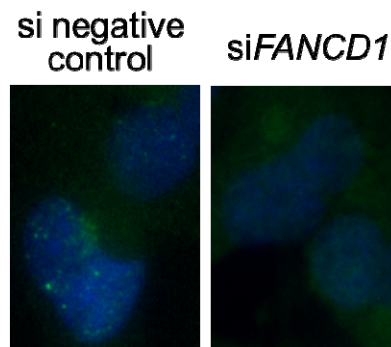


(3) TMZ および ACNU 処理後、Homologous Recombination (HR) 修復が誘導されることが確認できた。

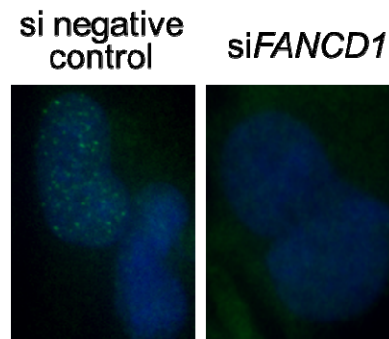
(4) A172 細胞に FANCD1 siRNA を導入し、TMZ および ACNU の処理をすると Negative control siRNA を導入した細胞に比べて著しく Rad51 の foci 形成が抑制された。結論として、FANCD1 をノックダウンすると、HR 修復が抑制されることにより TMZ および ACNU の殺細胞効果の増感が得られることが明らかになった。



control



12h after ACNU treatment



24h after TMZ treatment

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 4 件)

- ① Noda T, Takahashi A, Kondo N, et al. Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear core complex play a predominant role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage.

Biochem Biophys Res Commun、査読有、
2011、404(1)、206-210、
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.094>

- ② Kondo N, Takahashi A, et al.
FANCD1/BRCA2 plays predominant role in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ. PLoS One、査読有、2011、6(6)doi:10.1371/annotation/c6be24d1-bc23-43b4-ae01-b86dad174069.
- ③ Kondo N, Takahashi A, Mori E, et al.
DNA ligase IV is a potential molecular target in ACNU sensitivity. Cancer Science、査読有、Vol. 10、2010、1881-1885, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01591.x
- ④ Kondo N, Takahashi A, Ono K, et al.
DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways. Journal of Nucleic Acids、査読有、2010、doi:10.4061/2010/543531

[学会発表] (計3件)

- ① 近藤夏子、高橋明久、森英一朗、他。FANCD1の抑制はアルキル化剤で誘導される相同組換えのRad51活性を低減する。第29回日本脳腫瘍学会学術集会、2011年11月27日、水明館(岐阜県)
- ② Kondo N, Takahashi A, Mori E, et al.
Fanconi anemia 修復経路を分子標的としたTMZまたはACNUの増感効果の検討。第28回日本脳腫瘍学会学術集会、2010年11月29日、軽井沢
- ③ Kondo N, Takahashi A, Mori E, et al.
FANCD1 and FANCG play predominant roles in the repair of DNA damage induced by ACNU or TMZ. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 夏子 (KONDO NATSUKO)
京都大学 原子炉実験所 助教
研究者番号：00582131