

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591836

研究課題名(和文) がんの相同組換え修復能の特性に基づいた放射線治療とPARP阻害剤の併用療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic strategy utilizing PARP inhibitors in combination with radiotherapy based on cancer-specific abnormalities in homologous recombination

研究代表者

細谷 紀子 (Hosoya, Noriko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00396748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：SYCP3は、減数分裂に必要なシナプトネマ複合体を構成する分子の1つであり、正常の体細胞では発現しないが、がん細胞で異所性に発現する。SYCP3が体細胞でBRCA2と複合体を形成して相同組換え修復を抑制することを踏まえ、本研究では、SYCP3発現がんにおけるPARP阻害剤単剤および放射線やシスプラチンとPARP阻害剤の併用の有効性について検討を行った。その結果、SYCP3発現細胞では、PARP阻害剤に対する感受性が著しく亢進すること、そして、放射線やシスプラチンとの併用によってその感受性がさらに高まることが明らかとなった。この成果は、SYCP3発現がんに対する治療開発の基盤となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：SYCP3 is one of the components of the synaptonemal complex, the structure essential for meiotic recombination. The protein is not expressed in normal mitotic cells, but is aberrantly expressed in various cancers. Since we have found that SYCP3 inhibits homologous recombination by interfering with BRCA2 in mitotic cells, in this study, we examined whether the mitotic cells expressing SYCP3 is sensitive to the PARP inhibitor or combination therapies of the PARP inhibitor and agents that exert anti-tumor activities by inducing DNA double-strand breaks. Cells expressing SYCP3 showed extreme hypersensitivity to the PARP inhibitor NU1025, and pretreatment with radiation or cisplatin markedly enhanced this hypersensitivity. These findings would serve as a molecular basis for developing novel therapies for SYCP3-expressing tumors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：癌 相同組換え 放射線 PARP阻害剤

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝性乳がんの原因遺伝子である *BRCA1* または *BRCA2* に変異を有するがんにおける分子標的治療として、DNA 一本鎖切断修復に關与する poly (ADP-ribose) polymerase(PARP)の阻害剤の有効性が実験的に証明され、臨床試験も多数進められている。PARP 阻害剤を投与すると、DNA 一本鎖切断が修復されずに、いずれ二本鎖切断へ変換される。正常の細胞では、これらの二本鎖切断は相同組換えによって修復されるため、細胞死は起こらない。一方、*BRCA1* または *BRCA2* の変異を有するがん細胞では、相同組換え修復が行えず、二本鎖切断が残存するために細胞死に至る。このように、ある生体機能の發揮において互いに補完し合う2つの経路があり、どちらか一方の経路の阻害では致死に至らないが、両方の経路が阻害されると致死に至ることを「合成致死」という。

この合成致死を利用した PARP 阻害剤による治療の原理は、*BRCA1* または *BRCA2* に変異がなくとも、相同組換え修復が抑制されているがんに対して広く応用可能であると考えられる。したがって、がんにおける相同組換え修復を抑制する機序を新たに同定することは、PARP 阻害剤の適応拡大に大きく貢献することが期待できる。

2. 研究の目的

近年、生殖細胞に特異的に発現し、正常の体細胞においては一切発現しないと考えられてきた減数分裂関連分子の中に、がんにおいて異所性に発現するものが存在することが報告され、その特異的な発現のパターンから「がん精巢抗原」とも呼ばれ、がん治療における標的分子の候補として着目されてきた。しかしながら、がん精巢抗原の体細胞における役割については殆ど明らかにされていなかった。研究代表者らは、がん精巢抗原の中で、減数分裂期の相同組換えに關与する分子群に着目し、体細胞で異所性に発現した場合に体細胞の相同組換え修復能に及ぼす影響について検討してきた。

SYCP3 は、減数分裂期の相同組換えにおいて必須であるシナプトネマ複合体の構成蛋白質の1つであり、生殖細胞に発現し、正常の体細胞では発現しないが、低メチル化により様々ながんで発現する。研究代表者らは、SYCP3 が体細胞において発現すると、遺伝性がん抑制遺伝子産物 *BRCA2* と複合体を形成することにより相同組換え修復を抑制し、DNA 二本鎖切断を引き起こす放射線やシスプラチンの感受性を亢進させることを発見した。

SYCP3 を発現したがん細胞においては、*BRCA2* の相同組換え機能が低下しているため、PARP 阻害剤単剤、もしくは、PARP 阻

害剤と放射線あるいはシスプラチンの併用療法が有効であることが予測される。

本研究では、以上の背景を踏まえ、① SYCP3 を発現するがん細胞に対する PARP 阻害剤単剤、および、放射線と PARP 阻害剤の併用療法の有用性の基礎的検討を行うとともに、② SYCP3 が *BRCA2* と複合体を形成することによって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を行い、さらに、③ がん特異的な相同組換え修復能の変化を誘導する制御因子の探索を行うことにより、個々のがんの相同組換え修復能の特性に基づいた個別化がん治療を開発するための分子遺伝学的基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SYCP3 発現細胞における PARP 阻害剤単剤の有効性の検討

SYCP3 を安定発現させた正常上皮細胞 RPE と空の発現ベクターを導入した SYCP3 非発現細胞に対し、PARP 阻害剤である NU1025 を $0 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ 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。

また、SYCP3 を発現するがん培養細胞株において、RNA 干渉法を用いて SYCP3 の発現を抑制し、PARP 阻害剤である NU1025 を $150 \mu\text{M}$ ~ $300 \mu\text{M}$ の最終濃度で添加し、1~2週間後のコロニー数を計数し、細胞生存率を評価する。

(2) SYCP3 発現細胞における PARP 阻害剤と放射線またはシスプラチンの併用療法の有効性の検討

SYCP3 を安定発現させた RPE 細胞と空の発現ベクターを導入した SYCP3 非発現細胞に対し、放射線 0.5Gy ~ 2Gy を照射後、もしくは、シスプラチン $4 \mu\text{M}$ で1時間処理した後に、PARP 阻害剤である NU1025 を $0 \mu\text{M}$ から $100 \mu\text{M}$ 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。

(3) SYCP3 が *BRCA2* と複合体を形成して相同組換え修復を抑制する分子機序の解析

BRCA2 蛋白質は中央領域の BRC リピートモチーフおよびカルボキシル末端において RAD51 分子と直接結合し、DNA の二本鎖切断の相同組換え修復の初期過程に直接關与する。研究代表者らの検討により、SYCP3 発現細胞においては、DNA 損傷後の *BRCA2* と RAD51 の結合が抑制されることが分かっている。これが、*BRCA2* における RAD51 との結合領域に SYCP3 が競合して結合するために起こるのか、それとも、*BRCA2* の全く別の部位に SYCP3 が結合して遠隔制御により *BRCA2* と RAD51 の結合を阻害しているために起こるのかについ

ては明らかになっていない。

そのため、FLAG-タグを付加した BRCA2 の様々な領域の欠失変異体を発現するベクターを作製し、これらをそれぞれ HA-タグを付加した SYCP3 とともに COS7 細胞で共発現させ、抗 HA 抗体による共免疫沈降と抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法により、SYCP3 と各 BRCA2 欠失変異体の結合の有無とその強弱を調べ、SYCP3 と結合する BRCA2 の領域を同定する。

4. 研究成果

SYCP3 発現細胞は、SYCP3 非発現細胞に比べ、PARP 阻害剤の単剤に対して極めて高い感受性を示した。また、放射線やシスプラチンとの併用によってその感受性がさらに高まることも明らかとなった。SYCP3 を発現するがん細胞株である HepG2, HeLa, MCF 細胞において RNA 干渉法により SYCP3 の発現を抑制すると、逆に、PARP 阻害剤に抵抗性を示すようになることも確認された。

睪臓がん細胞株 Capan1 は、BRCA2 の変異を有しており、SYCP3 も発現している。Capan1 において SYCP3 の発現を抑制したところ、PARP 阻害剤に対する感受性の変化は認めなかった。このことから、SYCP3 発現による PARP 阻害剤に対する感受性の亢進が BRCA2 の機能抑制を介した相同組換え修復機構の抑制と関係することが証明された。

以上の結果から、SYCP3 を発現するがんにおいて、PARP 阻害剤単剤を用いた治療が有効であり、PARP 阻害剤と放射線、もしくは、シスプラチンを併用する治療も一層有効である可能性が示唆される。これまで、PARP 阻害剤は BRCA1 または BRCA2 の変異を有するがんに対して有効であるとされてきたが、本研究成果は、PARP 阻害剤の適応を、BRCA1 や BRCA2 の変異のない SYCP3 発現陽性のがんに対しても拡大できる可能性を示唆するものである。SYCP3 がさまざまな散発性のがんで発現していることから、この治療戦略は幅広いがんにおいて応用できることが期待される。

このように、がん特異的に相同組換え修復を制御する因子を同定することは、個々のがんの相同組換え修復能の特性に基づいた新しいがん治療の開発につながるため、SYCP3 以外の相同組換え修復能の制御因子についても探索を進めている。

また、BRCA2 における SYCP3 との相互作用部位の探索の結果、相互作用部位は複数存在し、また、RAD51 分子と結合する BRCA2 の中央領域の BRC リポート領域とは異なる領域に存在することも分かった。SYCP3 による相同組換え修復の抑制機構については、さらなる解析が必要である。

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 5 件)

- ① Hosoya N, Miyagawa K. Targeting DNA damage response in cancer therapy. *Cancer Sci*, 105(4): 370-388. 2014. 査読有
doi: 10.1111/cas.12366.
- ② Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, Wada-Hiraike O, Kashiyama T, Enomoto A, Hosoya N, Koso T, Fukuda T, Inaba K, Sone K, Uehara Y, Kurikawa R, Nagasaka K, Matsumoto Y, Arimoto T, Nakagawa S, Kuramoto H, Miyagawa K, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T. Anti-tumor activity of olaparib, a poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. *BMC Cancer*, 14(1):179. 2014. 査読有
doi: 10.1186/1471-2407-14-179.
- ③ 細谷紀子: 放射線の晩発影響 *BIO MEDICA*, 27(5): 39-44, 2012. 査読無
- ④ 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.
- ⑤ 細谷紀子: がんにおけるゲノム不安定性細胞, 43(6): 13- 16, 2011. 査読無

[学会発表] (計 14 件)

- ① 細谷紀子, 藤井義大、宮川清: がん精巣抗原 SYCE1 の体細胞発現による DNA 損傷抵抗性の誘導. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日、神戸国際展示場 (兵庫県 神戸市)
- ② 後藤悌、細谷紀子、宮川清: 減数分裂特異的分子 SMC1beta は、体細胞において、コヒーシと干渉し、DNA の二重鎖切断の修復を阻害する. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
- ③ Hosoya N, Miyagawa K. The cancer-testis antigen SYCE2 impairs chromosome stability by activating ATM. *Chromatin, Replication and Chromosomal Stability 2013*, BRIC, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, June 18, 2013.

- ④ 細谷紀子, 宮川清 : The meiosis-specific synaptonemal complex proteins modulate the intrinsic homologous recombination pathway in human cancer cells. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県 福岡市)
- ⑤ 細谷紀子 : がん精巣抗原によるゲノム不安定性の誘導と治療応用. 日本女性科学者の会第9回学術大会、2012年10月8日、アルカディア市ヶ谷(東京都 新宿区)
- ⑥ Hosoya N, Miyagawa K : The synaptonemal complex protein SYCE2 activates ATM and induces chromosome instability in tumors. 第74回日本血液学会、2012年10月20日、国立京都国際会館(京都府 京都市)
- ⑦ Hosoya N, Miyagawa K : The role for a meiosis-specific protein in regulating DNA damage response and chromosome stability in cancer. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、札幌市教育文化会館(北海道 札幌市)
- ⑧ 細谷紀子 : ヒトがん細胞における異所性発現分子によるDNA損傷応答の多様な制御機構. 日本放射線影響学会第55回大会、2012年9月7日、東北大学川内北キャンパス(宮城県 仙台市)
- ⑨ 細谷紀子, 宮川清 : がんにおける減数分裂特異的分子の異所性発現の生物学的役割の解明. 第49回日本臨床分子医学会学術集会、2012年4月14日、みやこめっせ(京都府 京都市)
- ⑩ 細谷紀子, 宮川清 : 減数分裂特異的分子SYCP3の体細胞発現の生物学的役割 第119回小児血液腫瘍懇話会、2012年2月17日、東京医科歯科大学(東京都 文京区)
- ⑪ 細谷紀子 : 減数分裂特異的分子の体細胞発現による中心体異常の誘導. 第3回中心体研究会、2011年12月17日、東京理科大学森戸記念館(東京都 新宿区)
- ⑫ 細谷紀子, 宮川清 : 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)

- ⑬ 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)
- ⑭ 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 紀子 (HOSOYA NORIKO)
 東京大学・大学院医学系研究科・講師
 研究者番号：00396748

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無