

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 23 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592544

研究課題名(和文) 頭頸部癌に対するDNA修復阻害遺伝子導入による化学療法および放射線療法増感効果

研究課題名(英文) Sensitization for chemotherapy and radiation by gene induction which suppresses DNA repair in head and neck cancer

研究代表者

山下 拓 (Yamashita, Taku)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・その他部局等・准教授)

研究者番号：00296683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：2本鎖DNA切断(DSB)修復に関わる蛋白NBS1の変異型遺伝子(mNBS1)を導入したウイルスベクターAd-NBS1の腫瘍細胞への導入効率、抗腫瘍効果、シスプラチン治療増感効果を確認した。また1本鎖DNA切断(SSB)修復に関わるPARPの阻害薬を併用することでさらに著明な抗腫瘍効果の増強を確認した。シスプラチン耐性のメカニズムは転写因子p63を介したDNA修復蛋白の産生亢進が関与するが、Ad-NBS1の作用機序はp63を介さず直接MRN蛋白の発現抑制を引き起こし、DSB近傍でのH2AX発現を端緒としたDNA修復機構の不活化がシスプラチン増感効果のメカニズムであることが示された。

研究成果の概要(英文)：We used recombinant adenovirus vector(Ad-NBS1) introduced mutant type of NBS1 protein which is associated with double strand breaks(DSB) repair of DNA. We confirmed good introduction rate of Ad-NBS1 for tumor cells, significant antitumor effect of Ad-NBS1, and obvious sensitization in using with cisplatin in vitro. In addition, by using PARP inhibitor which suppresses the repair of single strand breaks (SSB) as well as the combination of cisplatin and Ad-NBS1, more significant sensitization of antitumor effect was observed. The increase of production in DNA repair proteins such as MRE11, NBS1 and RAD50(MRN) through a transcription factor p63 was associated with cisplatin resistant of tumor cells. However, the functional mechanism of Ad-NBS1 was not through p63, but directly suppressed MRN proteins and resulted in not working DNA repair function through H2AX near DSB normally.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：遺伝子治療 頭頸部癌 遺伝子修復 DNA切断

1. 研究開始当初の背景 シスプラチンは、頭頸部癌化学療法における key drug である。腫瘍細胞に取り込まれた後、その DNA に結合または架橋を作り 1 本鎖 DNA 障害 (SSB) を引き起こす。この SSB は、腫瘍細胞が分裂する際に起こる DNA の複製時に 2 本鎖 DNA 切断 (DSB) という細胞にとって致命的な DNA 障害に変化する。これがシスプラチンの抗癌作用のメカニズムである。しかし一部の頭頸部癌はシスプラチンに耐性を持っており、また感受性を示す頭頸部癌においても化学療法の使用回数に応じて体制を獲得することが知られている。その耐性獲得に SSB あるいは DSB 修復機能の亢進が関与するとの仮説に基づき、以下そのメカニズムの解明、および DNA 修復機能の阻害によるシスプラチン増感効果が得られるかについて検討する。

2. 研究の目的

- (1) 頭頸部癌のシスプラチンへの耐性の作用機序の一つとして DSB 修復活性の向上が関与しているとの仮説を立て、そのメカニズムの解明を目指した検討を *in vitro* で行う。
- (2) DSB 修復活性において主要な役割を果たす NBS1 蛋白質に着目し、その変異遺伝子 (mNBS1) を導入したウイルスベクター (Ad-NBS1) を作成し、これを用いたシスプラチンの増感効果およびそのメカニズムの解明を行う。
- (3) さらに 1 本鎖 DNA 障害 (SSB) の修復に重要な役割を持つ PARP-1 の阻害剤 (PARP 阻害剤) を Ad-NBS1 に併用し SSB、DSB 双方の修復阻害を行うことでより一層のシスプラチン増感効果が期待できると予想される。その証明及びメカニズムの解明を行う。

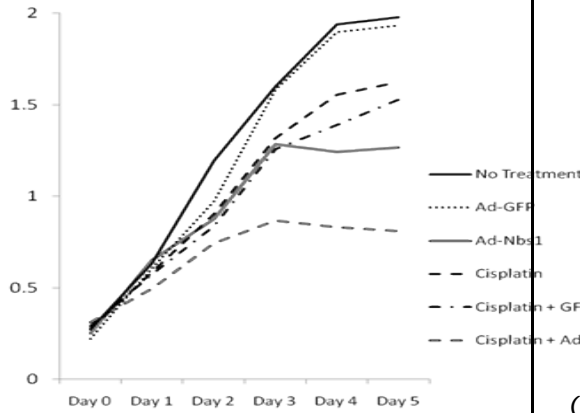
3. 研究の方法

- (1) MTT アッセイにて、各種頭頸部癌細胞株に対する Ad-NBS1、Ad-GFP の抗腫瘍効果を *in vitro* にて検討した。
- (2) 中性条件下のコメットアッセイを用いてそれぞれの治療群における DSB 量を測定した。
- (3) シスプラチン耐性頭頸部扁平上皮癌株 (JHU006) に対して、シスプラチンと Ad-NBS1 の併用治療を *in vitro* で検討した。
- (4) Ad-NBS1 に加え PARP-1 という 1 本鎖 DNA 修復酵素の阻害剤を用いて *in vitro* においてヒト頭頸部扁平上皮癌の増殖抑制効果を MTT assay で検討した。
- (5) アルカリおよび中性条件下のコメットアッセイにより 1 本鎖 DNA 損傷および 2 本鎖 DNA 損傷の量の検討を行った。
- (6) p63 は NBS1 と複合体を形成する Mre11, Rad50 の転写因子である。そこで頭頸部扁平上皮癌由来のシスプラチン感受性細胞株とシスプラチン耐性細胞株に対し、*in vitro* でシスプラチンによる刺激を行い各 mRNA、蛋白の発現変化を RT-PCR およびウエスタンブロットで検討した。
- (7) Ad-NBS1 をシスプラチンとともに加えた際の、各種蛋白量の変化をウエスタンブロットで半定量的に検討した。
- (8) Ad-NBS1 のシスプラチン増感効果の作用機序として、p63 以外の経路として H2AX に着目し、ウエスタンブロットおよび免疫沈降法によるメカニズムの検討を行った。

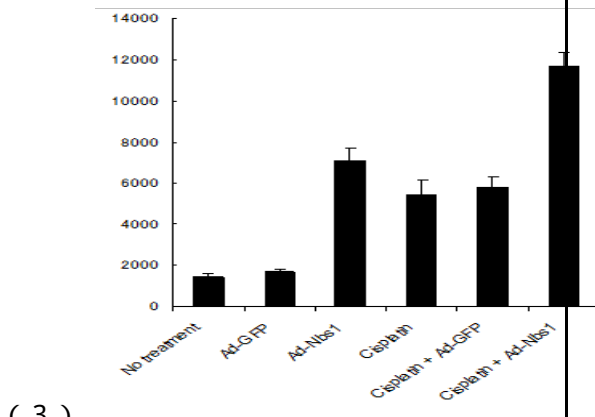
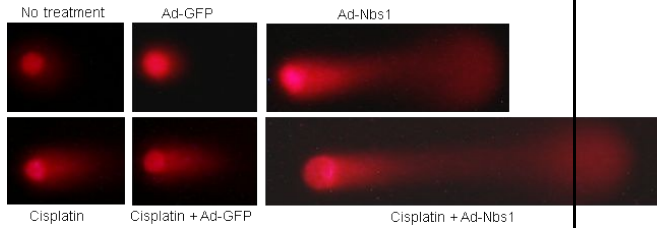
4. 研究成果

- (1) MTT アッセイの結果、Ad-GFP (コントロールベクター) は治療群に比較しても抗腫瘍効果を示さなかったが、

Ad-NBS1 は MOI=5 において有意な抗腫瘍効果を示した。



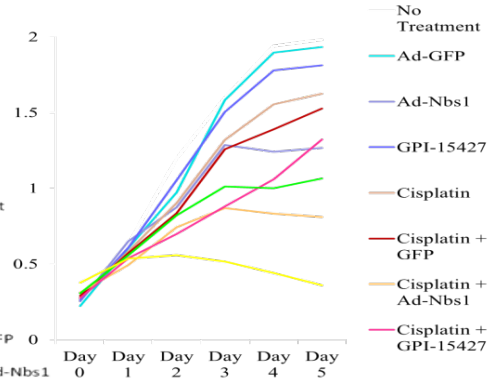
(2) 中性条件下のコメットアッセイの結果 Ad-NBS1 治療群において DSB 量の有意な増加がみられ、Ad-NBS1 による DSB 修復阻害効果が抗腫瘍効果に役割を果たしていることが示唆された。



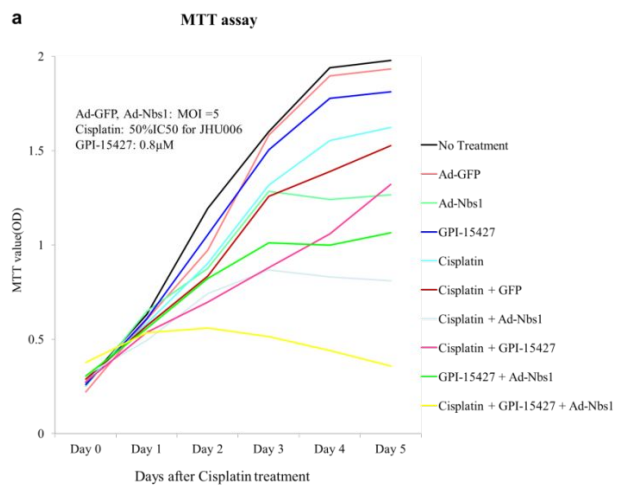
(3) JHU006 に対して、シスプラチンと Ad-NBS1 の併用治療を *in vitro* で検討した結果 Ad-NBS1 はシスプラチン治療において有意な増感効果を示すことが判明した。

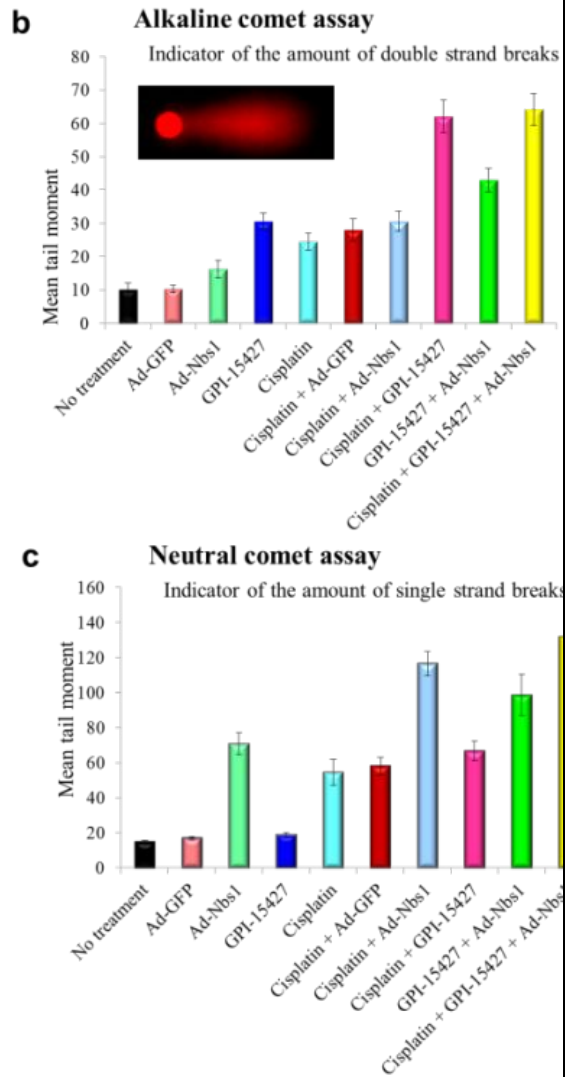
(4) MTT assay で検討した結果、シスプラチンに併用した際の効果として変異型 NBS-1 導入単独に比べ PARP 阻害

薬 (GPI-15427) を併用した群において細胞増殖抑制効果が強く見られた。



(5) アルカリおよび中性条件下のコメットアッセイにより PARP 阻害薬を併用した群では、変異 NBS1 導入のみの群と比較して 1 本鎖 DNA 損傷の量が増加しただけでなく 2 本鎖 DNA 損傷の量も有意に増加した。これは PARP 阻害薬によりシスプラチンにより形成された 1 本鎖 DNA 損傷の修復が阻害されたままに残り、細胞分裂時により多くの 2 本鎖 DNA 損傷を生み出し細胞死へ導かれたと考えることができる。

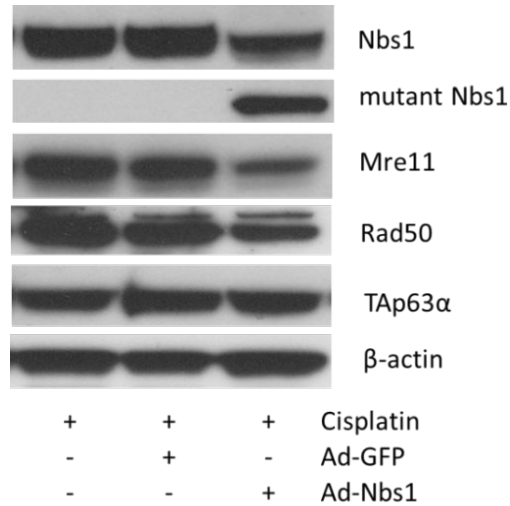




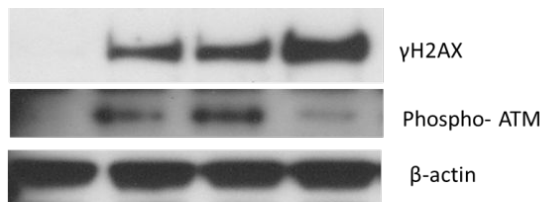
(6) RT-PCR およびウエスタンブロットの結果、シスプラチン投与前のベースラインでは発現量に大きな差は認めなかったが、シスプラチン刺激後 mRNA は 24 時間後をピークとする発現亢進が、蛋白は 24 時間 ~ 72 時間後まで、感受性株に比較し耐性株において各蛋白 (p63, Mre11, Rad50, NBS1) の発現亢進が見られ、DNA 修復機能が亢進していると考えられた。次に siRNA にて p63 をノックダウンすると Mre11, Rad50 の蛋白産生が抑制されることが示された。

(7) Ad-NBS1 をシスプラチンとともに加えると変異型 NBS1 (mNBS1) 蛋白の発現を確認でき、またそれに伴い野生型 NBS1 の発現の抑制が起こるこ

とが示された。この時、Mre11, Rad50 の発現も抑制されているが p63 の発現には変化がなかった。以上のより、シスプラチン耐性には転写因子 p63 を介した DNA 修復蛋白の産生更新が関与するが Ad-NBS1 の作用機序は p63 を介さず MRN 蛋白の発現抑制が起こっていることが判明した。



(8) Ad-NBS1 のシスプラチン増感効果の作用機序として、p63 以外の経路として H2AX に着目した。二本鎖 DNA 障害 (DSB) が生じると、その物理的的近傍で H2AX のリン酸化が起こり γ H2AX となる。今年度の研究でウエスタンブロットにて、頭頸部癌細胞株に対するシスプラチン投与により γ H2AX が増加していること、コメットアッセイにより、これが DSB の増加に比例していることが判明した。また共役免疫沈降法にて野生型 NBS1 は γ H2AX に結合するが、Ad-NBS1 に挿入した変異型 NBS1 は γ H2AX との結合部位を有さず H2AX のリン酸化を維持できないことが示された。以上より Ad-NBS1 投与により DSB 近傍での γ H2AX 発現を端緒とした DNA 修復機構が働かないことが Ad-NBS1 によるシスプラチン増感効果のメカニズムと考えられた。



-	+	+	+	Cisplatin
-	-	+	-	Ad-GFP
-	-	-	+	Ad-Nbs1

5 . 主な発表論文等

雑誌論文 (計 5 件)

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Matsushita K, Shimada H, Shiotani A. Tacrolimus Prevents Laryngotracheal Stenosis in an Acute Injury Rat Mode. *Laryngoscope* 2015 Jun;125(6):E210-5. doi: 10.1002/lary.25178.

Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Shimada H, Matsushita K, Shiotani A. Gene therapy of c-myc suppressor FUSE-binding protein interacting repressor by Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis. *Plos One* 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0116269

Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Ohnuki K, Umeda IO, Fujii H, Kosuda S, Shiotani A. Novel Indocyanine Green-Phytate Colloid Technique for Sentinel Node Detection in Head and Neck: Mouse Study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014 Apr 14;151(2):279-285.

Nobuaki Tanaka, Koji Araki, Daisuke Mizokami, Yoshihiro Miyagawa, Taku Yamashita, Masayuki Tomifuji, Yasuji Ueda, Makoto Inoue, Kazuyuki Matsushita, Fumio Nomura, Hideaki Shimada, and Akihiro Shiotani. Sendai

Virus-mediated Gene Transfer of the c-myc Suppressor Far-upstream Element Binding Protein Interacting Repressor Suppresses Head and Neck Cancer. *Gene Therapy* 2015 Apr;22(4):297-304. doi: 10.1038/gt.2014.123.

Lajud SA, Nagda DA, Yamashita T, Zheng J, Tanaka N, Abuzeid WM, Civantos A, Bezpalko O, O'Malley BW Jr, Li D. Dual Disruption of DNA Repair and Telomere Maintenance for the Treatment of Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Oct 16. pii: clincanres.0176.2014.

(9) 学会発表 (計 5 件)

Araki K, Mizokami D, Tomifuji M, Yamashita T, Kosuda S, Shiotani A : Feasibility animal study of novel ICG sentinel node detection technique in head and neck region. 2013 AAO-HNSF Annual Meeting, 2013, Vancouver, Canada.

Mizokami D, Araki K, Yamashita T, Tanaka N, Tomifuji M, Shiotani A : Tacrolimus prevents the development of Laryngo-tracheal stenosis in the novel rat model. 2013 AAO-HNSF Annual Meeting, 2013, Vancouver, Canada.

Tanaka N, Araki K, Mizokami D, Yamashita T, Tomifuji M, Ueda Y, Inoue M, Kasegawa M, Matsushita K, Nomura F, Shimada H, Shiotani A : Novel gene therapy for head & neck squamous cell carcinoma – Sendai virus mediated FUSE binding protein interacting repressor (FIR) therapy. The 8th International Conference on Head and Neck Cancer, American Head and

Neck Society 2012, Toronto, Canada.

山下拓: DNA 修復阻害によるシスプラチン増感治療. 第 6 回頭頸部癌学会基礎研究会, 2012, 松江.

Yamashita T, Miyamoto S, O'Malley BW, Li D : The role of MRN complex and PARP1 for cisplatin-based chemoresistance. American Association for Cancer Research(AACR) 102nd annual meeting, 2011, Orlando, FL, USA.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山下 拓 (YAMASHITA, Taku)
防衛医科大学校・耳鼻咽喉科・准教授
研究者番号 : 0 0 2 9 6 6 8 3

(2) 研究分担者

荒木幸仁 (ARAKI, Koji)
防衛医科大学校・耳鼻咽喉科・講師
研究者番号 : 7 0 3 1 7 2 2 0