

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23791503

研究課題名（和文） Plk1 過剰発現と抗癌剤感受性

研究課題名（英文） Drug sensitivity of PLK1-overexpressing cancer

研究代表者

佐藤 工 (SATO KO)

聖マリアンナ医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30598462

研究成果の概要（和文）：予後不良とされる PLK1 過剰発現癌は Camptothecin, PARP 阻害薬に対し高い感受性を示すが、Mitomycin C には感受性を示さないことを証明した。

研究成果の概要（英文）：PLK1-overexpressing cancers are sensitive to Camptothecin and PARP inhibitor, but not to Mitomycin C.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：①PLK1 ②BRCA1 ③drug sensitivity

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞のみを選択的に死滅させる合成致死に基づく抗癌剤治療が注目されている。

一方で予後不良癌のバイオマーカーが多くの研究で明らかになってきている。分裂期リン酸化酵素である PLK1 過剰発現は多くの癌で過剰発現と予後不良の相関が証明されている。

このように確立された予後不良のバイオマーカーを利用し、合成致死に基づく効果的治療の開発が待たれる。

## 2. 研究の目的

申請者らは PLK1 過剰発現が家族性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA1 の酵素活性を抑制することを発見した。合成致死を利用して BRCA1 遺伝子変異を伴う乳癌細胞を選択的に死滅させる治療薬 PARP inhibitor (PARPi) が注目されており、理論上副作用の少ない理想的な治療薬として期待されている。申請者らは BRCA1 の酵素活性を失った細胞が PARPi だけでなく、Camptothecin (CPT) に対しても高い感受性を示すが、Mitomycin C (MMC) に対しては感受性を示

さないことを報告した。これらの発見から PLK1 過剰発現を伴う予後不良癌は、PARPi や CPT に対して高い感受性を示すが MMC に対しては感受性を示さないという仮説ができる。この仮説が証明されると、これまで治療困難であった予後不良癌に、副作用の少ない効果的治療を提供できることになる。本研究では、1. 細胞株を用い、PLK1 発現量が高い細胞と低い細胞のグループにわけ、それぞれの細胞の抗癌剤感受性を in vitro、および in vivo で比較、2. PLK1 による BRCA1 酵素活性抑制と薬剤感受性亢進のメカニズムを解明する予定である。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度：Plk1 過剰発現が相同組み換え修復 (homologous Recombination:HR) に及ぼす影響と培養細胞での抗癌剤感受性試験。

1. Plk1 過剰発現が BRCA1 の機能を抑制し、実際に HR を抑制するかを検討する。

2. 様々な細胞株における Plk1 発現量と薬剤感受性 (PARPi, CPT, MMC) の関連を検討する。  
平成 24 年度：Plk1 過剰発現が及ぼす抗癌剤感受性を培養細胞と実験動物で検討する。

1. Plk1 過剰発現モデル細胞を用い薬剤感受性に影響を及ぼすか検討する。

2. 上記実験で得られた結果に基づき、ヌードマウス等の免疫不全マウスの皮下に細胞株を注射し、抗癌剤感受性を皮下腫瘍の大きさから薬剤感受性を評価する。

#### 4. 研究成果

平成 23 年度の最初に行う予定であった PLK1 過剰発現と HR に及ぼす影響については後述する。

平成 23 年度は様々な癌細胞株を用い PLK1 発現量と抗癌剤感受性の関係を検討した。実際に 20 種類の癌細胞株を集めウエスタンブロッティングで PLK1 の発現量を確認し、Image Gauge (FUJIFILM)にて発現量を定量した。抗癌剤感受性はそれぞれの抗癌剤を様々な濃度で細胞を 5 日間培養し、生存率を Cell-titer Blue(Promega)を用い測定し、Prism software で I<sub>c50</sub> を算出した。PLK1 発現量は最も発現量の低い細胞を 1 として、5000 倍以上の PLK1 の発現量をもつ 8 種類の細胞株を PLK1-High グループとし、それ以外の 12 種類の細胞株を PLK1-Low グループとした。図 1 に示すごとく PLK1 発現量が高い細胞は低い細胞に比べ有為に CPT, PARPi に対し高い感受性を示すが MMC に対しては有意差がなかった。

次に平成 23 年度から 24 年度にかけて PLK1 の発現量が低い 12 種類の細胞株を用い PLK1 を過剰発現した stable cell を作製し、薬剤感受性を検討した。PLK1-Low グループの細胞全てで Stable cell line の作製を試みたが、U2OS でのみ作製できた。これは PLK1 過剰発現は toxic であり、限られた細胞株でのみ PLK1 過剰発現が許容されると考えられる。前述と同様、抗癌剤感受性試験を行い細胞生存率を図 2 に示す。PLK1 を過剰発現した細胞は CPT, PARPi に対し高い感受性を示したが、MMC に対する感受性は parental cell と差がなかった。この結果は確率できた二つのクローンで同様の傾向が見られた。

平成 24 年度にこれら 20 種類の細胞株を免疫不全マウスの皮下に接種し xenograft を作製し、in vivo での薬剤感受性も検討した。20 種類全ての細胞株で xenograft 作製を試みたが、9 種類の細胞株でのみ xenograft を作製することができた。細胞株接種後二週間の経過観察で xenograft が形成された。その後抗癌剤治療を二週間行い、治療終了時点で腫瘍縮小効果を PLK1 発現量の高いグループと低いグループとに分けて比較した。図 3 に示すとおり PLK1 発現量が高い細胞は CPT, PARPi に対し高い感受性を示すが、MMC に対しては差がないことを in vivo でも証明できた。

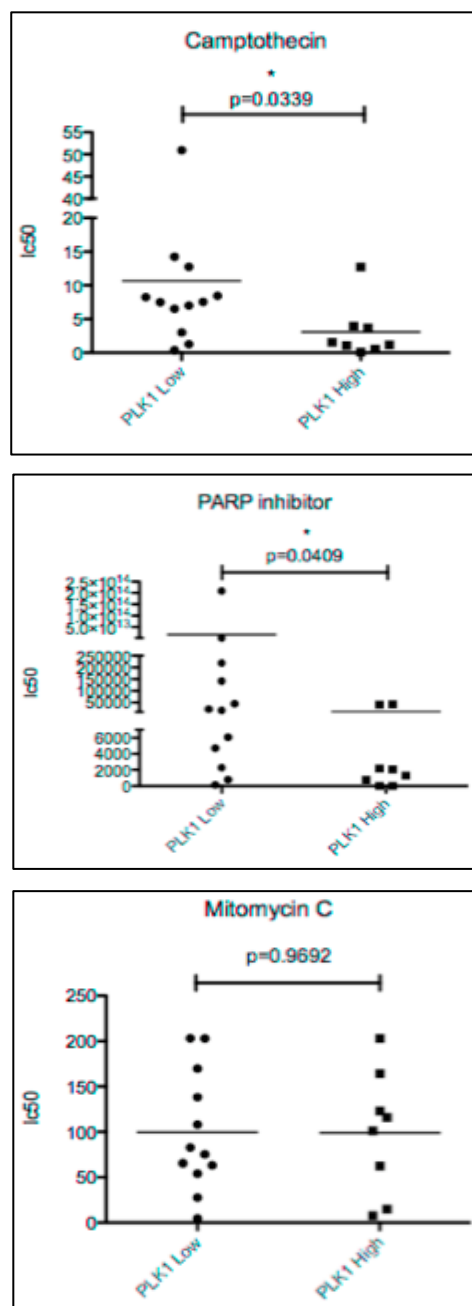


図1

平成 23 年度より PLK1 の過剰発現が HR に対しどのような影響を与えるか検討を続けているが、現在もまだ進行中である。現段階では、PLK1 過剰発現は HR を含む DNA ダメージ修復というより、抗癌剤治療後の細胞周期調整に影響を与えるように推察できる。今後もさらに検討する予定である。

現在臨床サンプル（卵巣癌の手術摘出検体）を用いた PLK1 発現量と抗癌剤感受性を検討中である。PLK1 発現量はウエスタンブロッティングのみでなく、組織免疫染色でも確認し、臨床応用へ有用な材料提供を目指している。PLK1 過剰発現が抗癌剤治療後の細胞周期に

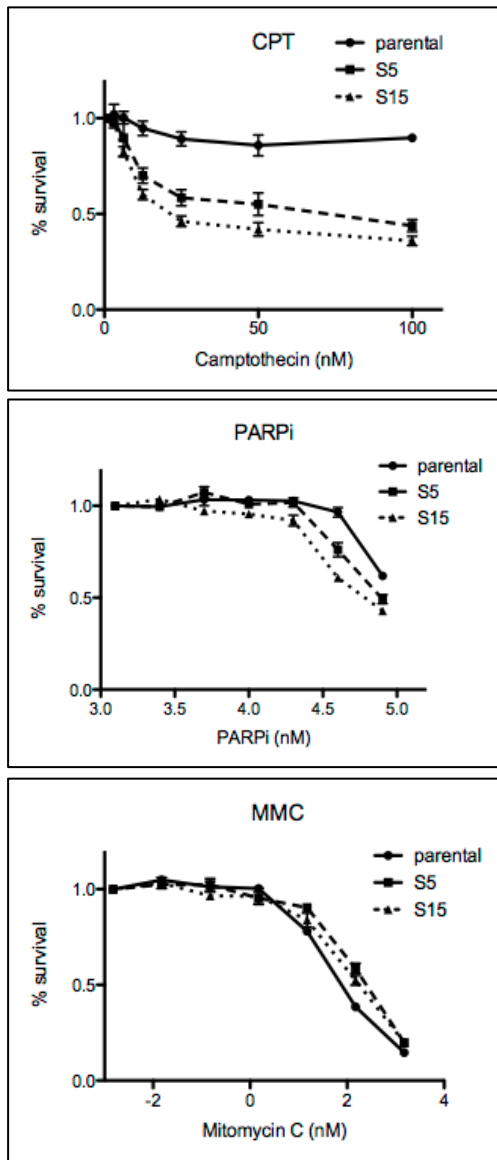


図2

与える影響、およびメカニズム、また臨床サンプルでの再現性が確認された時点で論文発表する予定である。

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)

Sato K, Sundaramoorthy E, Rajendra E, Hattori H, Jeyasekharan AD, Ayoub N, Schiess R, Aebersold R, Nishikawa H, Sedukhina AS, Wada H, Ohta T, Venkitaraman

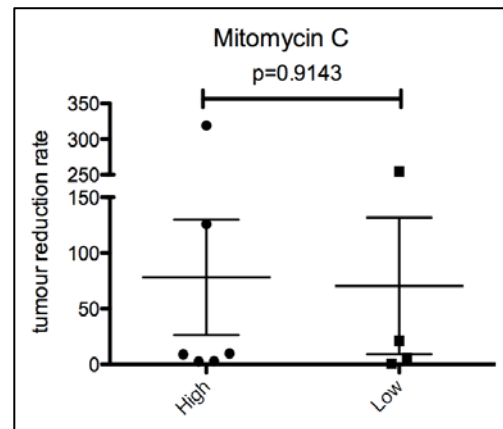
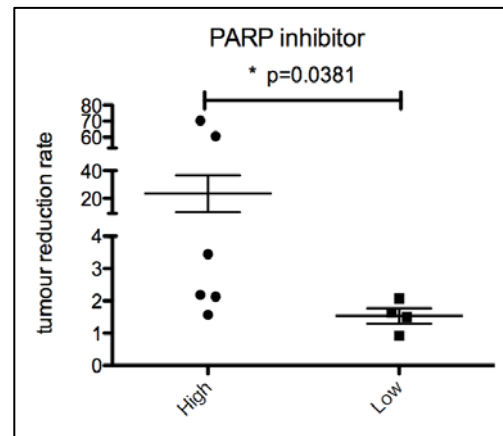
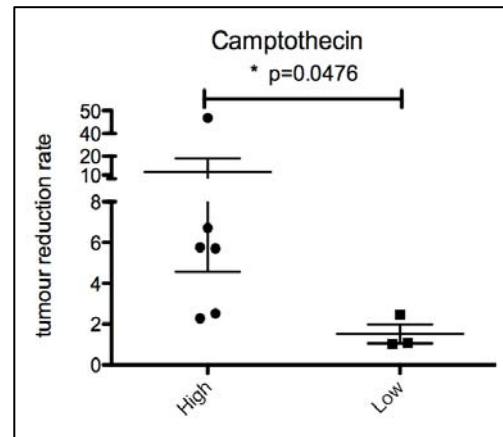


図3

AR. A DNA-Damage Selective Role for BRCA1 E3 ligase in Claspin Ubiquitylation, CHK1 activation, and DNA repair. *Curr. Biol.* 22, 1659-66, 2012

[学会発表] (計1件)

Ko Sato, Overexpression of PLK1 sensitises cells to Camptothecin and PARP inhibitor, but not to Mitomycin C, collaboration meeting at CNIC, Spain (招待講演)、2013年3月19日~3月21日、Madrid, Spain

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 工 (SATO KO)  
聖マリアンナ医科大学・医学（系）研  
究科（研究院）・助教  
研究者番号：30598462

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：