

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701028

研究課題名(和文) オキサリプラチンによる遺伝子発現調節機構の解明と新規抗癌剤併用療法の研究開発

研究課題名(英文) Mechanisms of dUTPase downregulation by oxaliplatin and its applications to combination chemotherapy

研究代表者

清成 信一 (KIYONARI, Shinichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70570836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：オキサリプラチンは5-フルオロウラシルをベースとした併用化学療法に用いられている。興味深いことに、癌細胞内のdUTPase遺伝子の発現はオキサリプラチン処理によって抑制されることが知られていたがその詳細な分子機構は解明されていなかった。本研究の結果からdUTPase遺伝子の発現抑制効果は代表的な白金系抗癌剤であるシスプラチンやカルボプラチンでは観察されず、オキサリプラチンに特徴的な化学構造によって誘起されていることが明らかとなった。この特異なDNA損傷応答の結果として複数の核酸代謝に関わる遺伝子の発現が抑制され、併用薬である5-フルオロウラシルの薬効が増強されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxaliplatin is used in 5-fluorouracil-based combination chemotherapy. Interestingly, the dUTPase gene expression was reportedly suppressed by p53 stabilization after oxaliplatin treatment, however, the detailed molecular mechanisms were unclear. We found that the suppression was not observed when colon cancer cells were treated with cisplatin and carboplatin. Because oxaliplatin and its analog, dacarbazine, can suppress dUTPase expression, the DNA damage response induced by 1,2-diaminocyclohexane (DACH) carrier ligand would be critical for the suppression effect. Our results suggested that oxaliplatin could enhance the cytotoxicity of 5-fluorouracil by regulating the expression of the genes that are implicated in thymidylate biosynthesis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：オキサリプラチン 5-フルオロウラシル 併用化学療法 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

進行性の大腸癌に対する標準的な併用化学療法としてフォリン酸、5-フルオロウラシル、オキサリプラチンの3剤併用療法 (FOLFOX) が用いられているが、白金系抗癌剤の一種であるオキサリプラチンが5-フルオロウラシルと相乗的な効果を発揮する分子メカニズムは十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

5-フルオロウラシルは癌細胞内で5-フルオロデオキシウリジン酸 (FdUMP) へと代謝され、dUMP を基質として dTMP を合成する酵素であるチミジル酸合成酵素の機能を阻害することで癌細胞内における DNA 合成を抑制している。近年、オキサリプラチンが誘起する DNA 損傷応答の結果としてチミジル酸合成に関わる遺伝子群の発現が抑制されることが報告された。なかでも、細胞内に蓄積した dUTP を加水分解してチミジル酸合成酵素の基質である dUMP を産生する酵素である dUTPase の遺伝子発現がオキサリプラチンによって抑制されることに注目し、その分子メカニズムを解明することで新規な白金系抗癌剤や併用化学療法の開発につながる学術的基盤を確立することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

第一世代型の白金系抗癌剤であるシスプラチンは古くから様々な癌種に対して使用されてきた。その一方でシスプラチンの副作用や薬剤耐性の問題を解決するために次世代型の白金系抗癌剤としてカルボプラチンやオキサリプラチンが開発された経緯がある (図1)。第三世代型の白金系抗癌剤であるオキサリプラチンによって dUTPase などの核酸代謝に関わる酵素群の遺伝子発現が抑制されることが報告されていたが、他の白金系抗癌剤について同様の現象が誘起されるかは不明である。そこで臨床的に用いられる上記の白金系抗癌剤と合わせて研究用試薬として市販されているシスプラチンやオキサリプラチンなどの類縁化合物を用い、代表的な大腸癌細胞株における dUTPase 遺伝子の発現抑制効果を検討することで本現象を誘起するために必要な白金系抗癌剤の化学構造を解明した。

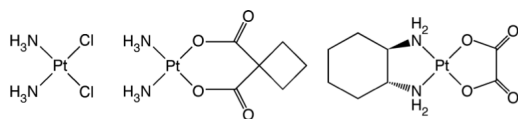


図1 代表的な白金系抗癌剤の化学構造

オキサリプラチンによる dUTPase 遺伝子の発現抑制効果はこれまでに大腸癌細胞株

HCT116 でのみ検証がなされており、HCT116 親株では抑制効果が観察される一方で癌抑制遺伝子 p53 を欠損した HCT116 株では本現象が観察されないとされていた。そこで本研究では HCT116 の他に様々な遺伝的バックグラウンドを有する大腸癌細胞株を用いて検証を行い、p53 の遺伝子変異や大腸癌細胞株で頻繁に観察されるミスマッチ修復遺伝子の変異と本現象との関連性を明らかにした。

シスプラチンやオキサリプラチンなどの白金系抗癌剤は DNA 中のグアニン塩基と反応し二本鎖 DNA 間のクロスリンクや一本鎖 DNA 内に白金付加体を形成することで DNA 複製を阻害することが知られている。歴史的な背景からシスプラチンによって誘起される DNA 損傷応答の詳細は明らかとなっているが、オキサリプラチンによって誘起される DNA 損傷応答の詳細は明らかとなっていない。そこで chk1 や chk2 などの DNA 損傷応答に関わる重要なキナーゼの発現量やリン酸化の状態をウエスタンブロッティングにより観察してオキサリプラチンによる DNA 損傷応答の詳細を明らかにした。また、各種 siRNA やキナーゼ阻害剤を用いてオキサリプラチン作用後の p53 安定化に関わる Ser15 のリン酸化をもたす責任キナーゼの同定を試みた。

核型の dUTPase の発現はプロモーター領域での転写因子 SP1 と E2F1 の結合によって制御されていることが明らかとなっている。先行論文ではオキサリプラチンの作用による p53 安定化とそれに伴う SP1 の機能阻害について議論がなされたがオキサリプラチン処理後の E2F1 の挙動については明らかとなっていないため、経時的な E2F1 蛋白質の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 白金系抗癌剤の化学構造的要因

p53 正常型の大腸癌細胞株 HCT116 を臨床的な血中濃度に近い濃度の白金系化合物で処理し、dUTPase 遺伝子の発現量や dUTPase 蛋白質量を調べた結果、dUTPase の発現抑制はオキサリプラチンとその類縁化合物であるダハプラチンでのみ観察された (図2)。

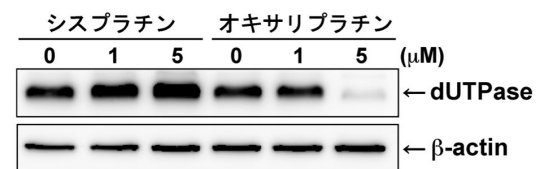


図2 オキサリプラチンによる dUTPase の発現抑制効果
HCT116 細胞をシスプラチン、オキサリプラチンで 48 時間処理したのちにウエスタンブロッティングにより細胞内の dUTPase 量を定量した。

オキサリプラチンとダハプラチンは共通して 1,2-diaminocyclohexane (DACH) を担

体配位子 (図 1 中、オキサリプラチンが有する Pt の左側の化学構造) として持つことから、DACH-Pt 付加体の形成に伴う DNA 損傷応答が dUTPase の発現抑制効果において重要であることが明らかとなった。市販されている様々な類縁化合物についても試験を行ったが、オキサリプラチンと同様の作用を持つ化合物は発見できなかった (図 3)。

また、オキサリプラチンは細胞内において代謝を受け、遊離基であるシュウ酸を生じさせることが知られているが、ダッハプラチンとの比較実験の結果からこのシュウ酸は dUTPase の発現抑制において必要ではないことが明らかとなった。シュウ酸によるカルシウムイオンなどのキレートがオキサリプラチンによる末梢神経毒性に関与しているとの報告があるが、本現象とは無関係であることが示唆された。

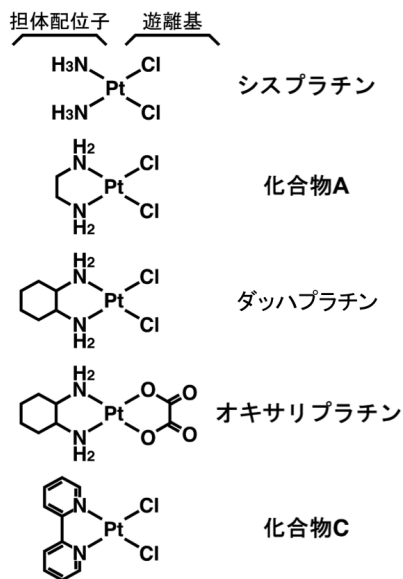


図 3 試験に用いた白金化合物の化学構造

(2) 大腸癌細胞株の遺伝的バックグラウンド

大腸癌細胞株として HCT116 wt, HCT116 p53 null, HCT116+chr3, LoVo, SW480 などを用いてオキサリプラチンによる dUTPase 発現抑制効果を試験したところ、p53 の機能が正常な細胞株でのみ本現象が観察された。したがってオキサリプラチンによる dUTPase 発現抑制による相乗効果は p53 正常型の癌患者でのみ観察される可能性がある。また、ミスマッチ修復遺伝子の変異の有無と本現象に直接的な関連は観察されなかった。興味深いことに、LoVo などではウエスタンブロッティングによって分子量の異なる核型の dUTPase (DUT-N) とミトコンドリア型の dUTPase (DUT-M) の両方が検出されたが、オキサリプラチンによる発現抑制は核型の dUTPase でのみ観察された。これはオキサリプラチンに起因する DNA 損傷応答によって特定のプロモーター構造をもつ遺伝子の発現が特異的に

抑制されうることを示す結果であると考えられた。ミトコンドリアの DNA 合成のタイミングは細胞の DNA 合成 (S 期) と一致していないため、オキサリプラチンによってミトコンドリア型の dUTPase の発現が抑制されないことは静止期にある細胞のミトコンドリア合成時に dUTP の取り込みを防ぐ機構が維持されることを示唆している。

(3) オキサリプラチンによる DNA 損傷応答と p53 の安定化

同濃度のシスプラチンとオキサリプラチンによって HCT116 を処理した場合、chk1, chk2 の状態に大きな差が見られた。シスプラチンではこれまでの報告通り、chk1 のリン酸化が観察され、ATR-chk1 パスウェイの活性化が示唆された。オキサリプラチンでは逆に chk1 蛋白質量の明らかな現象が観察され、p53 タンパク質の安定化との明瞭な逆相関が認められた。またこの時、chk2 の蛋白質量も若干の減少が観察された。オキサリプラチン処理では同濃度のシスプラチン処理と比べて p53 が効率的に安定化され、対応するように p53 の標的遺伝子である p21 の蛋白質量の増加も観察された。p21 の CDK インヒビターとしての機能に起因する chk1 遺伝子の発現抑制は既に報告されている。しかしながら、オキサリプラチンによる dUTPase の発現抑制に p21 遺伝子は不要であることが既に示されていることから、chk1 の発現抑制と dUTPase の発現抑制は全く別の機構であることが明らかとなった。

オキサリプラチン処理後に p53 の Ser15 における明確なリン酸化をウエスタンブロッティングにより確認したが、これまで報告されているように siRNA による DNA 損傷応答キナーゼ (ATM, ATR, chk1, chk2 など) のノックダウンは p53 のリン酸化および安定化に明確な影響を与えなかった。そこでオキサリプラチン処理時に p53 をリン酸化する責任キナーゼを明らかにするために各種 siRNA やキナーゼ阻害剤を利用したスクリーニングを実施したが同定に至らなかった。今後はキナーゼ遺伝子を標的とした siRNA や shRNA のライブラリーより網羅的なスクリーニングを行う必要があると考えられる。

(4) dUTPase 発現抑制における転写因子 E2F1 の役割

前述のように核型の dUTPase 遺伝子の発現は転写因子 SP1 と E2F1 によって調節されている。オキサリプラチン処理後、3, 6, 9, 12, 24, 48 時間後の p53 の安定化とそれに対応する p21 の発現量、E2F1 の発現量を観察したところ、p53 の安定化は 3 時間後から観察され、E2F1 蛋白質の発現量は 24 時間後にオキサリプラチン処理前と比べて 50% 程度まで減少し、48 時間後にはウエスタンブロッティングによる検出限界まで低下した。これと呼応するように核型の dUTPase 蛋白質の減少も観察さ

れ、p53 安定化後の E2F1 蛋白質の減少と dUTPase 蛋白質の減少に明確な相関があることが明らかとなった。

p53 は DNA 損傷やその他の細胞内ストレスにより安定化され転写調節因子として働くことで p21 などの細胞周期の停止に関わる遺伝子群の発現を上昇させる役割を有することが知られている。その一方でオキサリプラチン処理時に観察されるような p53 安定化後の遺伝子発現抑制のメカニズムの詳細は明らかとなっていない。発現抑制のターゲットとなる遺伝子のプロモーター領域に対して p53 が競合的に結合することで転写因子の機能を阻害する場合や SP1 に関して報告されているように p53 が転写因子に直接結合してその機能を阻害するメカニズムなどが提唱されている。また、近年では p53 の安定化に伴い転写が活性化されるノンコーディング RNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA) による蛋白質翻訳阻害によって特定の遺伝子の機能が抑制されるメカニズムが提唱されている。例えば p53 の安定化によって発現が誘導される mir-34 ファミリー (mir-34a, mir-34b, mir34c) によって細胞周期の進行やアポトーシスに参与する蛋白質群の機能が抑制されることが報告されている。なかでも E2F1 の転写を制御する E2F3 が mir-34a の標的であることが知られているため、この経路による dUTPase の発現抑制も十分に考慮すべきである。将来的にこのような観点からオキサリプラチンによる dUTPase 発現抑制の分子メカニズムが解明されることが期待される (図 4)。

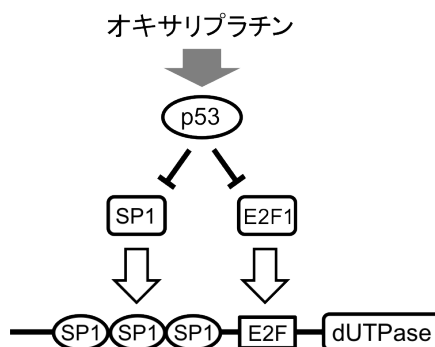


図 4 オキサリプラチンによる p53 安定化と転写因子群の抑制効果 (概念図)

SP1 の機能は p53 の直接的な作用により抑制を受け、E2F1 の機能は p53 によって発現が活性化された miRNA によって間接的に抑制を受ける。

また、dUTPase 遺伝子と同様にして転写因子 SP1 と E2F1 によって発現が調節されている遺伝子群が存在する。主に細胞周期の G1 から S 期への移行の際に活性化される遺伝子においてこのプロモーター構造が多く見られることから、オキサリプラチンの作用によって dUTPase のみならず他の DNA 合成に関わる遺伝子群の発現も抑制されている可能性

があり、今後はシスプラチン処理時とオキサリプラチン処理時の遺伝子発現パターンを比較した網羅的解析などを計画している。これにより 5-FU とオキサリプラチンの併用効果を説明する新たな遺伝子の発見につながるものと考えられる。

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 2 件)

Tuul M, Kitao H, Iimori M, Matsuoka K, Kiyonari S, Saeki H, Oki E, Morita M, Maehara Y, Rad9, Rad17, TopBP1 and claspin play essential roles in heat-induced activation of ATR kinase and heat tolerance

PLoS One, 8, e55361, 2013 (査読あり)

DOI: 10.1371/journal.pone.0055361

Sakasai R, Sakai A, Iimori M, Kiyonari S, Matsuoka K, Kakeji Y, Kitao H, Maehara Y, CtIP- and ATR-dependent FANCDJ phosphorylation in response to DNA strand breaks mediated by DNA replication

Genes to Cells, 17, 962-970, 2012 (査読あり)

DOI: 10.1111/gtc.12011

[学会発表](計 1 件)

清成 信一、オキサリプラチンによる dUTPase 遺伝子発現抑制の分子メカニズム
第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド、神戸市

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清成 信一 (KIYONARI, Shinichi)
名古屋大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70570836

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし