

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460930

研究課題名(和文) 消化器癌におけるATM発現とPARP阻害剤感受性の検討

研究課題名(英文) The efficacy of PARP inhibitor against gastrointestinal cancer

研究代表者

久保田 英嗣(Kubota, Eiji)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30405188

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)：本研究では、消化器癌なかでも胃癌を中心に、PARP阻害剤の有効性について検討を行った。これまでに、胃癌におけるAtaxia telangiectasia mutated (ATM) 蛋白発現レベルとPARP阻害剤の有効性には有意な相関を認めること、またPARP阻害剤の効果は、ATM阻害剤により増強することを見出した。PARP阻害剤とATM阻害剤の併用効果は、特にp53変異を有する胃癌細胞株で顕著に認められた。本研究により、胃癌患者においてPARP阻害剤のバイオマーカーとしてATMが有用である可能性、PARP阻害剤とATM阻害剤の併用がp53変異を有する胃癌に対し有効である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed the efficacy of PARP inhibitor is significantly associated with the expression level of Ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein. Additionally, we showed that ATM inhibitor sensitized the effect of PARP inhibitor in gastric cancer cell lines with p53 disruption. Our study demonstrated the utility of ATM as a biomarker of PARP inhibitor for gastric cancer patients. Moreover, our data revealed the possibility that PARP inhibitor in combination with ATM inhibitor is effective for p53-mutant gastric cancer.

研究分野：消化器腫瘍

キーワード：消化器癌 ATM PARP阻害剤

1. 研究開始当初の背景

ATM は毛細血管拡張性失調症の原因遺伝子産物として同定された因子で、DNA 修復応答におけるマスター制御タンパク質として広く知られている。ATM は DNA 損傷に応答し、Chk2、p53 などのリン酸化を介し、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシスを誘導し、発がんに対し抑制的に作用している。最近では、ATM は活性酸素種による酸化ストレスに応答し、細胞増殖の抑制やオートファジーを誘導すること、また腫瘍の浸潤・転移能の増強、病的血管新生促進などの機能があることも報告されている。発がんリスクのバイオマーカーとしての ATM の有用性を示す報告も散見され、特定の一塩基多型は、乳癌、肺癌、白血病、リンパ腫などで、その発症と関連があることが報告されている。我々は、Calgary 大学との共同研究により、ATM 発現と PARP 阻害剤感受性の関連について検討を行ってきた。PARP 阻害剤は BRCA1/2 変異のある乳癌に特異的に細胞死を誘導することが報告されており、その作用機序として DNA 修復機能に異常を有する癌との合成致死性が知られている。DNA 二重鎖切断の修復機構には、相同組み換え (homologous recombination, HR) と非同末端組み換え (non homologous end joining, NHEJ) の 2 種類の経路が存在するが、PARP 阻害剤は HR が欠損した癌に選択的に細胞死を誘導する。ATM は HR の重要な因子の一つで、その機能失活型の変異は PARP 阻害剤と合成致死の関係にあると考えられる (Turner N, et al. EMBO, 2008 参照)。我々は PARP 阻害剤とマンツル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma, MCL) の検討から、PARP 阻害剤は ATM 低発現 MCL に合成致死を誘導すること、癌抑制遺伝子 p53 の変異が、ATM 低発現 MCL の PARP 阻害剤に対する感受性を増強することを明らかにした。また PARP 阻害剤・ATM 阻害剤の併用投与は p53 変異を有する腫瘍に有効である可能性を見出した (Williamson C, Kubota E, et al. EMBO Mol Med, 2012)。消化器癌における ATM 発現に関しては、胃癌の約 60%、大腸癌の約 20% で発現低下を認め、ATM 低発現は予後不良の指標となることが報告されている (Kang B, et al. Mut res, 2008; Grabsch H, et al. Clin Cancer Res, 2006 参照)。

2. 研究の目的

本研究においては、現在までに得られた知見をもとに、ATM 発現と PARP 阻害剤の感受性に関する研究対象を MCL のみではなく、胃癌などの消化器癌に拡大、発展させ、PARP 阻害剤の消化器癌への臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 胃癌における PARP 阻害剤の感受性における ATM の役割
胃癌細胞を用い、ATM の発現についてウエスタンブロット法により確認する。ATM の機能は、

doxorubicin により DNA 損傷を誘導した後、細胞からタンパク質を抽出し、p53, Chk2, Kap1 などの ATM 下流エフェクターの活性化をウエスタンブロット法で確認することにより評価する。各細胞株の ATM 発現、機能を確認した後、PARP 阻害剤の効果を、WST-1 assay, clonogenic survival assay により評価し、ATM 発現と PARP 阻害剤の感受性の相関を解析する。ATM 高発現胃癌細胞株を選択し、ATM 阻害剤、PARP 阻害剤併用投与の効果を検討する。shRNA vector を用い ATM knockdown 胃癌細胞株を樹立し、ATM knockdown の PARP 剤の感受性に与える影響について評価する。

(2) ATM 阻害剤による PARP 阻害剤の感受性増強のメカニズム解析

ATM 阻害剤は、HR による DNA ダメージの修復を阻害することにより、PARP 阻害剤の効果を増強していると考えられる。そこで ATM 阻害剤による PARP 阻害剤の効果増強を DNA 二重鎖切断の指標であるリン酸化 H2AX foci および HR による DNA 修復の指標である Rad51 foci の評価により確認する。ATM 発現胃癌細胞に、PARP 阻害剤単独、もしくは PARP 阻害剤、ATM 阻害剤を併用投与する。薬剤の投与 24 時間後に細胞を固定し、リン酸化 H2AX、Rad51 抗体を用いた蛍光抗体法で各々の発現を解析、定量化し、ATM 阻害剤投与による影響を比較検討する。

(3) p53 変異と PARP 阻害剤、ATM 阻害剤併用投与の効果についての検討

PARP 阻害剤の細胞増殖抑制効果に加えて、細胞周期の制御、アポトーシスの誘導、また遺伝子の発現制御などについて、p53 の機能との関連から詳細に検討する。まず shRNA 発現 vector を用い p53 knockdown 胃癌細胞を樹立し、PARP 阻害剤単独で、もしくは PARP 阻害剤、ATM 阻害剤を併用で投与する。その後、フローサイトメトリーを用い、Propidium Iodide (PI) 染色、BrdU の取り込み率により細胞周期を解析する。アポトーシスの解析は、Annexin V, PI 染色を用いたフローサイトメトリーによる解析、ウエスタンブロット法による cleaved Caspase-3, cleaved-PARP の検出、TUNEL 染色により行う。同時に p53 の標的遺伝子であり、アポトーシス誘導因子である、PUMA, Noxa, Bax などの発現について定量的 RT-PCR を用い確認する。

(4) マウスモデルを用いた ATM 発現と PARP 阻害剤の効果に関する検討

In vitro の実験で得られた結果から、ATM 高発現胃癌細胞、ATM 低発現胃癌細胞を選択する。これらの腫瘍細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、皮下腫瘍マウスモデルを作成する。経皮的に PARP 阻害剤をマウスに投与し、腫瘍体積を経時的に測定し、PARP 阻害剤による腫瘍縮小効果を ATM 蛋白発現レベルの点から比較検討する。

(5) PARP 阻害剤による抗癌剤増感作用についての検討

胃癌細胞株に PARP 阻害剤と抗腫瘍薬 CPT-11 または CDDP を併用投与し、PARP 阻害剤の増感作用について、細胞増殖アッセイを用い検討する。また ATM 発現レベルからみた増感作用について検討する。

4. 研究成果

胃癌細胞株における Ataxia telangiectasia mutated (ATM) 発現レベルおよび、その機能をウエスタンブロット法により確認した。同時に各々の胃癌細胞株の PARP 阻害剤に対する感受性を clonogenic survival assay を用いて評価した。ATM 低発現胃癌細胞株は PARP 阻害剤に対する感受性が強く、ATM 蛋白発現レベルと PARP 阻害剤の効果は有意な相関を示した(相関係数=0.814)。Rad51、BP53、XRCC1 などの DNA 修復蛋白発現と PARP 阻害剤の感受性との相関についても検討したが、統計学的に有意な相関は認めなかった。

次に、ATM knockdown の PARP 阻害剤感受性に及ぼす影響を検討した。ATM knockdown により ATM 高発現胃癌細胞株、KATO の PARP 阻害剤に対する感受性が増強された。同様に、ATM 阻害剤と PARP 阻害剤との併用により、KATO の PARP 阻害剤に対する感受性が増強された。一方、KATO と同じく ATM 高発現胃癌細胞株である STKM-2 については、ATM knockdown、ATM 阻害剤はともに PARP 阻害剤に対する増感作用を示さなかった。STKM-2 は野生型 p53、KATO は機能失活型の p53 変異を有する。そこで STKM-2 にレンチウイルスシステムを用い、shp53 を導入し、p53 knockdown STKM-2 細胞を作製した。p53 knockdown STKM-2 細胞を用いて検討したところ、ATM 阻害剤、ATM knockdown はともに PARP 阻害剤の作用を増強させた。

以上の結果から、PARP 阻害剤、ATM 阻害剤の併用は p53 変異を有する胃癌に対して有効である可能性が示された。

マウス腫瘍移植モデルを用いた検討では、ATM 高発現胃癌細胞株 STKM-2 および ATM 低発現細胞株 NUGC4 を使用した。PARP 阻害剤はマウスに移植した ATM 高発現胃癌細胞株 STKM-2 に対しては有効性を示さなかったが、ATM 低発現細胞株 NUGC4 に対しては腫瘍増殖の抑制効果を示した。この結果は、ATM 蛋白発現レベルと PARP 阻害剤の感受性に有意な相関を認めた in vitro の実験データに矛盾しない結果であった。

PARP 阻害剤の抗腫瘍増感作用については、胃癌の治療で広く用いられている CPT-11 を用いて検討した。胃癌細胞株に対する PARP 阻害剤単独での効果、PARP 阻害剤、CPT-11 の併用効果について比較検討したところ、PARP 阻害剤は濃度依存的に CPT-11 の増感作用を示し、特に ATM 蛋白発現レベルの低い細胞において強い増感作用を認めた。さらに ATM knockdown、もしくは ATM 阻害剤の併用により、PARP 阻害剤の増感剤としての効果は増強された。

以上の結果から、PARP 阻害剤と CPT-11 の併用は相乗的な抗腫瘍効果をもたらし、特に ATM 蛋白低発現胃癌に対して有効である可能性が示された。

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)

Kubota E, Williamson CT, Ye R, Elegbede A, Peterson L, Lees-Miller SP, Bebb DG. Low ATM protein expression and depletion of p53 correlates with olaparib sensitivity in gastric cancer cell lines. *Cell cycle* 査読あり, 13:2129-2137,2014.doi:10.4161/cc.29212

〔学会発表〕(計 4 件)

久保田英嗣, 片岡洋望, 城卓志, ATM をバイオマーカーとした胃癌に対する PARP 阻害剤の有効性の検討, 第 102 回日本消化器病学会総会, 2016 年 4 月 21 日, 京王プラザホテル(東京都, 新宿区)

久保田英嗣, 片岡洋望, 城卓志, ATM and p53 expression level correlate with sensitivity to olaparib in gastric cancer. Digestive Disease Week 2014, May 2014, Chicago, USA

久保田英嗣, 片岡洋望, 城卓志, 胃癌における ATM, p53 発現と新規分子標的薬 PARP 阻害剤感受性, 第 73 回日本癌学術総会, 2014 年 9 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)

久保田英嗣, 片岡洋望, 城卓志, 胃癌に対する PARP 阻害剤の効果, 第 25 回消化器癌発生学会総会/第 8 回国際消化器癌発生会議, 2014 年 11 月 14 日, ホテル日航福岡(福岡県, 福岡市)

〔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

久保田 英嗣 (KUBOTA EIJI)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究
院)・講師
研究者番号：30405188

(2) 研究分担者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究
院)・准教授
研究者番号：40381785

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)
名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究
院)・准教授
研究者番号：90285198

(3) 連携研究者

なし