科学研究費助成專業 研究成果報告書



平成 27 年 5 月 2 3 日現在

機関番号: 13301

研究種目: 挑戦的萌芽研究 研究期間: 2013~2014

課題番号: 25640089

研究課題名(和文)シスプラチン抵抗性関連因子ERCC1の分解を誘導する新規低分子化合物の解析

研究課題名(英文)Analysis of a novel small-molecule compound inducing the degradation of a cisplatin resistance-related factor ERCC1

研究代表者

松永 司 (MATSUNAGA, Tsukasa)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号:60192340

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):我々が見出したヌクレオチド除去修復阻害化合物(NERi)が、シスプラチンの抗腫瘍作用増強剤となりうるか検討を行った。まず、胃癌由来KKLS細胞および卵巣癌由来A2780細胞を用いたコロニーアッセイで、NERiは2~3倍の増強を示すことがわかった。また、シスプラチンで誘発される1,2-GpG架橋損傷の修復が、NERiの前処理により阻害されることを確認した。そこで、マウス肺癌由来LLC細胞をC57BL/6マウスに移植し、シスプラチンとNERiとの併用効果を調べたところ、シスプラチン単独処理に比べて有意に高い抗腫瘍作用が観察された。

研究成果の概要(英文): In this study, we have analyzed whether a small-molecule inhibitor of nucleotide excision repair (NERi) we recently found can potentiate the cytotoxic effects of cisplatin in cancer cells. The clonogenic survival assay revealed that NERi treatment increases the cisplatin-sensitivity of KKLS stomach cancer cell lines and A2780 ovarian cancer cell lines 2-3 fold. Using an immunoassay with damage-specific antibody, we showed that the removal of cisplatin-induced DNA intrastrand crosslinks is markedly attenuated by NERi treatment. Furthermore, in vivo experiments using murine Lewis lung carcinoma and C57BL/6 mice revealed that a combination of cisplatin and NERi significantly suppresses tumor growth. compared with cisplatin alone.

研究分野: 分子細胞生物学

キーワード: ヌクレオチド除去修復 阻害剤 抗癌剤 シスプラチン 低分子化合物 増感作用

1.研究開始当初の背景

シスプラチンで誘発される DNA 損傷は、 塩基付加体、DNA 鎖内架橋、DNA 鎖間架橋 の3種類が知られているが、全体の95%程度 にあたる前二者はヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER)機構で、残 リは DNA 鎖間架橋修復 (DNA interstrand crosslink repair; ICLR)機構で修復される。 ERCC1-XPF 複合体はこの両方の修復機構で 働く構造特異的エンドヌクレアーゼであり、 損傷の 5 '側の DNA 主鎖に切断を入れる役割 をもつ。最近、非小細胞肺癌において、ERCC1 陰性癌ではシスプラチン投与により5年生 存率の改善が見られたが、ERCC1 陽性の場合 は改善が見られなかったことが報告された (文献)。その後も、大腸癌、上部消化管 癌、卵巣癌等でも同様の報告があり(文献) ERCC1 の発現レベルとシスプラチン治療の 予後との関係が注目されている。

最近、我々は NER 能を評価するセルベースドアッセイ系 (microplate-formatted cell-based immunoassay for NER of UV photoproducts; M-CINUP)を開発し(文献)、理化学研究所・天然化合物バンク(NPDepo)のケミカルライブラリーをスクリーニングした結果、HeLa 細胞の NER 反応を顕著に阻害する化合物 (NERiKU001 と仮に命名)を見出した。さらに、この化合物は ERCC1-XPF複合体の分解を誘導することが明らかになり、本研究計画の着想に至った。

2.研究の目的

本研究では、(1) NERiKU001 の細胞内標的因子を同定してその機能を解析し、ERCC1-XPF の分解誘導メカニズムを解明する、(2)様々な培養癌細胞を用いてNERiKU001 がシスプラチンや他の抗癌剤の致死効果を増強できるか検討し、ERCC1 発現レベルとの関係や耐性化した癌細胞への効果にも注目する、(3) マウス癌移植系を用いたインビボ実験で、NERiKU001 がシスプラチンの腫瘍増殖抑制、転移抑制、延命効果を増強できるか調べる、ことを目的とする。

3.研究の方法

(1)標的因子の特定には化合物結合ビーズを利用し、理研で開発された官能基不要の光を利用した方法(文献)と、特定官能基に結合するナノ磁性微粒子(FG ビーズ)を利用した方法(文献)で作製した。細胞粗抽出液との反応後の結合分画から MS 解析により候補因子を同定し、siRNA によるノックダウン等で NERiKU001 効果への影響を検討した。

(2)シスプラチン損傷の9割を占めるDNA 鎖内架橋損傷に特異的なモノクローナル抗 体を入手し、ELISAを用いた検出定量系を導 入した。また、インビトロの増感試験ではコ ロニー形成法を使用し、胃癌由来KKLS細胞、 卵巣癌由来 A2780 細胞に対する NERiKU001 の増感作用を調べた。

(3)マウス肺癌由来 LLC 細胞を C57BL/6 マウスに移植し、未処理、NERiKU001 単独、 シスプラチン単独、NERiKU001 + シスプラチン併用、の4群に分けて、8 匹ずつで腫瘍体 積の増加を追跡し、抗腫瘍効果を比較検討した。

4. 研究成果

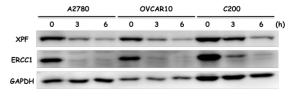
(1)結合ビーズを用いた解析により NERiKU001の標的因子候補は同定されたものの、siRNAによるノックダウン下で NERiKU001処理後のNER阻害やERCC1分解に大きな影響はなく、擬陽性と判断した。 そこで、Dignam法により細胞質分画と核分画を分けて抽出液を調製し、再度ビーズ精製を試みたところ別の候補因子が見つかり、現在検証を行っている。

一方、ERCC1-XPF の分解はプロテアソームに依存し、実際に NERiKU001 の処理後に ERCC1 のポリユビキチン化体を検出することに成功した。

(2) NERiKU001の NER 阻害は、これまで 紫外線誘発 DNA 損傷の 6-4 光産物で調べら れてきたが、シスプラチンで生じる DNA 損 傷に対する修復が阻害されるかはまだ確認 されていない。そこで、シスプラチン損傷の 9割を占め、NER の基質となる DNA 鎖内架 橋損傷について、検出定量系を導入して調べ た。その結果、NERiKU001 はシスプラチン の DNA 鎖内架橋損傷の修復も阻害すること が明らかになった。

そこで、NERiKU001 がシスプラチンの細胞毒性を増強できるか検討し、2 種類の癌細胞において 2~3 倍の増感作用を観察した。他の白金製剤やアルキル化剤についても検討したところ、薬剤の種類によって増感効果に差があることがわかり、新規の白金製剤の中に高い増感作用を示すものが見つかった。また、他の DNA 損傷応答因子の阻害剤との併用試験も行い、PARP1/2 阻害剤 olaparib の細胞毒性を顕著に増強することがわかった。

一方、ERCC1 の発現レベルが高いシスプラチン耐性卵巣癌細胞である OVCAR10 および C200 を米国 Fox Chase Cancer Center から入手 し(文献) NERiKU001 を処理したところ、ERCC1 が検出限界レベルまで減少することがわかった。この結果は、このような耐性癌の治療に NERiKU001 が有効となる可能性を示している。



(3)マウス癌移植系を用いたインビボ試験において、NERiKU001 がシスプラチンの抗腫瘍作用を増強するか検討したところ、併用群ではシスプラチン単独投与群と比較して有意に腫瘍体積増加が抑制されることがわかった。

以上の成果より、NERiKU001 は紫外線誘発 DNA 損傷のみに限らず、シスプラチンで誘発される DNA 鎖内架橋損傷の修復も阻害し、癌細胞のシスプラチン感受性を増感させることが明らかになった。この増感作用はインビボ試験でも同様に認められたことから、NERiKU001 はシスプラチンの増感剤として臨床応用が期待でき、今後この可能性を追求していきたい。

<引用文献>

Olaussen, K. A., Dunant, A., Fouret, P., Brambilla, E., André, F., Haddad, V., Taranchon, E., Filipits, M., Pirker, R., Popper, H. H., Stahel, R., Sabatier, L., Pignon, J. P., Tursz, T., Le Chevalier, T. and Soria, J. C.; IALT Bio Investigators (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy., N. Engl. J. Med. 355, 983-991.

Gossage, L. and Madhusudan, S. (2007). Current status of excision repair cross complementing-group 1 (ERCC1) in cancer. Cancer Treat. Rev. 33, 565-577.

Nishinaga, M., Kurata, R., Onishi, K., Kuriyama, K., Wakasugi, M. and Matsunaga, T. (2012). Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells., Photochem. Photobiol. 88, 356-362.

Kanoh, N., Honda, K., Simizu, S., Muroi, M. and Osada, H. (2005). Photo-cross-linked small-molecule affinity matrix for facilitating forward and reverse chemical genetics., Angew. Chem. Int. Ed. 44, 3559-3562.

Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., Yamaguchi, Y. and Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity., Science 327, 1345-1350.

Selvakumaran, M., Pisarcik, D. A., Bao, R., Yeung, A. T. and Hamilton, T. C. (2003). Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines., Cancer Res. 15, 1311-1316.

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)

Wakasugi, M., Sasaki, T., Matsumoto, M., Nagaoka, M., Inoue, K., Inobe, M., Horibata, K., Tanaka, K. and Matsunaga, T. (2014). Nucleotide excision repair-dependent DNA double-strand break formation and ATM signaling activation in mammalian quiescent cells., J. Biol. Chem. 289, 28730-28737. (查読有)

DOI: 10.1074/jbc.M114.589747

Enkhtuya, R., Sato, T., <u>Wakasugi, M.</u>, Tuvshintugs, B., Miyata, H., Sakurai, T., <u>Matsunaga, T.</u> and Yoshioka, K. (2014). The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B-induced apoptosis in mice., Genes Cells 19, 350-358. (查読有) DOI: 10.1111/gtc.12135

Zhao, X., Nogawa, A., <u>Matsunaga, T.,</u> Takegami, T., Nakagawa, H. and Ishigaki, Y. (2014). Proteasome inhibitors and knockdown of SMG1 cause accumulation of Upf1 and Upf2 in human cells., Int. J. Oncol. 44, 222-228. (查読有)

DOI: 10.3892/ijo.2013.2149

Mishima, T., Toda, S., Ando, Y., <u>Matsunaga</u>, <u>T.</u> and <u>Inobe</u>, <u>M.</u> (2014). Rapid proliferation of activated lymph node CD4+ T Cells is achieved by eliminating gap phases in cell cycle progression., Cell. Mol. Biol. Lett. 19, 638-648. (查読有)

DOI: 10.2478/s11658-014-0219-z

Ando, Y., Yasuoka, C., Mishima, T., Ikematsu, T., Uede, T., <u>Matsunaga, T.</u> and <u>Inobe, M.</u> (2014). Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by Herpes Virus Entry Mediator costimulatory molecule., In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal 50, 313-320. (查読有)

DOI: 10.1007/s11626-013-9705-2

[学会発表](計8件)

高森千枝、宮崎幸太郎、西永真理、大澤 琢郎、若杉光生、松永 司: DNA 修復因子 ERCC1-XPF の安定性と細胞内局在性を決 定する要因の解析、日本薬学会第135年会、 平成27年3月25-28日、兵庫医療大学(神戸)

松永 司、斎藤臣雄、長田裕之、<u>遠藤良夫</u>: シスプラチン抵抗性関連因子 ERCC1 を分 解誘導する新規低分子化合物の同定、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成 26 年 6 月 25 - 27 日、TKP ガーデンシティ仙台(仙台)

西永真理、宮崎幸太郎、福島直紀、高森 千枝、<u>若杉光生</u>、斎藤臣雄、長田裕之、<u>松</u> 永 司: ヌクレオチド除去修復を阻害する 低分子化合物の作用機序に関する解析、第 36回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 3 - 6 日、神戸ポートアイランド(神戸)

松永 司 (招待講演): 新開発セルベースドアッセイ系を利用したヌクレオチド除去修復研究の新展開、日本環境変異原学会第42回大会・シンポジウム「光遺伝毒性」平成25年11月29-30日、岡山コンベンションセンター(岡山)

松永 司、長田裕之、<u>若杉光生</u>: 癌細胞のシスプラチン感受性を増感させるヌクレオチド除去修復阻害剤の作用機序、第72回日本癌学会学術総会、平成25年10月3-5日、パシフィコ横浜(横浜)

〔その他〕 ホームページ等 http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 司 (MATSUNAGA, Tsukasa) 金沢大学・薬学系・教授 研究者番号: 60192340

(2)研究分担者

猪部 学 (INOBE, Manabu) 金沢大学・薬学系・准教授 研究者番号:10312414

若杉 光生 (WAKASUGI, Mitsuo) 金沢大学・薬学系・助教 研究者番号: 80345595

(平成25年度のみ)

西永 真理 (NISHINAGA, Mari) 富山県衛生研究所・研究員 研究者番号: 10646681

(3)連携研究者

国嶋崇隆 (KUNISHIMA, Munetaka) 金沢大学・薬学系・教授 研究者番号: 10214975

小田彰史 (ODA, Akifumi) 金沢大学・薬学系・准教授 研究者番号: 50433511

遠藤良夫 (ENDO Yoshio) 金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 研究者番号:30211783