

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860530

研究課題名(和文) マイクロサテライト不安定性標的遺伝子MBD4変異と大腸がん薬物療法の感受性変化

研究課題名(英文) MBD4 mutation caused by MSI and 5FU chemosensitivity in colorectal cancer

研究代表者

岩泉 守哉 (Iwaizumi, Moriya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60444361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんに対する薬物感受性について以下の内容を明らかにした。(1)変異型ヒトMBD4組換え蛋白は、dsDNAに組み入れられた5FUの認識能が野生型より高かった。(2)変異型および野生型MBD4安定発現大腸がん細胞株を樹立させ、それぞれに5FUを投与したところ、変異型MBD4発現株において5FUの感受性が高まった。(3)変異型MBD4発現大腸がん細胞における5FU投与によって、G2/M arrestを経て細胞死が誘導された。

研究成果の概要(英文)：We found biochemically that Truncated MBD4 (Tru MBD4) binds to 5FU incorporated into DNA with higher affinity than MBD4. TruMBD4 reduced the 5FU affinity of the MMR recognition complexes that determined 5FU sensitivity by previous reports, suggesting other mechanisms might be operative to trigger cytotoxicity. To analyze overall 5FU sensitivity with TruMBD4, we established Tru MBD4 overexpression in hMLH1-proficient or -deficient colorectal cancer cells followed by treatment with 5FU. 5FU-treated TruMBD4 cells demonstrated diminished growth characteristics compared to controls, independently of hMLH1 status. Flow cytometry revealed more 5FU-treated TruMBD4 cells in S phase than controls.

研究分野：消化器内科学

キーワード：マイクロサテライト不安定性 大腸がん 薬物療法 感受性

1. 研究開始当初の背景

5FU 系薬剤は大腸がん薬物療法の Key Drug である。5FU は代謝され、チミジル酸合成酵素 (TS) の阻害、RNA への誤取り込み、および DNA への誤取り込みにより殺細胞効果を発揮する。特に、DNA ミスマッチ修復 (MMR) の異常により生じる高度のマイクロサテライト不安定性 (MSI) を認める大腸がん患者では MSI を認めない大腸がん患者と比較し 5FU 系ベースの化学療法による十分な有益性は得られないこと (Ribic CM, et al. N Engl J Med 2003) から、DNA に誤まって取り込まれた 5FU による殺細胞効果の変化が MMR 異常とどのように関わっているかを理解する必要がある。

我々はこれまでに、5FU を含むプラスミドを種々の MMR status をバックグラウンドに持つ大腸がん細胞株に導入することで、DNA に取り込まれた 5FU そのものが MMR status 依存性に殺細胞効果を促すこと (Iwaizumi M, et al. Cancer Biol Ther 2011)、また、本来 DNA ミスマッチを認識する MMR 蛋白複合体が、DNA に取り込まれた 5FU をも認識すること (Tajima A, Iwaizumi M, et al. PLoS One 2011) を報告してきた。しかしながら、MMR 異常により生じる変異遺伝子 (MSI 標的遺伝子) の発現が 5FU 投与に対してどのように影響を及ぼすかは明らかではない。MSI 標的遺伝子かつ塩基除去修復 (Base Excision Repair; BER) に重要な DNA グリコシラーゼである MBD4 は、DNA で誤って起こったグアニン : ウラシル (G:U) およびグアニン : チミン (G:T) ミスマッチを認識し、ミスマッチ部位のウラシルおよびチミンを除去し突然変異を回避する役割を果たしている。野生型 MBD4 は、DNA に取り込まれた 5FU も認識除去し (Petrozelli F, et al. J Biol Chem 2000)、5FU に対する感受性を高め (Sansom OJ, et al. Oncogene 2003)、MMR 蛋白である hMLH1 と interaction する (Bellacosa A, et al. PNAS 1999) ように、5FU かつ MMR system と密接にかかわった、大腸がんの病態と治療の観点から非常にユニークな分子である。一方、臨床的に MMR 異常を呈する大腸がんの 26-43% で MBD4 変異が起こっているにも関わらず、変異型 MBD4 の 5FU 系薬剤に対する治療感受性の影響について行われた検討はない。

2. 研究の目的

本研究は、大腸がんの発育進展の原因のひとつであるマイクロサテライト不安定性 (MSI) により誘導される DNA グリコシラーゼ methyl-CpG binding domain protein 4 (MBD4) のフレームシフト変異が、大腸がん化学療法の Key Drug である 5FU 系薬剤に対する大腸がん細胞の感受性をどのように変化させるかを解明することを目的としている。また、大腸がん細胞内での変異型 MBD4 の発現が 5FU 系薬剤投与下における MBD4 の下流の塩基除去修復 (Base Excision Repair;

BER) 経路に与える影響を解析することにより、5FU 系ベースの薬物療法の治療効果向上のための標的分子を探ることも目的とした。

3. 研究の方法

(1)野生型および変異型ヒト MBD4 組換え蛋白と、5FU の組み入れられた合成 dsDNA を利用して、野生型および変異型 MBD4 の DNA 中の 5FU に対する認識能を評価する。(2)変異型および野生型 MBD4 安定発現大腸がん細胞株を樹立させ、それぞれに 5FU を投与し、薬剤感受性変化を評価する。(3)変異型 MBD4 発現大腸がん細胞における 5FU 投与による塩基除去修復 (Base Excision Repair; BER) 経路の変化を解析する。(4)変異型 MBD4 発現大腸がん細胞株における 5FU 投与による DDR (DNA Damage Response) および hMLH1 の関与を検討する。

4. 研究成果

以下のことが本研究で判明した。

(1) DNA pull down assay 法にて、変異型ヒト MBD4 組換え蛋白と野生型 MBD4 蛋白の、dsDNA に組み入れられた 5FU の認識能を比較した。その結果、変異型 MBD4 蛋白は 5FU 除去能力高かった (Fig.1)

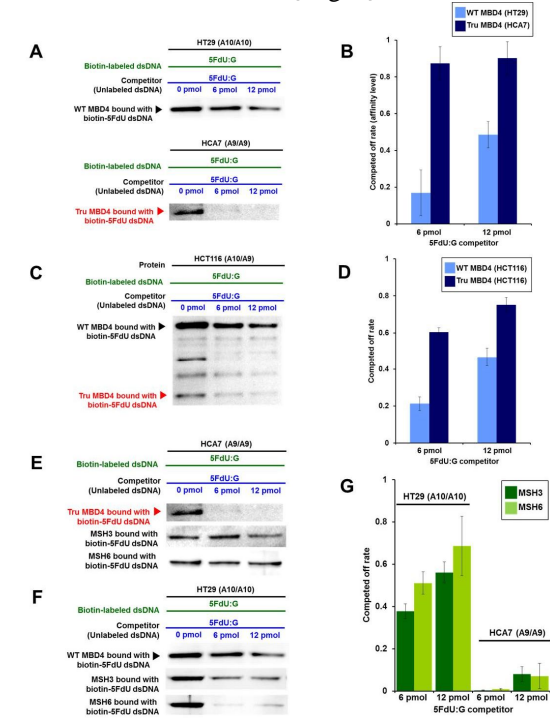


Fig.1. Truncated MBD4 binds to 5FU incorporated into DNA with higher affinity than wild type MBD4 and reduces 5FU affinity of DNA mismatch repair proteins.

(2)変異型および野生型 MBD4 安定発現大腸がん細胞株を樹立させ、それぞれに 5FU を投与したところ、変異型 MBD4 発現株において 5FU の感受性が高まった (Fig.2)

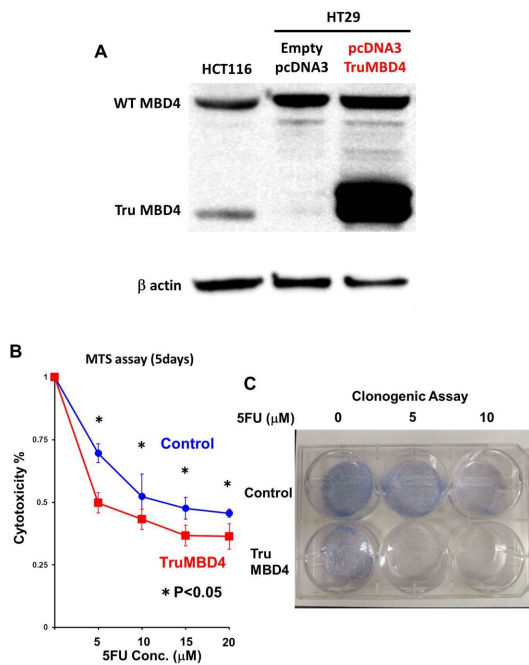


Fig.2. Truncated MBD4 enhances 5FU cytotoxicity.

(3)変異型 MBD4 発現大腸がん細胞における 5FU 投与によって、G2/M arrest を経て細胞死が誘導された (Fig.3)

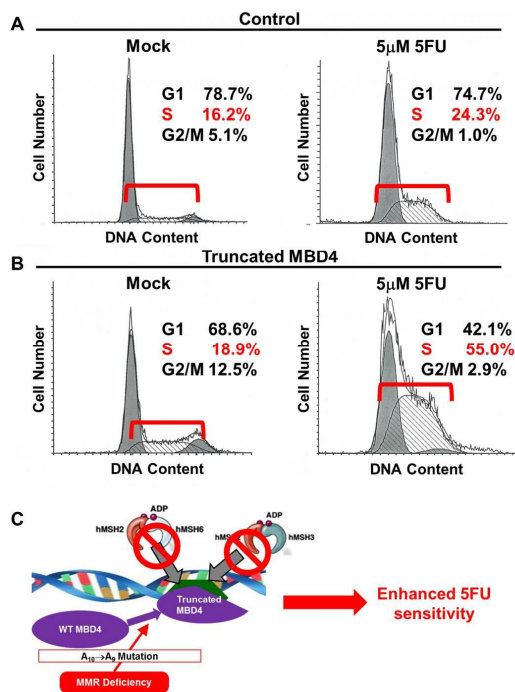


Fig.3. Truncated MBD4 induces S phase arrest under 5FU treatment.

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 3 件)

- Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Carethers JM. Acidic tumor microenvironment downregulates hMLH1 but does not diminish 5-fluorouracil chemosensitivity. *Mutat Res*: 747-748, 19-27, 2013
- Iwaizumi M, Tao H, Yamaguchi K, Yamada H, Shinmura K, Kahyo T, Yamanaka Y, Kurachi K, Sugimoto K, Furukawa Y, Sugimura H. A novel APC mosaicism in a patient with familial adenomatous polyposis. *Human Genome Variation 2*, 15057, 2015
- Suzuki S, Iwaizumi M, Tseng-Rogenski S, Hamaya Y, Miyajima H, Kanaoka S, Sugimoto K, Carethers JM. Production of truncated MBD4 protein by frameshift mutation in DNA mismatch repair-deficient cells enhances 5-fluorouracil sensitivity that is independent of hMLH1 status. *Cancer Biol Ther*.(in press)

[学会発表] (計 3 件)

- Iwaizumi M, Martin P, Tseng-Rogenski S, Kanaoka S, Carethers JM: MBD4 Frameshift Mutation Enhances 5-Fluorouracil (5FU) Sensitivity in Colorectal Cancer. 2013 American Gastroenterological Association (AGA)/Digestive disease Week (DDW) annual meeting, May 2013, Orlando, FL, USA (Poster Presentation).
- Suzuki S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Osawa S, Furuta T, Sugimoto K: Trifluridine to enhance cytotoxicity by DNA mismatch repair deficiency and subsequent MBD4 frameshift mutation in colorectal cancer. 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI 2016) San Francisco, CA, USA. Jan. 2016 (Poster Presentation) *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 608)
- Ito T, Iwaizumi M, Tao H, Osawa S, Kurachi K, Hamaya Y, Takagaki K, Furuta T, Sugimoto K, Sugimura H, Maekawa M: Genotype-phenotype correlation of gastric cancer in familial adenomatous polyposis. 2016 Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI 2016) San Francisco, CA, USA. Jan. 2016 (Poster Presentation) *J Clin Oncol* 34, 2016 (suppl 4S; abstr 535)

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等；なし

6．研究組織

(1)研究代表者

岩泉守哉（IWAIZUMI MORIYA）

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60444361