

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860845

研究課題名(和文) 血液腫瘍におけるPARP阻害剤作用機序の解明とその有用性の検討

研究課題名(英文) Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors selectively induce cell killing in E2A-HLF positive leukemic cells

研究代表者

朴 今花 (Piao, Jinhua)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70567750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：様々なバックグラウンドを持つ血液腫瘍細胞株をもちいてPARP阻害剤に対する感受性を検討した。その結果、リンパ系腫瘍細胞株が骨髄系腫瘍細胞株に対して比較的高感受性を示すことが明らかとなった。中でもE2A-PBX1、E2A-HLFを発現する細胞株はPARP阻害剤に対して高感受性を示した。そのメカニズムとしてE2A-PBX1、E2A-HLFが発現することによりHRの活性が低下し、PARP阻害剤に対して高感受性を示すと考えられた。E2A-HLF陽性白血病は治療抵抗性を示す代表的な急性リンパ性白血病であり、PARP阻害剤がその新しい治療法選択肢の一つとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：we report the potential utility of PARP inhibitors to treat hematological malignancies. In a cell-based screen, we discovered that a specific subtype of leukemia, E2A-HLF1positive leukemia, is sensitive to PARP inhibitors. We then investigated the underlying reasons why E2A-HLF positive leukemia cells exhibit sensitivity to these compounds. E2A-HLF positive leukemia is one of the most catastrophic subtypes of this disease; consequently, novel therapeutic approaches to treating these cancers are urgently needed. PARP inhibitors are currently used in cutting edge treatments for breast cancers harboring mutations in BRCA1 or BRCA2, and the search for other susceptible tumors is underway. We anticipate that these findings will be applicable in the field of hematology/oncology.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：白血病 相同組み換え修復 PARP阻害剤

1. 研究開始当初の背景

DNA の損傷には、その塩基の変化や架橋、鎖の切断があり、ヌクレオチド除去修復(Nucleotide excision repair; NER)、塩基除去修復(Base excision repair; BER)などの単鎖切断修復、非相同末端結合(Non-homologous end joining; NHEJ)修復、相同組み換え(Homologous recombination; HR)修復など二本鎖切断修復が知られる。その修復機構にかかわる分子の異常は色素性乾皮症や毛細血管拡張性運動失調症など家族性腫瘍の原因となっている。また細胞のがん化を考える上で DNA 損傷応答修復の果たす役割は非常に重要な位置を占め、多くの腫瘍細胞は DNA 損傷応答修復に関わる分子に何らかの異常を有している。特に相同組み換え修復(HRR)の異常はゲノム不安定性に寄与し、腫瘍化と密接なかかわりがあることが知られている。相同組み換え修復(HRR)には BRCA1、BRCA2、Rad51、Rad52 を始めいくつかの分子がかかわっている。中でも生殖細胞レベルでの BRCA1、BRCA2 の変異は家族性乳がん・卵巣がんの原因となっていることが知られている。

G1-S期に起こったDNA損傷や単鎖切断はDNA複製の進行に伴い二本鎖切断に変換される。こういったDNA二本鎖切断はS-G2期ではHRR経路を介してDNA修復が行われる。ポリ-(ADPリボース)-ポリメラーゼ(PARP)は様々な機能を持ち、ゲノム安定性やエネルギー代謝、細胞死などに関係している。中でもDNA修復機構、特に塩基除去修復(BER)においては重要な役割を担い、阻害剤によるPARP機能の抑制は塩基除去修復(BER)を阻害することが知られている。通常細胞はDNA損傷が起り、PARP阻害剤で処理されることにより修復が行われず単鎖切断から二本鎖切断に至っ

ても、HRRの経路を使い損傷したDNAを修復することができる。しかしHRR経路が障害されている細胞においてはPARP阻害剤処理により生じたDNA損傷修復が効率的に行えず、DNA損傷の集積により細胞死が起こる。この現象は合成致死(Synthetic lethality)と呼ばれる。HRRが障害されているBRCA1やBRCA2変異のある乳がん細胞はPARP阻害剤による細胞死が効率的に誘導され(Nature. 2005;434:917-921.)、すでにPARP阻害剤の有用性は臨床の現場においてもBRCA1やBRCA2変異のある乳がんにおいて報告され、国内外において多くの臨床試験が進行中である。またこの概念はBRCA1やBRCA2だけでなく幅広く相同組み換え修復に関与する分子の異常においてもあてはまる。

2. 研究の目的

小児がんの治療成績は近年の化学療法の進歩に伴い、着実に向上している。一方で、難治性の一群は依然として予後不良であり、様々な免疫療法、分子標的薬が開発され、その効果が検討されている。シグナル伝達経路阻害剤を中心とした分子標的薬がその中心となっているが、本研究ではPARP阻害剤を中心とし、ゲノム修復異常に注目し新規のがん特性を標的とした治療薬の基礎的な評価を行う。

3. 研究の方法

さまざまな白血病細胞株に対しPARP阻害剤であるolaparib、veriparibによる細胞死を検討する。

レトロウイルスを用いてPARP阻害剤抵抗性細胞株DaudiにE2A-HLF遺伝子を導入しolaparibによる細胞死を検討する、

E2A-HLF遺伝子またはコントロールベクター

を導入した細胞株で、DR-GFP アッセイを用いて相同組み換えの能の検討を行う。

E2A-HLF 遺伝子またはコントロールベクターを導入した細胞株間で cDNA 発現アレイ解析を用い、発現に差異のある遺伝子を通出する。また、その発現量をウェスタンブロット法で確認する。

NSG マウスに E2A-HLF 陽性白血病細胞株を移植し PARP 阻害剤 olaparib、テモゾロミドを週 5 日間投与する。

4. 研究成果

小児急性リンパ性白血病細胞株のうちリンパ系細胞株が PARP 阻害剤に高感受性を示すことが明らかとなった。なかでも E2A-HLF および E2A-PBX1 陽性細胞株が高感受性を示した。E2A-HLF 依存性に PARP 阻害剤に高感受性を示すことを証明するため、E2A-HLF 遺伝子の一部、PARP 阻害剤抵抗性の細胞株 Daudi に導入したところ、PARP 阻害剤に感受性を示すようになった。この原因を探索したところ、E2A-HLF を導入することにより細胞の HR 活性が低下することが明らかとなった。このために E2A-HLF 陽性白血病は PARP 阻害剤に感受性を示すと考えられた。E2A-HLF により HR 活性が低下する原因を検討するため cDNA 発現アレイ解析をこなった。この結果 E2A-HLF が発現することにより BRCA1 の安定化に寄与することが知られている MCPH1 の発現量が低下することが明らかとなった。この結果 BRCA1 の安定化が障害され、HR 能が低下すると考えられた。

これら研究により in vitro における PARP 阻害剤の有用性が明らかとなったため、NSG マウスを用いた Xenograft により in vivo の PARP 阻害剤の有用性を検討した。

PARP 阻害剤には olaparib をもちいた。残念ながら PARP 阻害剤単独では腫瘍の増殖能は阻害できず、マウスの生存期間はコントロールと差はなかったが、塩基損傷を誘導するアルキル化剤であるテモゾロミドとの併用では、マウスの生存期間の延長が確認され、PARP 阻害剤の有用性が in vivo においても確認された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Masatoshi Takagi, Jinhua Piao, Takahiro Kamiya, Mitsuko Masutani, Shuki Mizutani, Poly(ADP-Ribose) Polymerase inhibitor selectively induce cell killing in E2A-PBX1 and E2A-HLF positive leukemic cell, 56th American society of Hematology Annual Meeting 2014/12/6-9, San Francisco, USA

Masatoshi Takagi, Jinhua Piao, Takahiro Kamiya, Mitsuko Masutani, Shuki Mizutani, Poly(ADP-Ribose) Polymerase inhibitor selectively induce cell killing in E2A-PBX1 and E2A-HLF positive leukemic cell, 8th SIOP Asia Congress 2014/4/17-19, Soul Korea

Masatoshi Takagi, Jinhua Piao, Takahiro Kamiya, Takeshi Inukai, Kanji Sugita, Kazuma Ohyashiki, Mitsuko Masutani, Shuki Mizutani. Sensitivity to PARP inhibitor in acute lymphoblastic leukemia, 第 75 回日本血液学会学術集会 2013.10.11-13 札幌

高木正稔、益谷美都子、水谷修紀. E2A-HLF 陽性急性リンパ性白血病に対する PARP 阻害剤の有効性、第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.3-5

〔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：
出願年月日：
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

朴 今花 (Piao, Jinhua)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・特任助教

研究者番号：70567750

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：