

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03598

研究課題名(和文)複製ストレスに起因する治療誘導性細胞老化の分子機序

研究課題名(英文)Molecular mechanism of therapy-induced senescence caused by replicative stress

研究代表者

北尾 洋之(Kitao, Hiroyuki)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：30368617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 6,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん化学療法において、細胞死を伴わなくとも細胞増殖を不可逆的に停止する「治療誘導性細胞老化」と呼ばれる現象が近年注目されている。申請者は、抗がん剤FTD/TPIの薬効成分トリフルリジン(FTD)が細胞レベルで非常に効率よく細胞老化を誘導すること、さらにその誘因としてDNA複製ストレスがあることを見出した。FTDはがん細胞のDNA複製過程でDNAに取り込まれるが、その際DNA複製効率を低下させる。その結果、ゲノム上に傷が残り、p53が活性化され、細胞老化に至る。また、p53が欠損したがん細胞ではM期に染色体がうまく分かれず、細胞死に至る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FTD/TPIは進行大腸癌・胃癌に対する抗がん剤として世界で広く治療に用いられている。本研究成果は、FTD/TPIの抗腫瘍効果を担うFTDの作用メカニズムの理解に必須の知見である。さらに、悪性度を増したヒト腫瘍で多く見られ、抗がん剤耐性に繋がるとされるp53欠損を持つがん細胞であってもFTDが抗腫瘍効果を発揮するという結果は、このメカニズムに基づく抗がん剤治療がp53変異に関わらず有効であることを示唆しており、今後の抗がん剤開発を考える上でも意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Therapy-induced senescence is now recognized as an important mechanism that elucidates irreversible cell cycle arrest induced by chemotherapeutic drugs. In this research project, we found that trifluridine, a cytotoxic component of chemotherapeutic drug FTD/TPI, efficiently induced cellular senescence in the cell culture condition and DNA replication stress induced by trifluridine was the trigger. In tumor cells, trifluridine, as a fluorinated thymidine analog, was incorporated into genomic DNA during DNA replication process. At that process, trifluridine decreased the efficiency of DNA replication. As a result, single-strand DNA was exposed in the nucleus, p53 was activated, and cellular senescence was induced. In the tumor cells with p53 deficiency, apoptosis was induced as a result of abnormal sister chromatid separation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：抗がん剤 DNA複製ストレス 治療誘導性細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん化学療法の究極の目的はがんの根治・消失であるが、状況によっては根治が見込めず、がんの進行を食い止めるために治療を行う場合がある。実際、抗腫瘍薬によって不可逆的な増殖停止である細胞老化が誘導されることがあり、「治療誘導性細胞老化」という新たな治療のコンセプトとして注目されていた。申請者は当初、新規抗腫瘍薬 FTD/TPI の薬効成分でフッ化チミジンアナログであるトリフルリジン(FTD)が細胞レベルで非常に効率よく細胞老化を誘導することを見出した。また、その誘因として FTD による DNA 複製過程で発生するストレスがあることを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

FTD を 1 つの例として「抗腫瘍薬によってどのような複製ストレスが惹起され、どのような過程を経て治療誘導性細胞老化が引き起こされるのか」についてその詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのことを通じて、「複製ストレス惹起による細胞老化誘導」に基づく新たながん治療戦略のための理論基盤を構築することを目指した。

3. 研究の方法

精製ヒトタンパク質を用いた試験管内 DNA 複製反応系により、FTD 3 リン酸体を dTTP の代わりに dNTP プールに加えた条件での DNA 複製効率の変化を評価した。さらに、上記反応系を用いて、鋳型鎖に FTD が組み込まれたものの DNA 複製効率についても評価を行った。3 連 4 重極質量分析器を用いて、FTD 曝露時の細胞内ヌクレオシド代謝物の変動について評価を行った。ある特定の抗 BrdU 抗体が FTD を特異的に認識するという知見 (Kitao et al. *Sci Rep.* 2016) を元に、DNA への FTD の取込みについて、蛍光免疫染色法により評価を行った。複製ストレスに対する細胞応答については、Chk1 Ser345 のリン酸化、FancD2 のモノユビキチン化を指標として、ウェスタンブロット法により解析した。間期の細胞周期進行を可視化できる Fucci システムによる生細胞蛍光ライブイメージング技術を用いて、FTD に曝露されたがん細胞がどのような細胞周期進行を経て、細胞老化に至るのかについて追跡した。ゲノム編集技術を用い、p53 遺伝子破壊株を樹立し、抗がん剤感受性、複製ストレス応答因子の活性化や細胞周期進行、細胞運命決定について詳細に解析した。

4. 研究成果

試験管内 DNA 複製反応系において、dTTP の代わりに FTD 3 リン酸体の存在下で反応を行うと、DNA 複製効率が極端に低下した。また、鋳型鎖に FTD を連続して挿入すると、その部分の複製効率が極端に低下した。つまり、FTD は DNA 複製の過程で DNA に取り込まれる時と DNA に取り込まれた FTD が鋳型鎖に移行し、その上を DNA 複製 machinery が通過する時に DNA 複製進行阻害が起こることが生化学的に証明された。

ヒトがん細胞株 HCT-116 (p53 が正常) に FTD を曝露した時、FTD の代謝物 FTD 3 リン酸体が細胞内に蓄積し、複製伸長速度が低下し、複製ストレス応答因子 Chk1 のリン酸化、FancD2 のモノユビキチン化が誘導された。FTD は DNA 複製過程で DNA に取り込まれる時に複製進行が妨げられた結果、複製ストレスが誘導されていると考えられた。Fucci システムによる生細胞ライブイメージングでは、FTD 曝露により、S 期の遅延が見られた。興味深いことに 1 周目の S 期よりも 2 周目の S 期の方が極端に遅延していた。M 期を一回経て、鋳型鎖に入った FTD の複製進行阻害効果が働き、S 期の進行をさらに遅らせていることが予想された。

長い時間をかけて S 期を完了した HCT-116 細胞では、G2 期から M 期を経ずに G1 期に移行す

る M 期スキップが高頻度で観察された。細胞老化誘導時には M 期スキップが観察されることが知られており (Johmura et al. *Mol Cell* 2014) FTD による効率のよい細胞老化誘導が説明できた。さらに、p53 欠損 Fucci 細胞を樹立し、FTD 曝露後の細胞運命を観察すると、S 期の遅延は HCT-116 細胞と同等に見られたが、M 期スキップは全く観察されず、M 期に進行する細胞がほとんどであった。しかし、これらの細胞では姉妹染色分体の腕部が絡み合った構造をしている影響で染色体分配が完了できなかった。これらの細胞はその後細胞死に至った。つまり、FTD はがん細胞に DNA 複製ストレスを与えることにより、p53 変異の有無に関わらずその増殖を抑制することが期待できることが明らかとなった。このようなメカニズムに基づく抗がん剤治療が p53 変異に関わらず有効であることを示唆しており、今後の治療戦略を考える上で重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe Sugiko, Iimori Makoto, Chan David Virya, Hara Eiji, Kitao Hiroyuki, Maehara Yoshihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 MDC1 methylation mediated by lysine methyltransferases EHMT1 and EHMT2 regulates active ATM accumulation flanking DNA damage sites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29239-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Edahiro Keitaro, Iimori Makoto, Kobunai Takashi, Morikawa-Ichinose Tomomi, Miura Daisuke, Kataoka Yuki, Niimi Shinichiro, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Kitao Hiroyuki, Maehara Yoshihiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Thymidine Kinase 1 Loss Confers Trifluridine Resistance without Affecting 5-Fluorouracil Metabolism and Cytotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1483 ~ 1490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-17-0686	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Bharti Sanjay Kumar, Sommers Joshua A, Awate Sanket, Bellani Marina A, Khan Irfan, Bradley Lynda, King Graeme A, Seol Yeonee, Vidhyasagar Venkatasubramanian, Wu Yuliang, Abe Takuye, Kobayashi Koji, Shin-ya Kazuo, Kitao Hiroyuki, Wold Marc S, Branzei Dana, Neuman Keir C, Brosh Robert M	4. 巻 46
2. 論文標題 A minimal threshold of FANCD1 helicase activity is required for its response to replication stress or double-strand break repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6238 ~ 6256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gky403	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita Nami, Tokunaga Eriko, Iimori Makoto, Inoue Yuka, Tanaka Kimihiro, Kitao Hiroyuki, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With?Regard to Invasion and Metastasis of Breast?Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 e1003 ~ e1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clbc.2018.02.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiai Masamichi, Sato Koichi, Tomida Junya, Kitao Hiroyuki, Kurumizaka Hitoshi, Takata Minoru	4. 巻 803-805
2. 論文標題 Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 89 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrfmmm.2017.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitao Hiroyuki, Iimori Makoto, Kataoka Yuki, Wakasa Takeshi, Tokunaga Eriko, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko	4. 巻 109
2. 論文標題 DNA replication stress and cancer chemotherapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 264 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuda Yasuo, Iimori Makoto, Nakashima Yuichiro, Nakanishi Ryota, Ando Koji, Ohgaki Kippei, Kitao Hiroyuki, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora B during tubulin-binding agent-induced mitotic arrest	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17002-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi R, Kitao H, Kiniwa M, Morodomi Y, Iimori M, Kurashige J, Sugiyama M, Nakashima Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y.	4. 巻 7
2. 論文標題 Monitoring trifluridine incorporation in the peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients under trifluridine/tipiracil medication.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-17282-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Yuka, Yamashita Nami, Kitao Hiroyuki, Tanaka Kimihiro, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Oda Yoshinao, Tokunaga Eriko, Maehara Yoshihiko	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinical Significance of the Wild Type p53-Induced Phosphatase 1 Expression in Invasive Breast Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 e643 ~ e650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clbc.2017.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka Yuki, Imori Makoto, Niimi Shinichiro, Tsukihara Hiroshi, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko, Kitao Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Cytotoxicity of trifluridine correlates with the thymidine kinase 1 expression level	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44399-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Yoshiaki, Nakanishi Ryota, Nukatsuka Mamoru, Matsuoka Kazuaki, Ando Koji, Wakasa Takeshi, Kitao Hiroyuki, Oki Eiji, Maehara Yoshihiko, Mori Masaki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Detection of trifluridine in tumors of patients with metastatic colorectal cancer treated with trifluridine/tipiracil.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-020-04072-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka Yuki, Imori Makoto, Fujisawa Ryo, Morikawa-Ichinose Tomomi, Niimi Shinichiro, Wakasa Takeshi, Saeki Hiroshi, Oki Eiji, Miura Daisuke, Tsurimoto Toshiki, Maehara Yoshihiko, Kitao Hiroyuki	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 DNA replication stress induced by trifluridine determines tumor cell fate according to p53 status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 Cell fate decision according to p53 status in response to nucleoside analog-induced DNA replication stress
3. 学会等名 Gordon Research Conference-Mutagenesis
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 The mechanism of tumor cell fate decision by an antitumor nucleoside analogue, trifluridine
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kitao
2. 発表標題 Cell fate decision according to p53 status in response to nucleoside analog-induced DNA replication stress
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北尾洋之、片岡裕貴、飯森真人、藤澤遼、釣本敏樹、一瀬智美、三浦大典、松岡和明、沖英次、佐伯浩司、前原喜彦
2. 発表標題 トリフルリジン誘導性DNA複製ストレスががん細胞の運命に及ぼす影響
3. 学会等名 第21回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北尾洋之、片岡裕貴、飯森真人、藤澤遼、 釣本敏樹、一瀬智美、三浦大典、松岡和明、沖英次、佐伯浩司、前原喜彦
2. 発表標題 Replicative stress in the induction of p53-dictated cytotoxicity by an antitumor nucleoside analogue, trifluridine.
3. 学会等名 29th Fanconi Anemia Research Fund Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北尾洋之、片岡裕貴、飯森真人、藤澤遼、 釣本敏樹、一瀬智美、三浦大典、松岡和明、沖英次、佐伯浩司、前原喜彦
2. 発表標題 トリフルリジン誘導性DNA複製ストレスががん細胞の運命に及ぼす影響
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北尾 洋之、飯森真人、中西良太、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦
2. 発表標題 トリフルリジン・チピラシルによる治療効果の基礎・臨床での評価
3. 学会等名 第35回日本ヒト細胞学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北尾洋之、飯森真人、片岡裕貴、藤澤遼、釣本敏樹、一瀬智美、三浦大典、若狹武司、松岡和明、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦
2. 発表標題 ヌクレオチドアナログ誘導性DNA複製ストレスとp53を介した細胞運命
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北尾洋之, 片岡裕貴, 飯森真人, 若狹武司, 藤澤遼, 釣本敏樹, 松岡和明, 沖英次, 佐伯浩司, 前原喜彦, 森正樹
2. 発表標題 トリフルリジン誘導性細胞老化とDNA複製ストレスとの関連
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学 研究者情報 http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003932/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	飯森 真人 (Iimori Makoto) (20546460)	九州大学・薬学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	釣本 敏樹 (Tsurimoto Toshiki) (30163885)	九州大学・理学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	沖 英次 (Oki Eiji) (70380392)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐伯 浩司 (Saeki Hiroshi) (80325448)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	
研究分担者	三浦 大典 (Miura Daisuke) (40532627)	九州大学・農学研究院・特任准教授 (17102)	