

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09389

研究課題名(和文) 大腸癌に対するPARP阻害剤による抗癌剤増感の関連遺伝子の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Genes related to anticancer drug sensitization by PARP inhibitors for colorectal cancer

研究代表者

田中 守 (Mamoru, Tanaka)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：80617861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：PARP阻害剤は合成致死性により細胞死を誘導する薬剤で「優れた腫瘍選択性」、「低い毒性」から次世代の抗腫瘍薬として注目されているが、その単剤での効果は十分とはいえず、より効果的な治療法の検討が必要と考える。我々はテモゾロミド(TMZ)がPARP阻害剤の併用薬の候補であり、その相乗効果を報告してきた。また、TMZ単剤においては、MGMTの発現、MSIによる感受性の影響が報告されている。本研究では大腸癌における、PARP阻害剤、TMZ感受性の関連遺伝子について詳細に解析を進める。また臨床検体を用いた関連遺伝子の発現・変異の解析により、PARP阻害剤、TMZの大腸癌への個別化治療の確立を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TMZの抗腫瘍作用、さらにPARP阻害剤による増感作用に、また、臨床検体を用い大腸癌組織におけるMGMT修復、ミスマッチ修復の意義について検討することはPARP阻害剤による消化器癌治療を臨床応用するための重要な研究であると考えます。

研究成果の概要(英文)：PARP inhibitors are drugs that induce cell death by synthetic lethality, and are attracting attention as next-generation antitumor drugs due to their "excellent tumor selectivity" and "low toxicity", but the effect of the single agent is not sufficient. So, it is necessary to consider more effective treatment methods. We have reported that temozolomide (TMZ) is a candidate for a concomitant drug with a PARP inhibitor and its synergistic effect. In addition, the effects of MGMT expression and MSI susceptibility on TMZ monotherapy have been reported. In this study, we will analyze in detail the genes related to PARP inhibitors and TMZ susceptibility in colorectal cancer. We also aimed to establish clinically personalized treatment of PARP inhibitor TMZ for colorectal cancer by analyzing the expression and mutation of related genes using clinical specimens.

研究分野：消化器内科

キーワード：PARP阻害剤 MGMT TMZ MSI

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我々は新規分子標的薬の中でも、DNA 修復に異常を来した細胞に特異的に作用し、細胞死を誘導する PARP 阻害剤に注目し、研究協力者の National Cancer Institute (NCI), NIH の Pommier 教授の研究室と共同研究を施行していた。PARP 阻害剤の最大の利点は「優れた腫瘍細胞選択性」、「低い毒性」にあり過去の臨床試験においても有害事象はほぼ皆無であった。しかし、その単剤投与での効果は十分とはいえず、他剤との併用療法を含めたより効果的な治療法の検討が必要と考えた。我々は数十種類の薬剤の中からテモゾロミド (TMZ) が PARP 阻害剤との併用により高い相乗効果を示すことより、PARP 阻害剤の併用薬の候補となることを報告しており、この相乗効果には PARP 阻害剤により不活性化された PARP に集積する未修復の一本鎖 DNA よりも、高い細胞毒性を有する捕捉された PARP-DNA 複合体が関与していることが考えられた。TMZ は、アルキル化薬に属し、生体内でメチルジアゾニウムイオンとなり、DNA をメチル化することにより DNA 損傷を引き起こし、細胞周期の停止およびアポトーシスを誘導することにより細胞増殖を抑制する抗悪性腫瘍薬である。神経膠腫をはじめとし様々な癌種に使用されており、欧米では大腸癌における第 1 相臨床試験が報告されていた。DNA 修復酵素の O6-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) が高発現する腫瘍細胞では TMZ による O6-メチルグアニンを介する治療効果がすることが神経膠腫では知られていた。我々が癌ゲノムアトラス (TCGA: The Cancer Genome Atlas) 研究ネットワークデータより解析したところ、神経膠腫 (61.5%) だけでなく、大腸癌 (85.4%) においても高い頻度での MGMT の高発現が認められた。また、神経膠腫においては MGMT を介さず、Mismatch repair (MMR) の関連遺伝子欠損による MSI による TMZ 耐性獲得も報告されていた。MSI は全大腸癌の 10~20% を占めるといわれており、MSI 癌は遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (HNPCC) と散発性 MSI 癌の 2 つのグループに分けられる。HNPCC の患者では、MMR 関連遺伝子の変異により MSI となるのに対し、散発性大腸 MSI 癌の多くは MMR 遺伝子である MLH1 の異常メチル化により引き起こされると報告されていた。

2. 研究の目的

我々は、すでにヒト B 細胞株を用いて TMZ 単剤において MGMT の発現、MSI が TMZ 耐性に作用することを確認していた。このことより PARP 阻害剤、TMZ の感受性において、MGMT 発現と MSI が重要な役割を果たしていることが予想された。大腸癌における TMZ の PARP 阻害剤による増感性作用の関連遺伝子を中心にメカニズム解明し、最終的には臨床の場での個別化治療の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌における MGMT 発現や MSI と PARP 阻害剤、TMZ の効果の検討。

10 種類の大腸癌細胞株を用い、MGMT の発現についてウエスタンブロット法により確認する。次に MSI についてはマイクロサテライトマーカーを用いた MSI 検査に加え、MMR 関連遺伝子 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) の発現をウエスタンブロット法で確認することにより評価した。各細胞株の MGMT 発現・MSI を確認した後、TMZ と PARP 阻害剤の効果、Clonogenic survival assay, WST-1 assay などの細胞増殖アッセイにより評価し、MGMT 発現や MSI と PARP 阻害剤、TMZ 感受性の相関を解析した。さらに大腸癌細胞株のゲノム DNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法により、PARP 阻害剤、TMZ の感受性と関連した MGMT 遺伝子、MMR 関連遺伝子の遺伝子変異、プロモーター領域のメチル化の検索を行った。

(2) 大腸癌における PARP 阻害剤、TMZ の感受性における MGMT 発現と MSI の役割の検討。

MGMT 高発現、大腸癌細胞株を選択し、CRISPR/Cas9 システムを利用し MGMT knockout 大腸癌細胞株を樹立する。細胞増殖アッセイにより、コントロール細胞、MGMT knockdown 細胞の PARP 阻害剤、TMZ への感受性を比較検討した。次に MSI についても同様に、マイクロサテライト安定性 (MSS) の大腸癌細胞株を選択し CRISPR/Cas9 システムにより MMR 関連遺伝子 (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) knock out 細胞をそれぞれ樹立した。PARP 阻害剤、TMZ の感受性を評価し、MGMT、それぞれの MMR 関連遺伝子の PARP 阻害剤、TMZ 感受性への影響を比較検討する。また、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を検討することにより、MGMT 発現、MSI の役割を検討した。

(3) PARP 阻害剤、TMZ 併用における感受性、作用メカニズムの検討。

MGMT knockout 細胞、MMR 関連遺伝子 knockout 細胞、およびコントロール細胞に PARP 阻害剤、TMZ を併用投与する。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の解析を、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 染色により行い、MGMT 発現や MSI の有無での相違を評価する。また MGMT knockout 細胞、MMR 関連遺伝子 knockout 細胞およびコントロール細胞から mRNA を抽出し、PCR アレイを用い、DNA 修復、抗癌剤耐性に関連した遺伝子の発現変化について検討す

る。

4. 研究成果

(1) 大腸癌における MGMT 発現や MSI と PARP 阻害剤, TMZ の効果の検討。
大腸癌における MGMT 発現や MSI と PARP 阻害剤, TMZ の効果の検討の結果, 大腸癌においても MGMT の発現が高発現、低発現の細胞株があることを確認し, MGMT の発現のほとんどなく, かつ MSS の細胞については TMZ 単剤でも高い感受性を示すことがわかった。

(2) 大腸癌における PARP 阻害剤, TMZ の感受性における MGMT 発現と MSI の役割の検討。
MGMT を強制発現するかもしれない、MSH2, MLH1 等のマイクロサテライトに関わる遺伝子をノックアウトすると TMZ 単剤での感受性が明らかに低下することがわかった。

(3) PARP 阻害剤, TMZ 併用における感受性, 作用メカニズムの検討。
これまで TMZ 単剤では効果をもとめなかった MGMT 低発現細胞株 MSI の細胞株に対しても PARP 阻害剤, TMZ 併用することにより大腸がんにおいても感受性をあげることができた。またアポトーシスの誘導が上昇していることがフローサイトメトリーやウエスタンブロット法により確認できた。さらにこの際には PARP-DNA 複合体の形成が起きていることがクロマチンバンドのウエスタンブロット法により確認することができた。

上記の結果をまとめ現在英文誌への報告の準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 ICHIKAWA HIROSHI, NISHIE HIROTADA, YANO SHIGENOBU, KOMAI YUKI, YAMAGUCHI HIROAKI, NOMOTO AKIHIRO, SUZUKI TAKETO, TANAKA MAMORU, SHIMURA TAKAYA, MIZOSHITA TSUTOMU, KUBOTA EIJI, TANIDA SATOSHI, KATAOKA HIROMI	4. 巻 39
2. 論文標題 Antitumor Effect of a Novel Photodynamic Therapy With Acetylated Glucose-conjugated Chlorin for Gastrointestinal Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4199 ~ 4206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13580	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11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tanaka M., Suzuki T., Nishie H., Kataoka H.
2. 発表標題 THE EFFICACY OF PHOTODYNAMIC THERAPY WITH A NEW PHOTOSENSITIZER (TALAPORFIN SODIUM) AS A SALVAGE TREATMENT FOR ESOPHAGEAL CANCER WITH A FOCUS ON THE EFFECT OF VASCULAR SHUTDOWN
3. 学会等名 UEG Week 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka M., Suzuki T., Nishie H., Kataoka H.
2. 発表標題 The combination therapy Talaporfin photo dynamictherapy (PDT) and PARP inhibitor for gastric cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hirotada Nishie, Hiromi Kataoka
2. 発表標題 Efficacy of photodynamic therapy with a new photosensitizer (talaporfin sodium) as a salvage treatment for local failure of esophageal cancer.
3. 学会等名 17th International Photodynamic Association World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hirotada Nishie and Hiromi Kataoka
2. 発表標題 THE ANTITUMOR EFFECT OF TALAPORFIN PHOTO DYNAMIC THERAPY (PDT) COMBINED WITH THE PARP INHIBITOR OLAPARIB FOR GASTRIC CANCER
3. 学会等名 2019 DDW (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 守 鈴木健人 片岡洋望
2. 発表標題 食道癌化局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的療法 ~ 血管阻害効果の基礎的検討も含めて ~
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 守 片岡洋望
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムおよび半導体レーザーを用いた光線力学的療法
3. 学会等名 95回 内視鏡学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hirotada Nishie and Hiromi Kataoka
2. 発表標題 Efficacy of photodynamic therapy with a new photosensitizer (talaporfin sodium) as a salvage treatment for local failure after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer
3. 学会等名 2018 DDW (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Suzuki, M. Tanaka, H. Ichikawa, H. Nishie, M. Yoshida, H. Kataoka.
2. 発表標題 Vascular shut down effects of photodynamic therapy with Talaporfin
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 田中 守 片岡洋望
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的療法
3. 学会等名 Laser Week 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 守 西江 裕忠 片岡洋望
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的療法について
3. 学会等名 第61回日本消化器内視鏡学会東海支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mamoru Tanaka, Hirotada Nishie, Hiromi Kataoka
2. 発表標題 Efficacy of photodynamic therapy with a new photosensitizer (talaporfin sodium) as a salvage treatment for local failure after definitive chemoradiotherapy for esophageal cancer
3. 学会等名 IGICS (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	片岡 洋望 (Hiromi Kataoka) (40381785)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------