

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15267

研究課題名(和文) ゲムシタピンによるDNAダメージ修復経路を抑制するRRM1阻害の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of RRM1 inhibition regulating DNA damage repair signaling of Gemcitabine

研究代表者

小野 宏晃(Ono, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60466901

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)：本研究では東京医科歯科大学で施行された膵臓癌手術121症例におけるRRM1発現解析を行い、RRM1高発現と術後予後不良との関連性を明らかにした(OS $p=0.006$, DFS $p=0.0491$)。細胞実験によってゲムシタピンにより細胞質におけるRRM1が発現上昇した腫瘍細胞は耐性獲得に関連していることが分かった。また膵臓癌細胞においてRRM1阻害によりゲムシタピン感受性が増強された。本研究結果を2020年日本外科学会や日本消化器関連学会週間などで学会発表し、学術誌Plos ONEにて論文掲載された(PLoS One. 2021 Jun 10;16(6): e0252917)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりRRM1遺伝子が膵臓癌における有効的な治療ターゲットであることが分かりました。またゲムシタピン投与後の耐性獲得におけるダイナミズムに関連していることが明らかとなりました。膵臓癌におけるキードラッグであるゲムシタピンの抗癌剤作用を増強させる新規治療薬として本研究で着目したRRM1などリボヌクレオチドリダクターゼ阻害剤による治療が有用であることが示されました。今後はRRM1阻害剤の臨床応用を企図したさらなる解析を行っていきます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed RRM1 expression in 121 pancreatic cancer surgeries performed at Tokyo Medical and Dental University and found a significant association between high RRM1 expression and poorer postoperative prognosis (OS $p=0.006$, DFS $p=0.0491$). In vitro experiments showed that gemcitabine-induced cytoplasmic upregulation of RRM1 in tumor cells was associated with the acquisition of drug resistance. In addition, RRM1 inhibition using siRNAs and hydroxyurea enhanced gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cells. The result of this study was presented at medical conferences such as the 2020 Japanese Surgical Association and the Japan Digestive Disease Week and was accepted for publication in the journal, Plos ONE (Cytoplasmic RRM1 activation as an acute response to gemcitabine treatment is involved in drug resistance of pancreatic cancer cells. Kato T, Ono H, Fujii M, Akahoshi K, Ogura T, Ogawa K, Ban D, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M. PLoS One. 2021 Jun 10;16(6): e0252917).

研究分野：腫瘍外科

キーワード：膵臓癌 ゲムシタピン RRM1 抗癌剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は本邦において、罹患数だけでなく死亡数も年々増加してきている。膵癌においては臓器特性上、早期発見や生検による早期診断が技術的に困難であり、また生物学的悪性度が高く発見されたときにはすでに進行癌であることが多い。極めて難治性が高い膵臓癌において新しい抗がん剤治療の開発ならびにその副作用の軽減化を図ることは今後の膵臓癌治療において喫緊の課題である。

2. 研究の目的

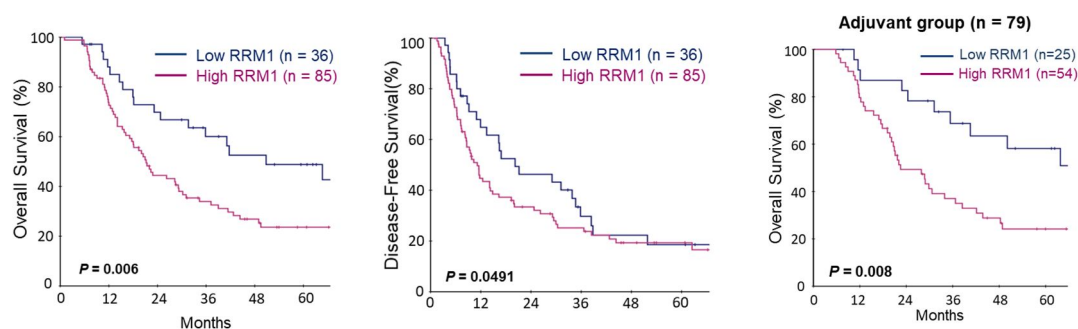
本研究では、RRM1 遺伝子に着目した。膵臓癌患者における RRM1 遺伝子の発現レベルを解析し術後予後との関連性を評価した。さらに *in vitro* 解析により RRM1 を機能的に阻害することで DNA ダメージ修復経路の不活性化を惹起し、腫瘍細胞におけるゲムシタピンによる DNA ダメージが蓄積、効果的な細胞死を誘導しうるか立証した。また膵臓癌におけるゲムシタピン投与における RRM1 遺伝子の機能的役割を解明し、RRM1 を機能的に阻害することで DNA ダメージ修復経路の不活性化を惹起し、腫瘍細胞におけるゲムシタピンによる DNA ダメージが蓄積、効果的な細胞死を誘導しうるかどうか解析を行い、新規治療としての有用性の検証を行った。

3. 研究の方法

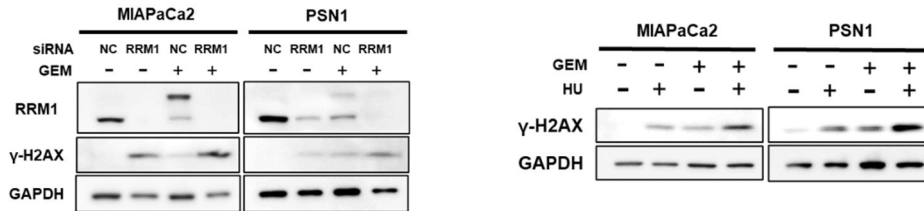
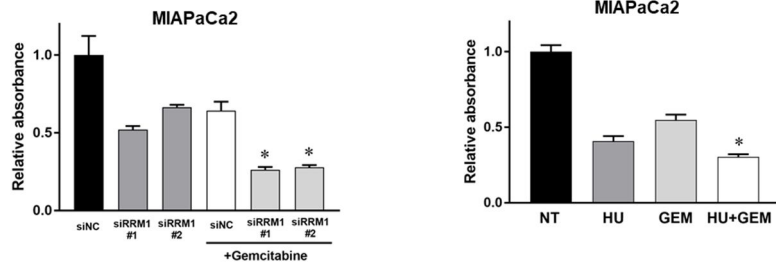
(1) 東京医科歯科大学病院において根治手術が施行された膵臓癌患者 121 症例における RRM1 発現解析を行い、術後予後との関連性を評価した。
(2) 膵臓癌細胞株 MIAPaCa2 と PSN1 を用いて RRM1 機能抑制 (siRNA およびハイドロキシウレア) によりゲムシタピン投与による細胞増殖能や DNA ダメージへの相乗効果を評価した。
(3) ゲムシタピン投与による RRM1 遺伝子の発現変化を解析し、さらにヒストンアセチル化との関連性を評価した。ゲムシタピン投与による生存細胞とアポトーシスが誘導されている細胞における発現解析を行い、RRM1 発現変化とゲムシタピン投与による急性期での耐性獲得への関連性を評価した。

4. 研究成果

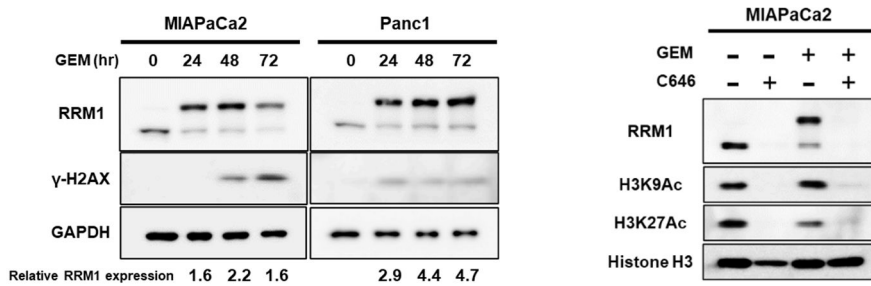
(1) 東京医科歯科大学において根治手術が施行された膵臓癌患者 121 症例における RRM1 発現レベルを組織免疫化学染色において解析した。121 症例中の 85 症例 (70%) が RRM1 高発現していることが分かった。RRM1 遺伝子発現は IPMN、SCN、MCN といった膵臓における悪性度の低い腫瘍病変では発現上昇が認められず、浸潤性膵管癌に特徴的な発現パターンであることが示唆された。RRM1 遺伝子発現レベルと術後予後 (OS: 全生存期間、DFS: 無再発生存期間) との関連性を評価し、RRM1 高発現と術後予後悪化との関連性が明らかとなった (OS $p=0.006$ 、DFS $p=0.0491$)。特に術後補助化学療法を施行した 79 症例において RRM1 高発現と術後予後との関連性を調べたところ、RRM1 高発現患者では予後不良であることが分かった ($p=0.008$)。さらに RRM1 発現を含む臨床病理学的な因子と術後予後との関連性を COX 比例ハザード解析による多変量解析を用いて評価し RRM1 遺伝子の高発現レベルは独立した予後規定因子であることを明らかにした。



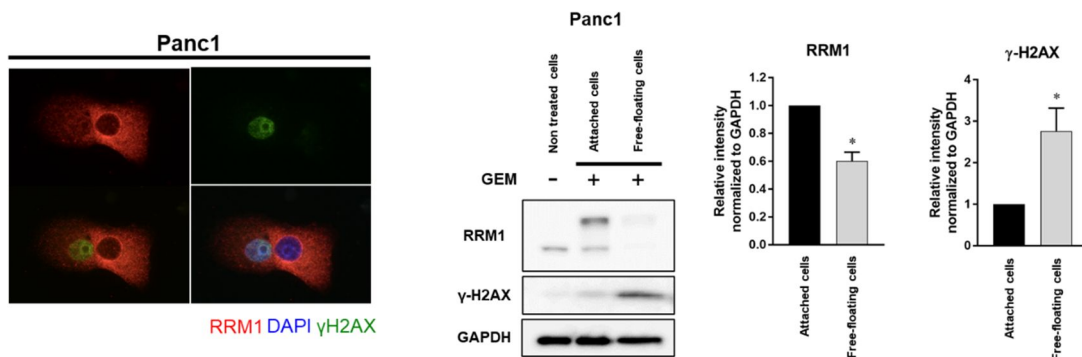
(2) 膵臓癌細胞株 MIAPaCa2 と PSN1 を用いて RRM1 機能抑制 (siRNA およびハイドロキシウレア) を用いてゲムシタピン投与による細胞増殖能は WST-8 アッセイによって、DNA ダメージへの影響はウエスタンブロットによる γ -H2AX 発現レベルで解析し、RRM1 機能抑制によるゲムシタピンによる感受性における相乗効果を評価した。RRM1 機能抑制により単独で細胞増殖の抑制や DNA ダメージの蓄積が認められた他、ゲムシタピンによる増殖抑制能や DNA ダメージレベルは RRM1 機能抑制によりさらに増強した ($p<0.05$)。



(3) 膵臓癌細胞株に対してゲムシタピン暴露 24 時間から DNA ダメージ蓄積に先立って RRM1 発現変化が認められた。ゲムシタピン投与により通常のバンドに比して高い分子量における RRM1 発現変化が確認された。RRM1 発現レベルならびにゲムシタピンにより発現変化した RRM1 発現レベルはヒストンアセチル化阻害である C646 投与により抑制されることから、RRM1 発現レベルにヒストンアセチル化による関連性と、さらにゲムシタピン投与による発現変化にはヒストンアセチル化による翻訳後修飾が影響している可能性が示唆された。



(4) ゲムシタピン投与後の発現変化を蛍光免疫染色およびウエスタンブロットにより解析した。ゲムシタピン投与による DNA ダメージが認められた腫瘍細胞では RRM1 の発現レベルが低下した。一方でゲムシタピンによる DNA ダメージ蓄積が認められない腫瘍細胞では RRM1 の細胞質レベルでの発現上昇が認められた。ゲムシタピン投与後の接着細胞と培養上清内の細胞フラクションを分離することで、生存細胞と DNA ダメージが蓄積するアポトーシス誘導細胞を分離した。ゲムシタピン投与による接着能を維持する生存細胞では RRM1 発現変化が認められ、一方で DNA ダメージが蓄積した腫瘍細胞ではこれら RRM1 発現変化が認められず発現低下していることが示された。これら実験結果から、ゲムシタピン投与による急性期における細胞質での RRM1 発現上昇はゲムシタピン抵抗性を獲得した細胞にのみ認められ、RRM1 発現変化とゲムシタピン耐性獲得との関連性があると結論した。



2020年、第120回日本外科学会定期学術集会および第28回日本消化器関連学会週間などの学術会議においてこれら新規知見を発表した。さらに学術誌 Plos ONE に Cytoplasmic RRM1 activation as an acute response to gemcitabine treatment is involved in drug resistance of pancreatic cancer cells. Kato T, Ono H, Fujii M, Akahoshi K, Ogura T, Ogawa K, Ban D, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M. PLoS One. 2021 Jun 10;16(6): e0252917. doi: 10.1371/journal.pone.0252917. eCollection 2021. PMID: 34111175 として論文掲載された。

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 1件）

1. 著者名 Kato T, Ono H, Fujii M, Akahoshi K, Ogura T, Ogawa K, Ban D, Kudo A, Tanaka S, Tanabe M	4. 巻 10;16(6)
2. 論文標題 Cytoplasmic RRM1 activation as an acute response to gemcitabine treatment is involved in drug resistance of pancreatic cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos ONE	6. 最初と最後の頁 e0252917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0252917	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤智敬、小野宏晃、渡辺秀一、赤星径一、小倉俊郎、小川康介、伴 大輔、工藤 篤、田中真二、田邊 稔
2. 発表標題 RRM1と膵臓癌における予後およびGemcitabine暴露によるDNAダメージ修復に関連した機能解析ならびに新規治療ターゲットとしての有用性の探索
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤智敬、小野宏晃、渡辺秀一、石川喜也、赤星径一、小川康介、伴 大輔、工藤 篤、田邊 稔
2. 発表標題 膵臓癌予後ならびにGemcitabine耐性にかかわるRRM1の新規治療ターゲットとしての有用性
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------