

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18192

研究課題名(和文)細胞周期依存的なDNA修復機構を基盤としたがん特異的な放射線増感法の開発

研究課題名(英文)Development of radiation sensitization for cancer cells based on cell cycle-dependent DNA repair system

研究代表者

砂田 成章(Sunada, Shigeaki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：70807677

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):本研究は、細胞周期とDNA修復の両方に作用するCDK1阻害剤が、DNA損傷応答においてどのように影響するかを調べた。CDK1阻害剤は、濃度依存的にDNA修復を抑制し、比較的低濃度域では、放射線等のDNA損傷に対する感受性を亢進させた。一方で、G2/M期アレストを引き起こすような高濃度域のCDK1阻害剤は、DNA損傷を抱えた細胞のM期移行ならびに異常な分裂を抑制し、感受性が抵抗性へ逆転することを見出した。さらに、G2期細胞では、相同組換え(HR)修復経路が活性化される。しかし、その修復過程で必須のBRCA2の機能が低下すると、上記の感受性の逆転現象は見られず、高感受性が維持されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、CDK1阻害剤によるG2/M期アレストの誘導は、BRCA2野生型細胞において放射線抵抗性を引き起こし、BRCA2欠損型細胞において放射線感受性を引き起こすことを見出した。細胞周期制御が介入することで、DNA損傷応答が大きく影響されることを示した。また、これらの成果から、HR修復に異常を有する遺伝性乳がん卵巣がんに対して、特異的な放射線増感効果を引き起こす治療戦略の提案が期待される。

研究成果の概要(英文):We investigated how a CDK1 inhibitor affects DNA damage response in the interaction between cell cycle and DNA repair. The inhibitor blocked DNA repair capacity in dose dependent manner. However, relatively high dose of the inhibitor that induced G2/M cell cycle arrest showed a radio-resistance effect despite low dose showed radio-sensitization effect. Then, we found that the high dose of CDK1 inhibitor-induced cell cycle arrest blocked G2/M phase transition with DNA damage and an aberrant cell division, resulting in reversible DNA damage sensitivity. In addition, G2 phase cells under the inhibitor treatment likely selected homologous recombination (HR) repair pathway. This selective repair pathway choice caused a high sensitivity to DNA damage in BRCA2 deficient cells because the BRCA2 function was required in HR repair pathway.

研究分野：放射線生物学、分子腫瘍学

キーワード：G2/M細胞周期アレスト CDK1阻害剤 相同組換え修復 放射線感受性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞周期依存的な DNA 修復選択機構

細胞に対して深刻な損傷である DNA 二本鎖切断 (double strand break : DSB) は、主に相同組み換え (homologous recombination : HR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) の 2 つの経路で修復される。これら 2 つの修復経路の選択は、細胞周期により制御されている。細胞周期依存的な修復経路選択機構として、S/G2 期における DSB 修復では、HR 修復経路が活性化していることが報告された (MH. Yun et al, Nature 2009)。従って、HR 修復関連分子の機能が低下している細胞は、S/G2 期において、放射線をはじめとした DNA 損傷に対して特異的な感受性を示すと考えられる。

(2) DNA 修復能が低下した遺伝性腫瘍に対する合成致死

遺伝性乳がん卵巣がんの原因遺伝子である BRCA1 や BRCA2 は、HR 修復過程で重要な役割を果たしており、それらに変異を有するがん細胞は、HR 修復能が低下している。このようながん細胞は、DNA 損傷型抗がん剤に対して高い感受性を示す。このように DNA 修復が正常に機能する正常細胞との修復能の違いを利用し、がん特異的に致死効果を与える“合成致死”は、副作用が少ない治療戦略として臨床研究が数多く進められている (A. Ashworth et al, Journal of Clinical Oncology 2008)。

以上(1), (2)から、HR 修復機能が低下した遺伝性乳がん卵巣がんが、放射線をはじめとした DNA 損傷に対する感受性が最も効果的な時期は、S/G2 期であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、がん特異的に治療効果を高める因子を探索し、放射線増感法の臨床開発を目指す。特に研究背景で述べたように、細胞周期に依存した DNA 修復選択機構を利用した増感治療戦略を提案する。細胞周期制御については、G2/M 期チェックポイントを制御する CDK1 阻害剤により、G2 期に細胞を同調させる方法を利用する。

そこで本研究では、CDK1 阻害剤による細胞周期制御と放射線の併用によるがん特異的な放射線増感法を開発し、臨床応用の基礎を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

(A) CDK1 阻害剤処理下における放射線感受性解析

特異的な CDK1 阻害剤 R0-3306 処理による細胞周期影響の経時変化および、放射線併用時の放射線感受性の濃度依存性を調べる。DNA 損傷誘導は、主に X 線照射により実施する。HR 修復異常を有する細胞として、BRCA2 機能欠損のヒトがん細胞株 DLD1 BRCA2(-/-) や Capan-1 等を使用する。具体的には、細胞周期解析により G2/M 期アレストを引き起こす R0-3306 の濃度を調べ、続いて、放射線との併用による感受性 (細胞毒性) を、コロニー形成試験により評価する。特に、HR 修復能の有無による影響を解析する。

(B) CDK1 阻害剤と放射線併用によるメカニズム解析

R0-3306 処理下における放射線の DNA 損傷応答の詳細を調べる。まず、DNA 修復挙動として、DSB の指標である H2AX 発現の経時変化を調べる。さらに、HR 修復経路に対する影響として、RPA や Rad51 のフォーカス形成法ならびに、関連する分子の発現をウエスタンブロット法により解析する。R0-3306 の様々な処理条件を検討、詳細なメカニズムを調べる。

4. 研究成果

本研究は、CDK1 阻害剤と放射線の併用による DNA 損傷応答を解析、がん特異的な放射線増感法の開発を目指した。

はじめに、CDK1 阻害剤 R0-3306 による細胞周期制御が、HR 修復経路に対してどのように影響するかを調べた。その結果、R0-3306 による G2/M 期における細胞周期アレストは、HR 修復経路の最初の段階である DNA 末端リセクションの関連因子を活性化、HR 修復経路選択を促進させることを見出した。次に、R0-3306 処理下における放射線感受性を調べた。BRCA2 欠損型の細胞では、予想通り R0-3306 濃度依存的に放射線の感受性が亢進されることを見出した。一方で興味深いことに、BRCA2 野生型の細胞において、G2/M 期アレストを誘導しない R0-3306 濃度 (2 μ M ; 以下、低濃度 R0) と誘導する R0-3306 濃度 (10 μ M ; 以下、高濃度 R0) は、異なる放射線感受性、前者は放射線増感、後者は放射線抵抗性を示した。CDK1 阻害剤は、BRCA1 をはじめとした HR 修復因子の機能抑制に関わるため、DNA 損傷剤との併用により増感作用を引き起こすことが知られている (N. Johnson et al, Molecular Cell 2009)。しかし、高濃度 R0 は、逆に放射線に対して抵抗性を示したことは上記報告と矛盾する。

そこで、BRCA2 野生型細胞において、R0-3306 の濃度により放射線感受性が逆転する当該現象について、さらに詳細に解析した。まず、DSB を指標とした DNA 修復過程を調べた。その結果、DMSO, 低濃度 R0, 高濃度 R0 のうち、低濃度 R0 において DSB 修復抑制効果が最も高くなった。

このことは、放射線感受性評価の結果とも一致する。続いて、R0-3306 と放射線併用時の細胞周期と DSB 修復過程の関連性を調べた。その結果、高濃度 R0 は、放射線照射後も長期的な G2/M 期アレストを引き起こし、DNA 損傷が G2 期から M 期に持ち込まれることを回避させることを見出した。さらに、このような強制的な G2/M 期アレスト下では、CDK1 阻害剤による DNA 修復抑制が作用しているにもかかわらず、DNA 修復が進められることを見出した。つまり、未修復の DNA 損傷が M 期に持ち込まれるという致命的なイベントが避けられることで、R0-3306 処理濃度の増加に伴い、放射線感受性の増進から抵抗性へと反転したと考えられる。

以上、CDK1 阻害剤による G2/M 期アレストの誘導は、BRCA2 野生型細胞において放射線抵抗性を引き起こし、BRCA2 欠損型細胞において放射線感受性を引き起こした。従って、HR 修復に異常を有する遺伝性乳がん卵巣がんに対して、特異的な放射線増感効果を引き起こすとともに、今後の臨床開発が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshikawa Hiroto, Sunada Shigeaki, Hirakawa Hirokazu, Fujimori Akira, Elmegeghi Suad, Leary Del, Kato Takamitsu	4. 巻 20
2. 論文標題 Radiobiological Characterization of Canine Malignant Melanoma Cell Lines with Different Types of Ionizing Radiation and Efficacy Evaluation with Cytotoxic Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 841 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms20040841	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 該当する

1. 著者名 Cartwright Ian M., Su Cathy, Haskins Jeremy S., Salinas Victoria A., Sunada Shigeaki, Yu Hao, Uesaka Mitsuru, Hirakawa Hirokazu, Chen David J., Fujimori Akira, Kato Takamitsu A.	4. 巻 19
2. 論文標題 DNA Repair Deficient Chinese Hamster Ovary Cells Exhibiting Differential Sensitivity to Charged Particle Radiation under Aerobic and Hypoxic Conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2228 ~ 2228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.3390/ijms19082228	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂田成章、斉藤広子、三木義男
2. 発表標題 細胞周期依存的なDNA修復機構を利用したがん特異的な放射線増感法の開発
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会
4. 発表年 2018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
研究協力者	斉藤 広子 (Saito Hiroko)	公益財団法人がん研究会・がん研究所 (72602)	

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 協力者	三木 義男 (Miki Yoshio) (10281594)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授 (12602)	