

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591274  
 研究課題名（和文） DNA複製を障害する抗癌剤の作用メカニズムの解明と治療への応用  
 研究課題名（英文）  
 Molecular mechanisms of the antineoplastic agents inhibiting DNA replication and their applications to cancer patient treatment  
 研究代表者  
 岡村 純（OKAMURA JUN）  
 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター臨床研究部・臨床研究部長  
 研究者番号：40360854

## 研究成果の概要：

本研究は、メソトレキセート(MTX)、6-MP、Ara-Cといった抗癌剤がDNA複製を障害する分子メカニズムを明らかにし、この過程を修飾する諸因子を明らかにすることで、これら因子群を薬剤感受性バイオマーカーとして開発することを目的とした。Ara-C、6-MPなどの塩基アナログ、およびMTXなどの葉酸拮抗剤が、DNA合成においてDNAポリメラーゼがヌクレオチドを取り込む反応を阻害する具体的な分子メカニズムを明らかにするために、ヒト細胞において主にDNA複製を担うDNAポリメラーゼのひとつ、pol delta複合体の精製をおこなった。また、このような精製標品や細胞粗抽出液を用いて、DNA複製反応におけるこれら抗癌剤の効果を観察するために、2本鎖環状DNA(プラスミド)基質を用いたgap-fillingアッセイ系を構築した。さらに、ヌクレオチド・プール不均衡がどのようにDNA複製を修飾するのか、5-FUによりもたらされるヌクレオチド・プール不均衡をモデルとして、基礎的検討を行うことを計画した。ヌクレオチド・プール不均衡は、チミジル酸合成酵素遺伝子発現の多寡によって修飾される。チミジル酸合成酵素遺伝子発現レベルを薬剤によって調節可能な細胞株が樹立されたため、この系を用いて、今後詳細な観察を行う。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：DNA複製、抗癌剤、代謝拮抗剤、塩基アナログ、chain terminator、DNAポリメラーゼ

## 科学研究費補助金研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

あらかじめ抗癌剤の効果を予測し、化学療法をより効果的で、且つ効率良いものにする。これは、「個別化」や「テーラー・メイド」といったフレーズが用いられるようになる前から、一貫して腫瘍臨床に携わるものが共有していた願いである。抗癌剤感受性研究の歴史は長い。細胞の抗癌剤感受性を規定する関数をそのままブラックボックスとする抗癌剤感受性試験の立場と、敢えて関数の中の重要な変数を捜そうとする感受性因子研究の立場とがとられてきた。これまで感受性因子としてみつかったものは、細胞膜上のトランスポーター分子や細胞質内の解毒機構などであった。現在、DNAマイクロアレイに象徴される大規模スクリーニング技術の発達とポストゲノムの情報とが一体となって、新たな感受性因子探索が行われている。しかし、抗癌剤のバラエティーに目をやると、ビンカアルカロイドやタキサン系薬剤以外のすべての抗癌剤がDNA代謝阻害剤であることに気付く。DNA代謝の諸過程、すなわち複製、転写、修復過程が、これら抗癌剤の作用点であることは明らかである。しかし、これまでDNA修復をはじめとするDNA代謝過程が感受性因子として注目されることは少なかった。最近になって漸く、DNA修復の感受性因子としての意義がクローズ・アップされるようになったが、DNA代謝諸活性の抗癌剤感受性因子としての意義はまだまだ追求されねばならない。とくに、DNA複製は、小児悪性腫瘍の抗癌剤治療において主要な役割を演じるメソトレキセート(MTX)、6-MP、Ara-Cといった薬剤において、重要な作用点となっている。これらの薬剤は、以下のように、それぞれ異なった機序でDNA複製を阻害していることが予想される。

- A. ヌクレオチド・プール不均衡によるDNA複製障害 – MTX, 5-FU etc
- B. ミスマッチ修復の活性化によるDNA複製障害 – 6-MP, 5-FU(?) etc
- C. DNA単鎖伸長反応の阻害によるDNA複製障害 – Ara-C, Fludarabine, Gemcitabine etc

これらの薬剤が実際にどのように DNA 複製

を障害し、また、どのような因子がその過程を修飾するのかを明らかにすることで、強力な感受性因子が発見されることが予想され、ひいては、臨床の現場において有用な治療アルゴリズムが策定できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、メソトレキセート(MTX)、6-MP、Ara-C といった抗癌剤が DNA 複製を障害する分子メカニズムを明らかにし、この過程を修飾する諸因子を明らかにすることを目的とした。さらに、このような感受性因子候補の多様性を実際の腫瘍細胞/組織で探索する検査技術を開発し、得られた解析結果と治療効果との関係をレトロスペクティブに検討し、プロスペクティブな臨床研究をデザインすることを目標とした。最終的には、これら感受性因子による治療アルゴリズムを提案したい。

## 3. 研究の方法

## (1)塩基アナログの作用機序

DNA複製機構において、ポリメラーゼは塩基アナログ、Ara-C、6-MPをヌクレオチドとして取り込むと考えられている。したがって、まずヒト複製型ポリメラーゼとしてDNAポリメラーゼデルタ(pol delta)を精製することを計画した。

このポリメラーゼは4個サブユニットからなるが、その中のひとつのサブユニットp12を、FLAG-tagを付してHEK293細胞で発現させることで、FLAG-tagによりpol delta複合体が精製可能である。精製したpol delta複合体を使って、プライマー伸長反応により、Ara-C、6-MP存在下で、どのようにDNA合成が停止するか観察することを計画した。停止したpol delta複合体に結合した蛋白質は質量分析等を用いて同定可能であり、このようなタンパク質をコードする遺伝子を明らかにすることで、複製停止反応の詳細が明らかにできる。

新規の修飾因子の候補となったものについてはまず、遺伝子発現解析、感受性解析など、*in vitro*の詳細な検討を行うこととした。

その後、臨床検体を用いた発現解析などを計画した。

#### (2)メソトキセート(MTX)の作用機序

MTXや5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗剤は、ヌクレオチドプール不均衡をもたらすものと考えられている。ヌクレオチドプール不均衡がDNA複製をどのように修飾するのか、プライマー伸長反応や2本鎖環状DNA(プラスミド)基質を用いたgap-filling反応を用いて、*in vitro*や培養細胞系で再現されたヌクレオチドプール不均衡の効果を検証することが可能である。また、この効果は、ヌクレオチド不均衡の程度を修飾することが可能な系では、より詳細に観察することができる。複製が停止した部位における構造は、プラスミド基質を大腸菌ホストに回収することで、PCRやDNAシーケンシングにより明らかにできる。

#### 4. 研究成果

平成19年度は、Ara-C、6-MPなどの塩基アナログ、およびメソトキセート(MTX)などの葉酸拮抗剤が、DNA合成においてDNAポリメラーゼがヌクレオチドを取り込む反応を阻害する具体的な分子メカニズムを明らかにするために、ヒト細胞において主にDNA複製を担うDNAポリメラーゼepsilonやdelta複合体の精製を開始した。このような精製標品を用いて、プライマー伸長反応や2本鎖環状DNA(プラスミド)基質を用いたgap-filling反応により、*in vivo*のDNA複製を再現する系を構築することができる。このような系において、上述した薬剤のDNA複製に対する効果を観察することができる。とくに、複製が停止した部位における構造を、プラスミド基質を大腸菌ホストに回収することで、PCRやDNAシーケンシングにより明らかにできる。このようなDNAポリメラーゼ複合体の精製は現在も継続して行っている。また、細胞粗抽出液を用いることによっても同様な観察がおこなえる。平成20年度からは、2本鎖環状DNA(プラスミド)基質を用いたgap-fillingアッセイ系の構築を開始した。また、MTX、5-FUなどの代謝拮抗剤が、DNA合成においてDNAポリメラーゼがヌクレオチドを取り込む反応を阻害する具体的な分子メカニズムを明らかにするた

めに、ヌクレオチド・プール不均衡がどのようにDNA複製を修飾するのか、5-FUによりもたらされるヌクレオチド・プール不均衡をモデルとして基礎的検討を行うことを計画した。現在、M13mp18を用いたgap-fillingアッセイ系がほぼ確立され、細胞粗抽出液を用いて、DNA複製の基本的なカイネティクスを明らかにしつつある。この系において、今後上述した薬剤のDNA複製に対する効果を詳細に観察する。一方、5-FUによりもたらされるヌクレオチド・プール不均衡は、チミジル酸合成酵素遺伝子発現の多寡によって修飾される。チミジル酸合成酵素遺伝子発現レベルを薬剤によって調節可能な細胞株が樹立されたため、この系を用いて、今後ヌクレオチド・プール不均衡がどのようにDNA複製を修飾するのか、詳細な観察を行いたい。

#### 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5件)

- ① Shimizu Y, Takamori A, Utsunomiya A, Kurimura M, Yamano Y, Hishizawa M, Hasegawa A, Kondo F, Kurihara K, Harashima N, Watanabe T, Okamura J, Masuda T, Kannagi M: Impaired Tax-specific T-cell responses with insufficient control of HTLV-1 in a subgroup of individuals at asymptomatic and smoldering stages. *Cancer Sci* 100: 481-489, 2009 (査読：有)
- ② Tanosaki R, Uike N, Utsunomiya A, Saburi Y, Masuda M, Tomonaga M, Eto T, Hidaka M, Harada M, Choi I, Yamanaka T, Kannagi M, Matsuoka M, Okamura J: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using reduced-intensity conditioning for adult T-Cell leukemia/lymphoma: impact of antithymocyte globulin on clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 14: 702-708, 2008(査読：有)
- ③ Inagaki J, Nagatoshi Y, Hatanao M,

Isomura N, Okamura J: Low-dose methotrexate for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease in children. *Bone Marrow Transplant* 41: 571-577, 2008(査読 : 有)

- ④ Hattori H, Suminoe A, Wada M, Koga Y, Kohno K, Okamura J, Hara T, Matsuzaki A: Regulatory polymorphisms of multidrug resistance 1(MDR1) gene are associated with the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res* 31: 1633-1640, 2007(査読 : 有)
- ⑤ Okamura J, Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R: Allogeneic stem cell transplantation for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Hematol* 86: 118-125, 2007(査読 : 有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Okamura J, Tanosaki R, Utsunomiya A, Uike N, Yamanaka T: Long-term survival of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) by reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) from HLA-matched sibling donors (MSD): The Japanese ATL-RIST study. 33<sup>rd</sup> European Society for Medical Oncology Congress (2008/9/12-16, Stockholm)
- ② Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi T, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Nagafuji K, Hara M, Yoshida F, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Kawase T, Nagamura-Inoue T, Matsuo K, Kato S, Morishima Y, Okamura J, Koderu Y, Uchiyama T: Allografting for adult T-cell leukemia/lymphoma: a nationwide retrospective analysis. 79<sup>th</sup> American Society of hematology (2007/12/10, Atlanta)
- ③ Okamura J: Treatment results of acute lymphoblastic leukemia in children: Japanese experience. 2<sup>nd</sup> Workshop of Asian Hematology (2007/10/31, Bangkok)

- ④ Shimizu Y, Kurihara K, Takamori A, Harashima N, Utsunomiya A, Okamura J, Nishigaki K, Masuda T, Kannagi M: Diversity in Tax specific T-cell responses among asymptomatic HTLV-I carriers. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses (2007/5/22-25, Hakone)
- ⑤ Harashima N, Shimizu Y, Takamori A, Kurihara K, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Okamura J, Kannagi M: Positive conversion of Tax-specific CTL response in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses (2007/5/22-25, Hakone)
- ⑥ Takamori A, Kurihara K, Shimizu Y, Harashima N, Choi I, Uike N, Tanosaki R, Utsunomiya A, Okamura J, Kannagi M: Presence of Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in adult T-cell leukemia patients and their functional failure. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses (2007/5/22-25, Hakone)
- ⑦ Uike N, Utsunomiya A, Tanosaki R, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Hidaka M, Choi I, Yufu Y, Matsuoka M, Kannagi M, Okamura J: Comparable Outcome of Reduced-Intensity Conditioning with or without Antithymocyte Globulin in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Adult T-cell Leukemia: The Results of Two Prospective Studies. 13<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology; HTLV and Related Viruses (2007/5/22-25, Hakone)
- ⑧ Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Masuda M, Saburi Y, Tomonaga M, Etoh T, Kikuchi H, Harada M, Kawano F, Choi I, Matsuoka M, Kannagi M, Sonoda S, Okamura J: Kinetics of HTLV-1 proviral loads after allogeneic

hematopoietic stem cell  
transplantation using reduced  
intensity conditioning for adult T-cell  
leukemia/lymphoma. 13<sup>th</sup>  
International Conference on Human  
Retrovirology; HTLV and Related  
Viruses (2007/5/22-25, Hakone)

[図書] (計2件)

- ① 崔日承、岡村純: 成人T細胞白血病/リンパ腫に対する移植. 神田善伸編 みんなに役立つ造血幹細胞移植の基礎と臨床 医薬ジャーナル社 2008年(5頁)
- ② 稲垣二郎、岡村純: Oncologic emergency; 合併症と支持療法. 小児がんの診断と治療 診断と治療社 2007年(6頁)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)  
○取得状況 (計0件)

[その他]

<http://www.ia-nkcc.jp/rinsho/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡村 純 (OKAMURA JUN)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部・部長

研究者番号: 40360854

### (2)研究分担者

織田 信弥 (ODA SHINYA) (H19年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍遺伝学研究室・室長

研究者番号: 40333372

倉岡 功 (KURAOKA ISAO) (H19年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍生化学研究室・室長

研究者番号: 60335396

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOUICHI) (H19年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部癌分子治療研究室・研究員

研究者番号: 00280793

田口 健一 (TAGUCHI KENICHI) (H19年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍病理学研究室・研究員

研究者番号: 40325527

山中 竹春 (YAMANAKA TAKEHARU) (H19年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍統計学研究室・研究員

研究者番号: 00325466

### (3)連携研究者

織田 信弥 (ODA SHINYA) (H20年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍遺伝学研究室・室長

研究者番号: 40333372

倉岡 功 (KURAOKA ISAO) (H20年度)

大阪大学大学院 基礎工学研究科・準教授  
研究者番号: 60335396

瀧口 総一 (TAKIGUCHI SOUICHI) (H20年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部癌分子治療研究室・研究員

研究者番号: 00280793

田口 健一 (TAGUCHI KENICHI) (H20年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍病理学研究室・研究員

研究者番号: 40325527

山中 竹春 (YAMANAKA TAKEHARU) (H20年度)

独立行政法人国立病院機構九州がんセンター  
一臨床研究部腫瘍統計学研究室・研究員

研究者番号: 00325466