

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08369

研究課題名（和文）FTDとCHK1阻害の二重標的による食道扁平上皮癌に対する新たな治療戦略の確立

研究課題名（英文）Synthetic lethality with FTD and CHK1 inhibitor for esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

大橋 真也（OHASHI, SHINYA）

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20435556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：食道扁平上皮癌細胞にトリフルリジン（FTD）を投与した際のDNA修復応答を検証し、FTDがCHK1のリン酸化を強く誘導することを発見した。食道扁平上皮癌細胞にFTDとCHK1シグナル阻害剤を併用投与すると、FTDにより誘導されるDNA障害作用、細胞傷害作用が増強した。また、FTDとCHK1阻害剤の併用治療は、食道癌xenograft腫瘍、食道癌PDX腫瘍のいずれの腫瘍に対しても有効な抗腫瘍効果を示した。さらに、FTDとCHK1阻害剤による薬物治療は放射線感受性を増強し、これらの併用治療が食道扁平上皮癌に対し強力な抗腫瘍効果を示すこともin vitro, in vivoの実験系で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道扁平上皮癌は集学的治療を行っても依然死亡率の高い難治性癌であり、食道扁平上皮癌の予後改善のためには有効性の高い抗がん剤治療の開発が急務である。本研究成果により、トリフルリジンとCHK1阻害剤の併用治療が食道扁平上皮癌細胞に対する新たな治療法となりうる可能性が示唆された。今後、臨床応用へ向けたさらなる研究開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed the DNA damage response when esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells was treated with FTD, and found that FTD strongly induces CHK1 phosphorylation in ESCC cells. CHK1 inhibitors enhanced the FTD-induced DNA damage and/or cytotoxic effects in vitro. Furthermore, combination treatment with FTD and CHK1 inhibitors showed an effective antitumor effects on ESCC xenograft tumors as well as PDX tumors. Moreover, we showed that drug treatment with FTD and CHK1 inhibitors significantly enhances radiosensitivity, and the combination treatment with FTD, CHK1 inhibitor and radiotherapy showed a potent antitumor effects on ESCC.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道扁平上皮癌 CHK1シグナル阻害 DNA修復応答 トリフルリジン 放射線感受性

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、手術、放射線治療、抗癌剤治療などの集学的治療を行っても、依然死亡率の高い難治性癌である。抗癌剤治療はこれらの集学的治療の中で重要な役割を果たすが、奏効率は20-40%と満足いくものではない。したがって食道扁平上皮癌の予後改善のためには有効性の高い抗癌剤治療の開発が急務である。我々は食道扁平上皮癌治療に対する新規治療法開発においてトリフルリジン (FTD) に着目する。トリフルリジンはDNA構成成分であるチミンと似た構造をもつDNA合成阻害薬で、切除不能の進行・再発大腸癌に対する治療薬として臨床応用されている。我々はこれまでに、食道扁平上皮癌細胞にトリフルリジンを投与するとCHK1シグナルが活性化されることを見出した。トリフルリジン (FTD) 投与により、CHK1シグナルが活性化されることは細胞内にDNA障害が生じDNA修復シグナルが活性化していることを示唆し、その条件 (FTD投与) 下でCHK1阻害剤を投与すると食道がん細胞におけるDNA修復経路が高度に不活化され、最終的に致死的となり、効果的な抗癌作用を示すのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、食道扁平上皮癌に対する新たな治療法としてトリフルリジンとCHK1阻害剤の併用治療の有効性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) FTDを、CHK1阻害剤と共に食道がん細胞に併用投与した際の殺細胞効果、DNA障害の程度をin vitroで検討する。

- ・殺細胞効果：WST1 assay
- ・DNA障害の程度：

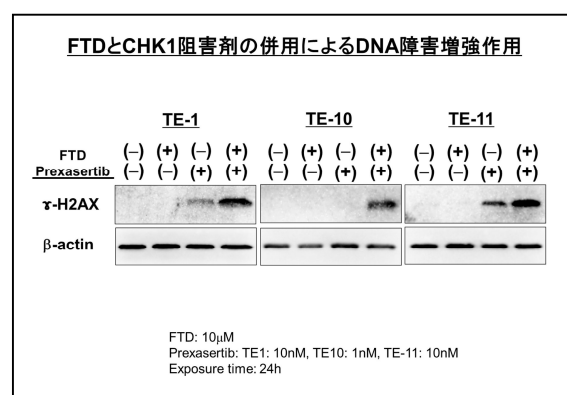
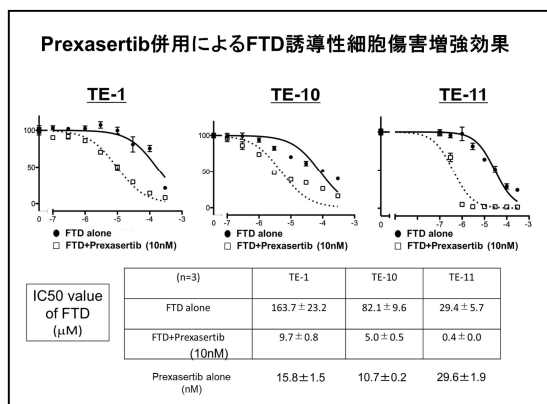
(2) CHK1遺伝子をノックダウンさせた食道がん細胞においてFTDの抗腫瘍効果が増強することを示し、FTDの抗腫瘍効果におけるCHK1の重要性をin vitro (CHK1ノックダウンでFTDのDNA障害作用の増強効果を $\gamma$ -H2AX発現で評価)、in vivo (CHK1ノックダウン細胞のxenograft腫瘍においてFTDの抗腫瘍効果が増強すること) で明らかにする。

(3) 食道がん細胞を免疫不全マウスに皮下移植して作成したxenograft腫瘍、および患者生検サンプルから作成した患者由来異種移植片 (Patient-derived xenograft: PDX) を用いて、FTDとCHK1阻害剤の併用投与による抗腫瘍効果を検証する。

(4) FTD+CHK1阻害剤に放射線照射を併用した際の抗腫瘍効果増強作用をin vitro, in vivoで検証する。

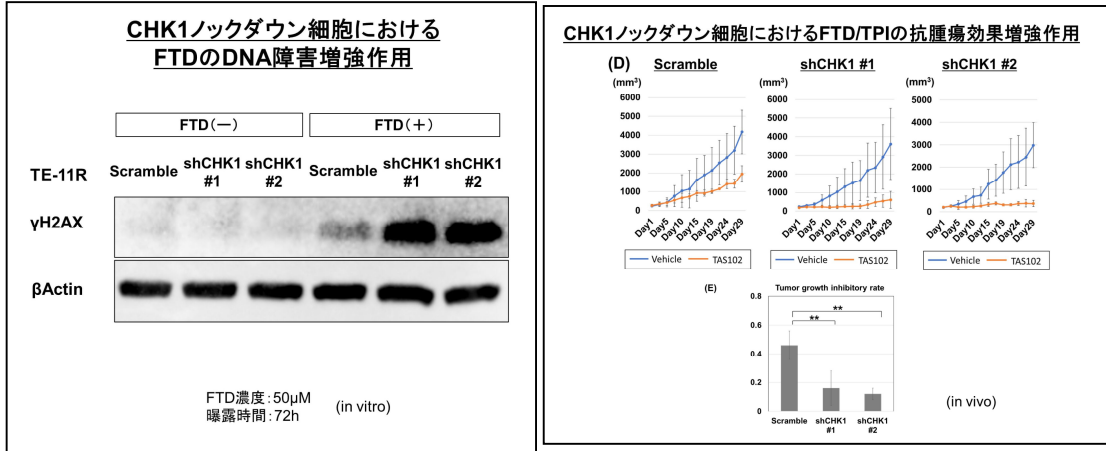
### 4. 研究成果

(1) FTDを、CHK1阻害剤と共に食道がん細胞に併用投与した際の殺細胞効果、DNA障害の程度：



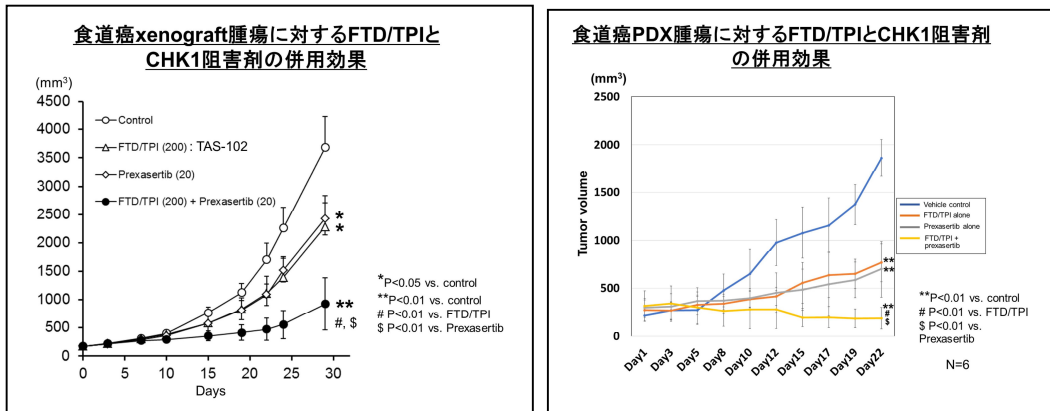
食道がん細胞株 (TE1, TE10, TE11) にFTD単独、またはFTD+CHK1阻害剤 (prexasertib) を投与した際に誘導される殺細胞効果を比較すると、FTD単独よりFTD+CHK1阻害剤を併用投与したほうがすべての細胞株で殺細胞効果が上昇した (左図)。またDNA障害の程度も、FTD+Prexasertib投与群で最も $\gamma$ -H2AXの発現増強が効率よく誘導された (右図)。

(2) CHK1遺伝子をノックダウンさせた食道がん細胞におけるFTDの抗腫瘍効果増強作用についての検討



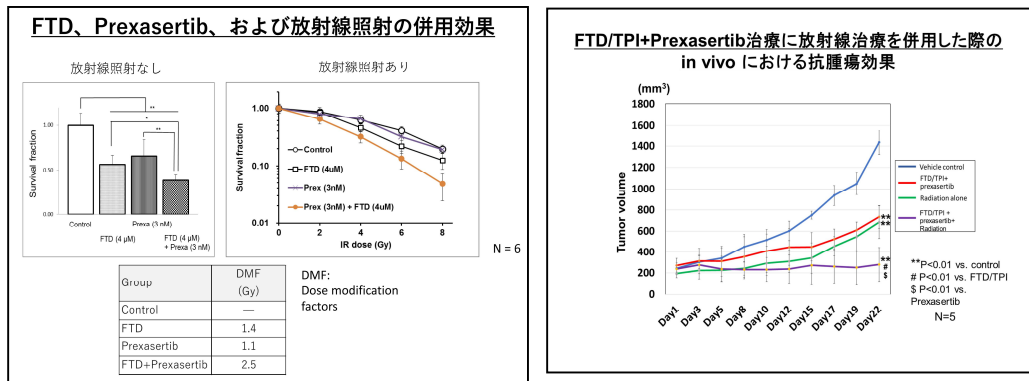
食道扁平上皮癌細胞株 TE11 細胞において CHK1 遺伝子をノックダウンした細胞株、およびそのコントロール細胞(Scramble)にFTDを投与して誘導される DNA 障害の程度を g-H2AX 発現誘導の程度と比較すると、CHK1 ノックダウン細胞はコントロールと比較し、FTD の DNA 障害誘導が増強した(左図)。また、それらの細胞から作成した xenograft 腫瘍に TAS102(FTD)を投与すると、腫瘍増殖抑制作用が増強した(右図)。

(3) 食道がん細胞を免疫不全マウスに皮下移植して作成したxenograft腫瘍、および患者生検サンプルから作成した患者由来異種移植片 (Patient-derived xenograft: PDX) における、FTDとCHK1阻害剤の併用による抗腫瘍効果増強作用の検討。



食道癌細胞株 (TE11R) 由来の xenograft 腫瘍、また食道癌患者由来 xenograft 腫瘍 (PDX) 腫瘍に、TAS102 (FTD/TPI) 単独、CHK1 阻害剤(Prexasertib)単独、TAS102 (FTD/TPI) +CHK1 阻害剤併用、そのコントロール群で腫瘍増殖能を検討すると、TAS102 (FTD/TPI) +CHK1 阻害剤併用群は、それぞれの単独治療群、コントロール群と比較し、有意に腫瘍増殖抑制効果が増強した(左図: 食道癌 Xenograft 腫瘍、右図: 食道癌 PDX 腫瘍)

(4) FTD+CHK1阻害剤に放射線照射を併用した際の抗腫瘍効果増強作用の検証。



FTD+CHK1 阻害剤に放射線照射を併用した際の放射線感受性増強効果を clonogenic assay で兼用すると、FTD+CHK1 阻害剤併用は、有意に放射線感受性増強効果を示した（左図）。また TE11R 細胞から作成した xenograft 腫瘍に TAS102(FTD/TPI)+CHK1 阻害剤投与群、放射線治療単独群、TAS102(FTD/TPI)+CHK1 阻害剤投与 + 放射線治療群、そのコントロール群で腫瘍増殖抑制効果を検討すると、TAS102(FTD/TPI)+CHK1 阻害剤投与 + 放射線治療群は、それぞれの単独治療群、コントロール群と比較し、有意に腫瘍増殖抑制効果が増強した（右図）

以上の結果より、トリフルリジンと CHK1 阻害剤の併用治療は食道扁平上皮癌に対する有効な治療法となる可能性が示唆された。

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<br>Ohashi S, Kikuchi O, Nakai Y, Ida T, Saito T, Kondo Y, Yamamoto Y, Mitani Y, Nguyen TH, Fukuyama K, Tsukihara H, Suzuki N, Muto M | 4. 巻<br>19              |
| 2. 論文標題<br>Synthetic lethality with trifluridine/tipiracil and checkpoint kinase 1 inhibitor for esophageal squamous cell carcinoma         | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Molecular Cancer Therapeutics   | 6. 最初と最後の頁<br>1363-1372 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1158/1535-7163.MCT-19-0918.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔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<br>大橋真也、菊池理、齋藤伴樹、近藤雄紀、三谷洋介、武藤学                               |
| 2. 発表標題<br>トリフルリジン・チピラシルおよびプレキサセルティブ（CHK1阻害剤）併用による食道扁平上皮癌に対する新たな治療戦略 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大橋真也、菊池理、武藤学                                |
| 2. 発表標題<br>Synthetic lethalityによる食道扁平上皮癌に対する新たな治療戦略の確立 |
| 3. 学会等名<br>第18回日本消化管学会総会学術集会                           |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|