

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18158

研究課題名（和文）大腸癌のFTDに対するDNA損傷応答の解明と治療効果増強への展開

研究課題名（英文）Analysis of DNA damage response to FTD in colorectal cancer and its development to enhance therapeutic effect.

研究代表者

廣川 高久（Hirokawa, Takahisa）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：40592499

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：今回G2/Mチェックポイント阻害剤としてAZD6738を用いて実験を行った。大腸癌株において5-FUおよびFTDのいずれにおいてもG2/Mチェックポイントで細胞周期が停止することを確認し、AZD6738で解除されることを確認した。大腸癌のkey drugである5-FUを用いて、AZD6738の治療増強効果を検討した。その結果、培養細胞およびマウス皮下移植モデルのいずれでも抗腫瘍効果の増強作用が認められた。この実験をもとに、FTDでも同様に研究を行った。FTDでも培養細胞およびマウス皮下移植モデルのいずれでも抗腫瘍効果の増強作用が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究は、今までにないDNAダメージ応答に着目した治療増強効果である。また、大腸癌の治療に対して抵抗性を示した後方ラインで使用される薬剤に対して治療増強効果が示された。この成果は実臨床において治療開発のブレイクスルーになるとともに、後方ラインでの治療効果の向上は、進行再発大腸癌の治療成績の改善に大きく影響を与えるものである。多くの人が罹患し、死亡する大腸癌の治療成績の向上は社会的な意義は非常に大きい。

また、今回着目した手法は薬物療法のみならず、放射線治療などDNAダメージを機序とする抗腫瘍療法に応用できるもので学術的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used AZD6738 as a G2/M checkpoint inhibitor. We confirmed that cell cycle arrest was observed at the G2/M checkpoint in both 5-FU and FTD in colorectal cancer lines, and that it was abolished by AZD6738. We investigated the therapeutic enhancement effect of AZD6738 using 5-FU, a key drug for colorectal cancer. The results showed that AZD6738 potentiated the anti-tumor effect in both cultured cells and mouse subcutaneously implanted models. Based on the keynote experiment, we conducted the same study with FTD, which also showed enhancement of anti-tumor effect in both cultured cells and mouse subcutaneously implanted models.

研究分野：DNAダメージ応答

キーワード：DNAダメージ応答 G2/Mチェックポイント阻害剤 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年大腸癌の化学療法は目覚ましく進化している。さらに分子標的薬剤や免疫チェックポイント阻害剤の登場でさらに発展している。一方、治療を継続することで治療抵抗性が生じ、治療変更が必要となる。さらに薬物療法のみでは根治は望めない。この治療抵抗性を克服することが、大腸癌さらなる生命予後の延長につながる。

我々は今までに、細胞周期の G2/M チェックポイントを阻害することで治療増強効果が得られることを解明してきた。現在、実臨床で治療に対して抵抗性を示した状態に使用される後方ラインの薬剤として TAS-102 がある。しかし、十分な腫瘍縮小効果が得られないのが現状である。この TAS-102 の治療効果を増強することが大腸癌治療の成績向上につながる。

TAS-102 は Trifluridine (FTD) と Tipiracil (TPI) の合剤であり、チミンの類似物質である FTD が S 期にチミンに置き換わって取り込まれ DNA 合成を阻害する (図 1)。TAS-102 はこれまでの抗癌剤とは異なり、DNA 合成を直接阻害することから、従来の治療に抵抗する腫瘍への治療効果が期待された。ただ実際には、生存中央値の延長は認められるものの、腫瘍縮小効果は低い。

この TAS-102 の治療効果を増強することが大腸癌治療の成績向上につながる。

2. 研究の目的

多くの抗がん治療は DNA 損傷を与え細胞死へ導くことを機序としている。DNA 損傷に応答しチェックポイントで DNA が修復され細胞は生存する。チェックポイントは、p53 は G1/S 期チェックポイントを Chk1 は G2/M 期チェックポイントを制御する。

癌細胞の多くは p53 に変異があり、G1/S 期チェックポイントが働かず G2/M 期チェックポイントに依存して増殖する。我々は、このような細胞で G2/M 期チェックポイントを解除することで DNA の損傷が蓄積し、細胞死に導くことができることを見出した。p53 変異細胞特異的に作用するこの治療増強法は、p53 正常細胞には作用せず、正常細胞への副作用も少なくできる方法と考えている。

FTD による DNA 損傷応答を解明し、抗腫瘍効果を増強させる方法を開発することで腫瘍縮小させ、さらには大腸癌患者の延命につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

今回 G2/M チェックポイント阻害剤として AZD6738 を用いることとした。AZD6738 は ATR 阻害剤の作用があり、G2/M チェックポイントを阻害する。また、すでに治験段階ではあるが臨床で使用されている薬剤であり、本研究結果を臨床応用に繋げられるものと考えている。

AZD6783 の作用を確認するため、大腸癌培養細胞に大腸癌治療の key drug である 5-FU を添加し、細胞周期が G2/M チェックポイントで止まること及び AZD6783 で解除されることをフローサイトメトリーで確認する。

と同様、FTD を添加し、FTD による G2/M チェックポイントが作動することをフローサイトメトリーで確認する。さらに、AZD6738 を追加することで、チェックポイントが解除されることを確認する。

FTD 添加による殺細胞作用を WST1 アッセイで測定する。さらに AZD6738 を追加することで殺細胞作用が増強することを確認する。

ヌードマウスに大腸癌株を皮下移植し、FTD および FTD+AZD6738 による抗腫瘍効果を生体で確認する。

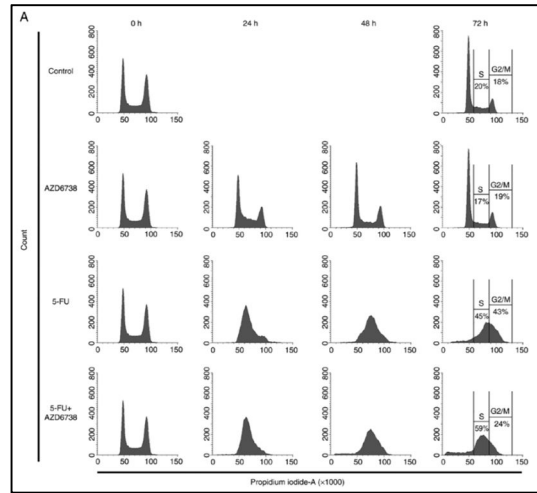
4. 研究成果

大腸癌株を用いた実験で、FTD に対する AZD6738 の治療増強作用を確認することができた。さらに皮下移植マウスモデルでも FTD の抗腫瘍効果に対する治療増強効果が確認され、本研究の目的は達成された。下記に結果の概要を示す。

AZD6738 の作用

右図に示す通り 5-FU 添加細胞では DNA の 2 倍体の細胞数が増加しており、G2/M チェックポイントが作用していることが確認できた。またさらに AZD6738 を併用することで 1 倍体の割合が増加し、G2/M チェックポイントが解除されていることが確認できた。

この結果から、G2/M チェックポイント阻害剤として AZD6738 を用いることは、本研究の目的を十分満たす薬剤であると判断された。



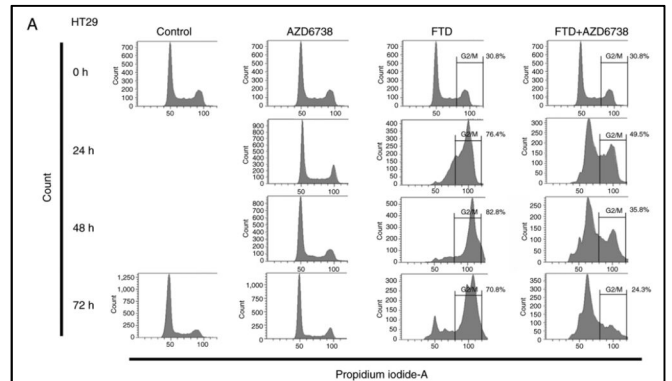
参考文献

Suzuki T, Hirokawa T et al. ATR inhibitor AZD6738 increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5 fluorouracil by inhibiting repair of DNA damage. ONCOLOGY REPORTS 47: 78, 2022

FTD の細胞周期に与える影響と AZD6738 の効果

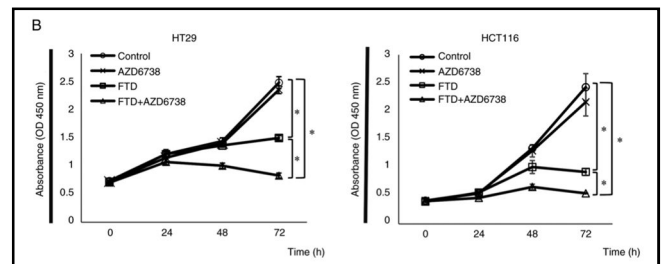
FTD でも 5-FU 同様に G2/M チェックポイントが作用することが確認された。さらに、AZD6738 を併用することでチェックポイントが阻害されている。

FTD による細胞周期への影響並びに AZD6738 の作用は 5-FU の結果と比較すると、期待した結果がさらに強く出ていることが確認される



FTD の殺細胞作用に対する AZD6738 の増強作用

WST-1 assay を用いて FTD 及び FTD+AZD6738 の細胞生存率を検討した。2 種類の大腸癌細胞株においていずれも、AZD6738 を併用することで有意に細胞の生存率が低下しており、FTD の治療効果が増強されていることが示された。



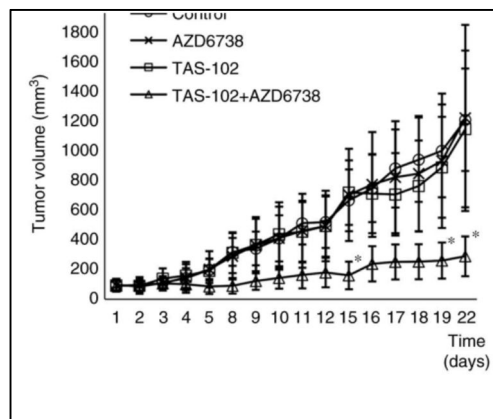
アポトーシスのマーカーが上昇していることから AZD6738 を併用することでよりアポトーシスへ誘導されていることが確認された。機序としてチェックポイントが解除されたことにより DNA ダメージが蓄積し、生存することが困難となりアポトーシスへ誘導されたと示唆された。



生体における AZD673 の抗腫瘍効果増強作用

マウス皮下移植モデルに対して FTD 及び FTD+AZD6738 を投与し、腫瘍サイズを計測して抗腫瘍効果を検討した。

右のグラフにあるよう、AZD6738 を併用した際のみ強い抗腫瘍効果が認められた。実臨床でも TAS-102 の腫瘍縮小効果は乏しく、今回の結果は実臨床の状況を一致するものである。



以上の結果から、大腸癌に対して後方ラインで使用される TAS-102 の抗腫瘍効果を G2/M チェックポイントを阻害する AZD6738 が増強させることがしめされた。AZD6738 は現在臨床試験において実際に臨床で使用されている薬剤である。この結果は、大腸癌の後方ラインの治療増強につながるものであり、大腸癌の治療成績向上に大きく貢献するものと考えられる。

当内容をまとめたものを下記論文で発表した。

Harata S, Suzuki T, Hirokawa T et al. AZD6738 promotes the tumor suppressive effects of trifluridine in colorectal cancer cells. ONCOLOGY REPORTS 49: 52, 2023

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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Takuya, Hirokawa Takahisa, Maeda Anri, Harata Shinnosuke, Watanabe Kaori, Yanagita Takeshi, Ushigome Hajime, Nakai Nozomi, Maeda Yuzo, Shiga Kazuyoshi, Ogawa Ryo, Mitsui Akira, Kimura Masahiro, Matsuo Yoichi, Takahashi Hiroki, Takiguchi Shuji	4. 巻 47
2. 論文標題 ATR inhibitor AZD6738 increases the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by inhibiting repair of DNA damage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8289	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 -

1. 著者名 Harata Shinnosuke, Suzuki Takuya, Takahashi Hiroki, Hirokawa Takahisa, Kato Akira, Watanabe Kaori, Yanagita Takeshi, Ushigome Hajime, Shiga Kazuyoshi, Ogawa Ryo, Mitsui Akira, Kimura Masahiro, Matsuo Yoichi, Takiguchi Shuji	4. 巻 49
2. 論文標題 AZD6738 promotes the tumor suppressive effects of trifluridine in colorectal cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2023.8489	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0件

〔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
---------	---------