

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23917

研究課題名(和文)大腸癌におけるPTENの発現とtopoI阻害剤耐性機序の解明

研究課題名(英文)A research of Camptothecin resistance determined by regulation of topoisomerase I degradation mediated by PTEN in colon cancer

研究代表者

財津 瑛子(ZAITSU, Yoko)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50843497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス由来のC2細胞を用いPTENの低発現によりtopoIの分解が亢進していることを確認した。さらに蛍光免疫染色にてDNA-PKcsが増加し、topoIの分解産物も増加していることからPTENを介したtopoIの分解を強く示唆された。ヒトの大腸癌細胞株における検討でも同様にtopoIの分解産物が多い細胞株はtopoI阻害薬に耐性を示すことが分かった。臨床検体における免疫組織化学染色においてイリノテカンを投与された、大腸癌臨床検体をtopoIのリン酸化タンパク(topoI-pS10陽性)で染色し、リン酸化タンパクが陰性の症例ではイリノテカンの含むレジメンの投与コース数が多いことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トポイソメラーゼ阻害薬に分類されるイリノテカンは切除不能な進行再発大腸癌の長期コントロールや局所進行直腸癌の縮小を狙った術前治療など大腸・直腸癌においては重要な役割を果たす。本研究によりトポイソメラーゼ阻害薬の耐性メカニズムの一因によく知られている、がん抑制遺伝子PTENが関与していることが分かった。また臨床検体を用いた免疫染色において、トポイソメラーゼの分解産物の発現とイリノテカンの耐性に関与がある可能性が示唆された。将来的に抗癌剤の治療効果を推測するバイオマーカーの開発や耐性を回避する新規の薬剤の開発のきっかけになる点で学術的、社会的意義があると考えられる。

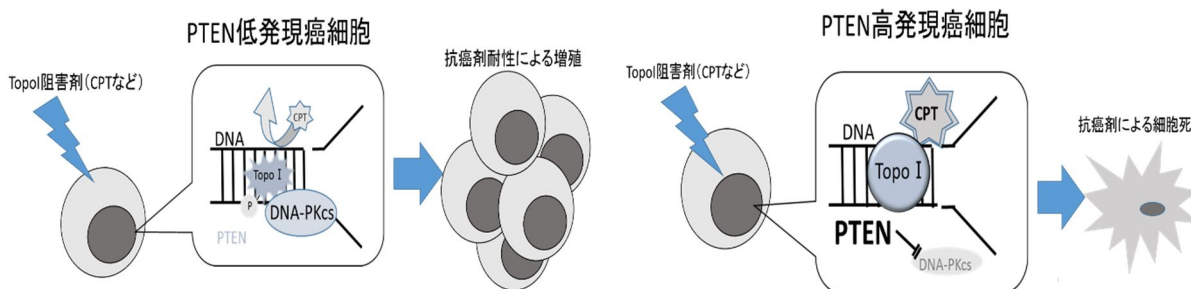
研究成果の概要(英文)：Using C2 cells, our group confirmed that PTEN regulates topoisomerase I (topoI) degradation through DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) activity. Low expression of PTEN leads to higher DNA-PKcs activity causing higher phosphorylates topoI on serine 10 (topoI-pS10) level. This leads to rapid topoI degradation and cause CPT resistance. This phenomenon was also seen in human colon cancer cell lines such as HCT15. Among the patients that show high topoI-pS10 protein expression by IHC in colon cancer specimen, the tumor show progression in a relatively low dosage of CPT comparing to patients with low topoI-pS10 protein expression. We assume that this finding can lead to a new biomarker to estimate the resistance of CPT and also can be applied to developing a new agent that will reduce CPT resistance.

研究分野：医学

キーワード：Colon cancer Chemoresistance PTEN Topoisomerase

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤であるイリノテカン (irinotecan) は topoisomerase I (topo I) 阻害薬に分類され、多くの癌で使われるが topo I が分解される状況では効果が落ちる。特定の大腸癌細胞株においてがん抑制遺伝子である Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) が DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) を介し、topo I の分解を抑制し topo I 阻害薬の感受性を高める事が知られている。しかし他の癌細胞株や臨床検体における PTEN と topo I 阻害剤耐性の関係性は十分に検討されていない。



2. 研究の目的

PTEN の低発現が topo I 阻害剤耐性をもたらすかを複数の大腸癌細胞株および大腸癌臨床検体を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

癌細胞株において PTEN の発現量と topo I 阻害薬の感受性の違いの検討

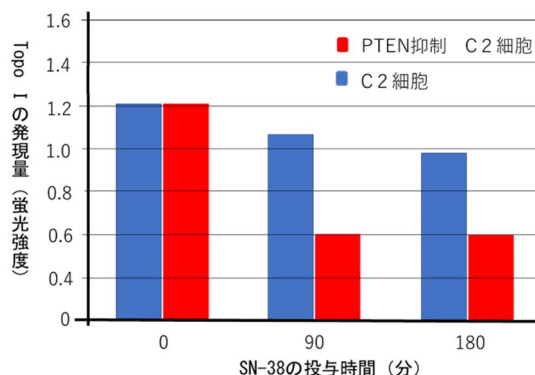
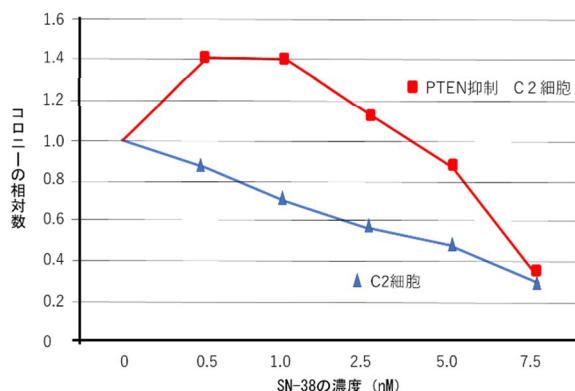
PTEN の発現が低い癌細胞株にイリノテカンの最終代謝産物 SN-38 を投与し、免疫沈降法によって分解された topo I タンパクの有無を調べる。コントロールとして SN-38 耐性株・感受性株に同様の実験を行い、PTEN の低発現により topo I の分解が促進されているかを検討した。次に同じ細胞株に PTEN を過剰発現させた場合に topo I 感受性に変化があるかを検討した。

臨床検体での免疫組織化学染色により検討

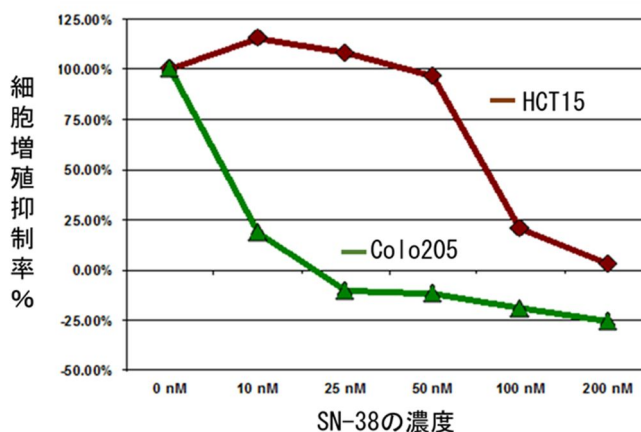
大腸癌臨床検体を用い、PTEN および topo I のリン酸化タンパクの発現量を免疫組織化学染色法により検討した。またその検体の臨床データを収集し、臨床上イリノテカンの投与コース数の違いがあるかも検討した。

4. 研究成果

PTEN の発現と topo I 分解についての検討; マウス由来の C2 細胞を用い PTEN を Knock out し、ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色にて topo I のタンパク量を評価した。PTEN の低発現により topo I の分解が亢進していることを確認した。さらに蛍光免疫染色にて DNA-PKcs が増加し、topo I の分解産物も増加していることから PTEN を介した topo I の分解を強く示唆された。さらにこの細胞に topo I 阻害剤を投与したところコントロールより耐性が生じていた。

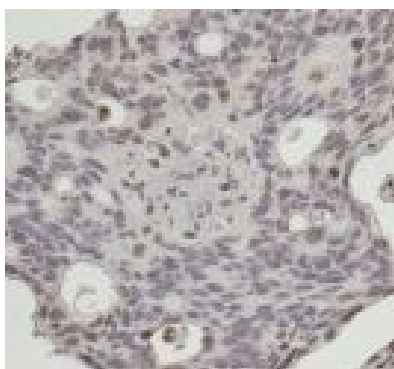


ヒト大腸癌細胞株での検討；ヒト大腸癌細胞株である HCT15 と Colo205 に topol 阻害薬を投与したところウェスタンブロットにて HCT-15 はより耐性を示すことを確認した。免疫染色にて耐性を示した HCT-15 では topol の分解産物が Colo205 と比較し多いことを確認した。

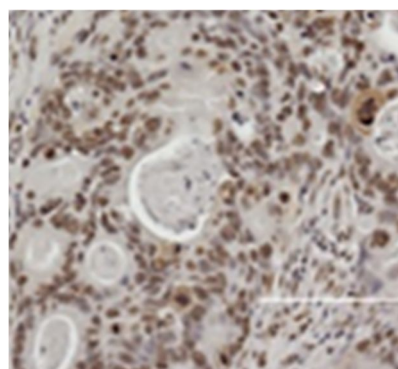


③臨床検体での検討；イリノテカンを投与された、大腸癌臨床検体を topol のリン酸化タンパク (topol-pS10 陽性) で染色し、リン酸化タンパクが陰性の症例ではイリノテカンの含むレジメンの投与コース数が多いことを確認した。

< topol-pS10 陰性例 (topol 分解なし) >



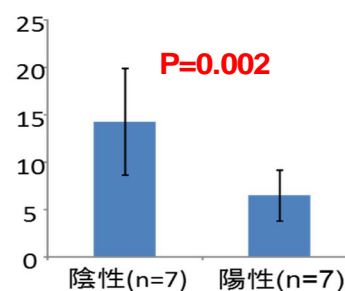
< topol-pS10 陽性例 (topol 分解あり) >



< topol-pS10 発現とイリノテカンの効果 >

	陰性(n=8)	陽性(n=9)
PR	1 (12.5)	0
SD	7 (87.5)	7 (81.8)
PD	0	2 (18.2)

< SD 症例のイリノテカンレジメンコース数 >



今後の展望；イリノテカンを使用する患者において topol-pS10 の発現がある患者ではイリノテカン耐性を示す可能性が示唆された。臨床検体を用いた免疫染色にてその発現の程度は評価できることからイリノテカンの感受性バイオマーカーになる可能性が示唆された。topol の分解を阻害する方法として UPP 経路の抑制や BRCA1/BARD1 によりユビキチン化の抑制、DNA-PK の阻害が考えられ今回の研究成果より耐性克服のための阻害剤の研究にも発展できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	安藤 幸滋 (Ando Koji) (20608864)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

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