

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22300343

研究課題名(和文)ポリADP-リボシル化を分子標的とするがん治療薬の研究

研究課題名(英文)Research for poly(ADP-ribosylation) as a potential cancer therapeutic target

研究代表者

益谷 美都子(MASUTANI, MITSUKO)

独立行政法人国立がん研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60238904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳後修飾の一つであるポリADP-リボシル化はpoly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1、PARP-2、PARP-3等により触媒され、DNA修復応答やクロマチン制御、細胞死誘導に関与する。乳がん等の治療で使用され始めたPARP阻害剤の効果を規定する因子を解析し、PARP阻害剤のエピジェネティック制御の作用点について解析した。またpoly(ADP-ribose)の主要な分解酵素であり、DNA修復応答に関わるpoly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG)を分子標的とする新規抗がん剤増強剤及び抗がん剤としての基礎的検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Poly(ADP-ribosylation) reaction is catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase, PARP-1, PARP-2, PARP-3 and other PARP family proteins and is involved in DNA repair response, chromatin regulation, and cell death. We analyzed the sensitivity restricting genes for PARP inhibitors and their mechanisms. We also analyzed the effects of PARP inhibitors on epigenome regulation. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) is a major enzyme for poly(ADP-ribose) degradation and participates in DNA damage response. We studied the possibility of PARG inhibitors as a cancer therapeutic agent using biochemical strategies.

研究分野：薬学、生化学、腫瘍学、分子生物学

キーワード：PARP PARG NAD gamma-irradiation cancer

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾のポリ ADP-リボシル化を行うポリ (ADP-リボ-ス) 合成酵素-1 (PARP-1) が DNA 修復に機能し、その阻害剤ががん細胞株において DNA を標的とする抗がん剤の致死効果を増強したことから抗がん剤の増強剤としての開発が行われてきた。英国で特異性が高く、強力な PARP 阻害剤が開発され、また相同組み換え修復に機能するがん抑制遺伝子 *BRCA 1* 及び *BRCA2* に変異がある場合、PARP 阻害剤のみでがん細胞に致死効果を示すことが英国で報告された (Bryant et al., Nature, 2005, Farmer, et al., Nature 2005)。この効果は 2 遺伝子欠損の組み合わせにより致死作用が出るという「合成致死 (synthetic lethality)」の概念に当てはまる。現在、国内外で乳がんをはじめとして PARP 阻害剤の第 2-3 相の臨床試験が進みつつある (Fong et al., N Engl J Med, 2009)。また PARP 阻害剤は *BRCA* 以外の相同組み換えに関わる遺伝子が機能しないがん細胞に対しても単独で致死作用を示す。しかし、抗がん剤の増強剤として用いられる場合、あるいは単独で抗がん剤として用いられる場合も、PARP 阻害剤が有効に作用しない場合が頻繁に認められる。従って PARP 阻害剤の効果を規定する因子を同定する必要がある。また、*BRCA* 遺伝子変異以外に PARP 阻害と合成致死作用を示す遺伝子としては *PTEN* 及びある種の protein kinase が報告されているのみである (Turner, EMBO J, 2008)。

ポリ (ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ (PARG) はポリ (ADP-リボース) の主な分解酵素である。申請者らが作成した *Parg* 欠損 ES 細胞はアルキル化剤、シスプラチン及びガンマ線照射に対して致死感受性の亢進を示し、PARG の阻害剤は抗がん剤の増強剤になると考えられているが、抗がん剤増強剤及び抗がん剤としての研究は進んでいない。

2. 研究の目的

(1) PARP 阻害剤の効果規定因子の探索と新規阻害法の開発

乳がん等の治療で使用され始めた PARP 阻害剤の効果を規定する因子を synthetic lethality 法などの手法から同定し検証する。PARP 阻害剤のエピジェネティック制御の作用点についても解析する。

(2) PARG を分子標的とする新規抗がん剤増強

剤及び抗がん剤としての基礎的検討

がんの放射線及び化学治療の増強剤としての PARG 阻害剤を検討し、作用機序を明らかにする。Synthetic lethality 法などで PARG 阻害の感受性増強因子の同定を行い、PARG 阻害剤の単独での抗がん剤効果を検討する。PARG 阻害剤候補の阻害評価系樹立に必要な検討を行う。

3. 研究の方法

(1) PARP 阻害剤の効果規定因子の探索と新規阻害法の開発

文献情報、synthetic lethality screening 法などによる PARP 阻害剤の効果規定因子候補の同定を行う。また、PARP のエピジェネティック制御における機能と PARP 阻害剤のエピジェネティック制御を作用点とする解析を行う。

(2) PARG を分子標的とする新規抗がん剤増強剤及び抗がん剤としての検討

放射線照射、重粒子線照射における PARG 阻害による致死増強効果の検討、Synthetic lethality screening 法などによる PARG 阻害の感受性増強因子の検索系の検討、PARG のクロマチン制御における機能解析、PARG 阻害剤の新規開発のための阻害評価系樹立に必要な検討を行う。

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針を遵守して行う。組換え DNA 実験については各実施機関の規程を遵守する。

4. 研究成果

(1) PARP 阻害剤の効果規定因子の探索と新規阻害法の開発

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) 阻害剤は *BRCA* 以外の相同組み換えに関わる遺伝子が機能しないがん細胞に対しても単独で致死作用を示す。しかし、抗がん剤の増強剤として用いられる場合、あるいは単独で抗がん剤として用いられる場合も、PARP 阻害剤が有効に作用しない場合が頻繁に認められる。本研究では PARP 阻害剤の作用機構を明らかにし、効果を規定する因子を同定することを目的として研究を進めた。

本研究において PARP 阻害剤が細胞増殖シグナル系を阻害することを見出し、PARP により産生する特異的代謝物のマウスにおけるマー

カーとしての検討も進めた。PARP阻害剤の効果規定因子についてsiRNAによる個別遺伝子機能阻害による検討を行った。PARP阻害剤はBRCA変異を有する場合、cytotoxic作用を示した。一方、PARP阻害剤によるcytostatic作用が顕著ながん細胞株も認められた。Cytotoxic作用はDNA修復阻害による致死的DNA損傷によると考えられるが、cytostatic作用はDNA修復以外のエピジェネティック制御などを作用点とする可能性が考えられ、この点を検討した。

PARP阻害剤は5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)による細胞毒性を数種のがん細胞株において増強した。5-aza-dC と併用することでPARP阻害剤はエピジェネティック変化を誘導し、広範な遺伝子発現変化を誘導することことを認めた。PARP阻害剤AZD2281のクロマチン制御への作用機序を検討した。DNMT3を高発現するヒト肺がん細胞株A549ではPARP阻害剤処理後、DNMT3bの発現低下とともにサイレンシングされていた癌抑制遺伝子の発現がpromoterの脱メチル化とともに回復し、細胞増殖が抑制された。これらのことからPARP阻害剤がDNMT3の発現低下を作用点とするエピジェネティック制がん剤として機能する可能性が示唆された。

さらにPARP阻害剤の効果を規定する因子候補を文献情報の収集やsynthetic lethality法などの手法から同定し検証した。PARP阻害剤の効果規定因子についてshRNAを用いた遺伝子機能阻害による検討のためのがん細胞株へtransfection条件などの検討を行った。スクリーニング系について文献情報などをもとに検討し、レンチウイルスをベクターとして選定し、shRNAをヒトがん細胞株に導入する予備実験とスクリーニングに用いるPARP阻害剤の選択と濃度の条件を比較検討した。PARP阻害剤としては臨床試験に用いられている薬剤を候補として検討した。ヒトがん細胞株をPARP阻害剤で処理し、shRNA transfectionからDNAの調製、効果規定因子候補の同定の過程を進めた。PARP阻害剤としては現在治験で検討されているAZD2281及びABT888の2種類を使用し、negative selectionを行った。機能分類をしたところ、クロマチン制御因子、分化、細胞増殖などに関連する因子が標的候補として抽出された。また、相同組換え修復系に関わるCtIP、非同末端結合修復系に関わる53BP1及びRIF1のsiRNA

による合成致死性を調べた。合成致死性はコロニー形成法やMTT assayを用いて検討した。CtIP siRNAは2種のPARP阻害剤AZD2281及びABT888に対して合成致死性を示したが、53BP1及びRIF1のsiRNAは合成致死性を示さなかった。CtIP siRNAのPARP阻害剤の合成致死性はAZD2281の方が、顕著であった。以上のように、PARP阻害剤は非同末端結合修復経路因子に対して合成致死性を示さなかった。相同組換え修復に関わるCtIPのsiRNAとの合成致死性にはPARP阻害剤によるPARP-1のDNA切断端への固定能が関与することが考えられる。DNA切断修復応答において、CtIPによりPARP-1の機能が制御される可能性が示唆された。

(2) PARG を分子標的とする新規抗がん剤増強剤及び抗がん剤としての基礎的検討

がん治療における単独での抗がん剤及び放射線及び化学療法の増強剤としての可能性を検討し、作用機序を明らかにすることを第目的とし、PARGのDNA損傷応答における機能解析を行った。PARGの機能阻害はマウスES細胞において、低LET(線エネルギー付与)放射線のガンマ線及び高LET放射線の炭素線の致死増強作用を示した。PARG阻害剤が低～高LET放射線の増感剤として有効である可能性が示唆された。

また、がんの放射線及び化学療法の増強剤としてのPARP阻害剤とPARG機能阻害の影響を比較検討し、作用機序を明らかにする研究を進めた。PARP阻害剤とPARG機能阻害ともにガンマ線照射後、mitotic catastropheを介して細胞死の誘導が亢進することが示唆された。さらにがんの放射線及び化学療法の増強剤となるPARG阻害剤の作用機序をDNA損傷応答及び細胞死誘導について細胞株及びマウスモデルを用いて検討した。PARG機能阻害により、ガンマ線や炭素線という低～高LETの放射線の致死作用が増感される機構として、二本鎖DNA切断修復の遅延を介することを示した。

HeLa細胞を用いてテトラサイクリン依存的にPARGをノックダウンできる誘導型PARG機能阻害細胞を樹立した。PARGレベルは低下しPARGのノックダウン誘導により、細胞増殖が約70%に抑制された。G1期の減少が認められ同時にS期の増加傾向を認めた。細胞増殖・細胞死経路に関わるタンパク質リン酸化レベルがわずかに亢進していたが、細胞老

化には影響を与えなかった。HeLa 細胞に対しては PARG のノックダウンはアルキル化剤とガンマ線照射に対して増感効果を示さなかった。これはヒト膀胱癌 MIA PaCa2 細胞株で見られたアルキル化剤や 線照射に対する増感と対照的である。PARG 機能阻害下での効果規定因子の検討に本細胞株は有用と考え、shRNA ライブラリーを用いて検討を進めた。

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 11 件)

- (1) Islam R, Koizumi F, Kodera Y, Inoue K, Okawara T, Masutani M.
Bioorg Med Chem Lett. 2014 Aug 15;24(16):3802-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.06.065. (査読あり)
- (2) Roper SJ, Chrysanthou S, Senner CE, Sienerth A, Guan S, Murray A, Masutani M, Latos P, Hemberger M.
ADP-ribosyltransferases Parp1 and Parp7 safeguard pluripotency of ES cells. Nucleic Acids Res. 42 (14):8914-27, 2014. doi: 10.1093/nar/gku591. (査読あり)
- (3) Masutani M, Fujimori H.
Poly(ADP-ribosylation) in carcinogenesis. Molecular Aspects of Medicine, 2013, 34(6):1202-16. doi:10.1016/j.mam.2013.05.003. (査読あり)
- (4) Shirai H, Fujimori H, Gunji A, Maeda D, Hirai T, Poetsch AR, Harada H, Yoshida T, Sasai K, Okayasu R, Masutani M. *Parg* deficiency confers radio-sensitization through Enhanced cell death in mouse ES cells exposed to various forms of ionizing radiation. Biochem Biophys Res Commun, 435(1):100-6, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.048. (査読あり)
- (5) 平井崇久、笹井啓資、益谷 美都子 PARP 阻害剤：がん治療における合成致死と増感剤としての役割 放射線生物研究 Radiation Biology Research Communications 48(1), 52-65, 2013 Review (査読あり)
- (6) Osada T, Rydén AM, Masutani M.
Poly(ADP-ribosylation) regulates chromatin organization through histone H3

- modification and DNA methylation of the first cell cycle of mouse embryos. Biochem Biophys Res Commun. 2013, 434:15-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.074. (査読あり)
- (7) Hirai T, Shirai H, Fujimori H, Okayasu R, Sasai K, Masutani M.
Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high linear-energy-transfer radiation. Cancer Sci, 103(6):1045-50, 2012. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02268.x. (査読あり)
 - (8) Osada T., Ogino H., Hino T., Ichinose S., Nakamura K., Omori A., Noce T., Masutani M. PolyADP-Ribosylation is required for pronuclear fusion during postfertilization in mice. PLoS ONE, 5: e12526, 2010. doi:10.1371/journal.pone.0012526. (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

- (1) 益谷美都子、藤森浩彰、原田博美、光畑元晴、高村 岳樹 創薬の基盤としての ADP-リボシル化の生化学、第 87 回日本生化学会大会シンポジウム 2014 年 10 月 15 日 京都市
- (2) 藤森浩彰、向井大晃、平井崇久、原田博美、工藤祐子、村上康文、渡邊昌俊、益谷美都子 PARP-1 は、*Dnmt3* promoter の制御因子として機能する、第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日 京都市
- (3) Junhui Wang, Akira Motegi, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, Mitsuko Masutani PARP-1 and PARG are both required for the regulation of 53BP1 after IR. 第 73 回日本癌学会学術総会 横浜市 2014 年 9 月 25-27 日
- (4) Mitsuko Masutani, Takahisa Hirai, Hiroaki Fujimori, Souichiro Saito, Teiji Nishio, Ryuichi Okayasu, Akira Fujimori, Keisuke Sasai. Biological radiosensitization by PARP inhibitors. 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3-5 日 横浜市 (招待講演)
- (5) Junhui Wang, Akira Motegi, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, Mitsuko Masutani PARP-1 suppresses the end-resection of 5' - and 3' -blocked termini of

double-strand DNA breaks by CtIP. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3-5日横浜市

(6)Hiromi Harada, Miyuki Hozumi, Hiroaki Fujimori, Takahisa Hirai, Soichiro Saito, Yasufumi Murakami, Mitsuko Masutani Poly(ADP-ribose) formation/metabolism after DNA damage. 第86回日本生化学会大会 2013年9月11-13日横浜市

(7)藤森浩彰、向井大晃、村上康文、益谷美都子、PARP機能阻害は、マウスES細胞ゲノムの一部でDNA低メチル化を誘導する、第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日福岡市

(8) Hidenori Shirai, Takahisa Hirai, Keisuke Sasai Ryuichi Okayasu, Mitsuko Masutani Radio-sensitization by Parg deficiency in mouse ES cells exposed to low and high LET radiation. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月21日札幌市

(9)白井秀徳、藤森浩彰、岡島泰久、益谷美都子 PARP機能阻害によるがん細胞株におけるアルキル化剤に対する致死感受性亢進、第16回日本がん分子標的治療学会学術集会、2012年6月28日北九州市

(10)Takahisa Hirai, Mitsuko Masutani et al. Radiosensitization effect of PARP inhibitor in cells exposed to low and high LET radiation. 2011年10月2-6日Miami, Florida, USA

(11)益谷美都子 PARPの機能と抗がん剤としてのPARP阻害剤の作用機序遺伝医学合同学術集会シンポジウム2011年6月17日京都市 (招待講演)

(12)益谷美都子 他3名 PARP阻害剤の抗がん剤としての作用機構第15回学術集会日本がん分子標的治療学会学術集会 2011年6月24日東京 (招待講演)

[図書](計2件)

(1)Wang J, Sato A, Fujimori H, Miki Y, Masutani M. Book chapter: PARP and carcinogenesis. *In* PARP inhibitors for Cancer Therapy. Series title: Cancer Drug Discovery and Development Springer, New York. In press(査読あり)

(2)Masutani M, Shirai H, Ogino H, Poetsch A, Sasamoto E, Maeda D, Hashimoto A, Sugimura T. Role of poly-ADP-ribosylation

in the maintenance of genomic stability. *In*: Nishimura S, Loeb LA, Masutani M, Nakagama H, Sekiya T, eds. Extended Abstract for The 40th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund: DNA Repair and Human Cancers, 2009. Tokyo, Japan: Princess Takamatsu Cancer Research Fund, pp 76-79, 2010. (査読あり)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 益谷美都子 (MITSUKO MASUTANI) 国立がん研究センター研究所・創薬臨床研究分野・客員研究員
研究者番号：60238904

(2) 連携研究者 岡安隆一 (RYUICHI OKAYASU) 放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・Senior Researcher
研究者番号：50356135
連携研究者 藤森浩彰 (FUJIMORI HIROAKI) 国立がん研究センター研究所・創薬臨床研究分野・研究員
研究者番号：00590043