

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460390

研究課題名(和文) 癌における染色体維持因子FANCD1発現の意義と新規分子標的癌治療戦略への展開

研究課題名(英文) Novel molecular targeting strategy against chromosomal maintenance factor FANCD1

研究代表者

北尾 洋之 (KITA0, HIROYUKI)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30368617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：染色体は正確に複製されかつ分配されるメカニズムのおかげで、普段はその安定性を守っている。がんにおいては、そのメカニズムに異常を来し、染色体が不安定となる。申請者は、染色体安定性を守るために機能する因子の1つFANCD1が通常より多く発現している大腸癌において、5-FUを含むがん化学療法の治療効果が少ないことを見出していた(Nakanishi et al. Ann Surg Oncol 2012)。本研究では、FANCD1の発現と5-FU感受性との関係とそのメカニズムを実験的に追求し、FANCD1とそのパートナーとの相互作用が重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal stability is ensured by the accurate DNA replication and the equal segregation of duplicated chromosomes. In tumors, such mechanism is often disrupted and chromosomal instability, which is represented as high mutation frequency and abnormal number of chromosomes, emerges. In our previous study, we reported that the colorectal cancer patients who exhibited higher expression of chromosomal stability factor FANCD1 in their tumors tended to be poor prognosis and less effective with 5-FU-based chemotherapy (Nakanishi et al. Ann Surg Oncol 2012). In this project, we drugged the underlying molecular mechanism of the association between FANCD1 expression and 5-FU resistance experimentally and found that the physical interaction between FANCD1 and key partners are critical.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体不安定性 抗がん剤 FANCD1

1. 研究開始当初の背景

染色体不安定性は発癌や癌の進展の要因であるが、DNA 損傷応答や修復機構の異常が原因であることが多い。染色体不安定性症候群ファンコニ貧血の原因遺伝子の1つ FANCD1 (BACH1/BRIP1 ともいう) は、その欠損により特徴的な染色体不安定性を引き起こされることや BRCA1, MLH1, BLM, TopBP1 などの重要な癌抑制遺伝子と直接会合し様々な機能を発揮することが報告されている (Cantor SB et al. *Cell* 105: 149-160. 2001; Peng et al *EMBO J.* 26:3238-49. 2007; Suhasini AN et al. *EMBO J.* 30:692-705. 2011; Gong Z et al. *Mol Cell* 37: 438-46. 2010, 図 1) このことから、染色体不安定性に伴う発癌や癌の進展において、FANCD1 の機能異常が深く関与する可能性があることが予想された。申請者は大腸癌症例において、FANCD1 発現亢進を認める症例があること、またその症例では 5-FU を含む術後化学療法の治療成績が不良であることを報告してきた (Nakanishi et al. *Ann Surg Oncol.* 19:3627-35. 2012, 図 2) このように、染色体維持因子である FANCD1 の過剰発現が発癌過程、あるいはその後に行う抗がん剤治療の効果を影響を及ぼす可能性が示唆されていた。FANCD1 そのものあるいは FANCD1 過剰発現に付随して活性化する分子を標的とした分子標的治療の可能性を追求するにあたり、その分子レベルでのエビデンスが求められていた。

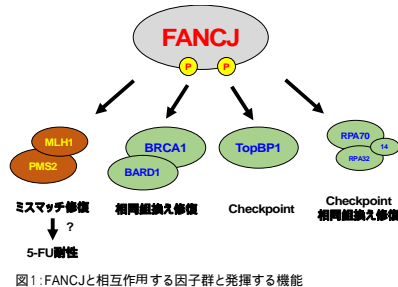
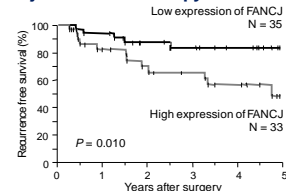


図 1: FANCD1 と相互作用する因子群と発揮する機能

2010, 図 1) このことから、染色体不安定性に伴う発癌や癌の進展において、FANCD1 の機能異常が深く関与する可能性があることが予想された。申請者は大腸癌症例において、FANCD1 発現亢進を認める症例があること、またその症例では 5-FU を含む術後化学療法の治療成績が不良であることを報告してきた (Nakanishi et al. *Ann Surg Oncol.* 19:3627-35. 2012, 図 2) このように、染色体維持因子である FANCD1 の過剰発現が発癌過程、あるいはその後に行う抗がん剤治療の効果を影響を及ぼす可能性が示唆されていた。

FANCD1 そのものあるいは FANCD1 過剰発現に付随して活性化する分子を標的とした分子標的治療の可能性を追求するにあたり、その分子レベルでのエビデンスが求められていた。

Stage II/III-with 5-FU-based adjuvant chemotherapy



Stage II/III-without adjuvant chemotherapy

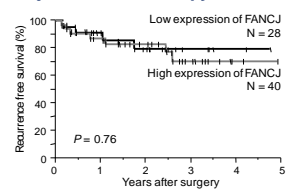


図 2. FANCD1 発現と 5-FU を含む術後化学療法の治療効果との関連

2. 研究の目的

癌における FANCD1 発現の生物学的意義を明らかにし、FANCD1 を標的とした癌治療戦略の正当性・妥当性について検討すること。

3. 研究の方法

ニワトリ DT40 細胞株を用いた遺伝学的手法により、染色体不安定性症候群ファンコニ貧血原因遺伝子 FANCD1 の破壊株を樹立

し、抗癌剤シスプラチンや 5-FU 関連代謝物に対する細胞応答や感受性について解析した。ヒトがん細胞株を用いて、遺伝子発現を変動させることによる 5-FU 関連代謝物に対する細胞応答に及ぼす影響を検証した。また同じく、ヒトがん細胞株を用いて、トリフルリジン (FTD) 応答についても検討した。

4. 研究成果

FANCD1 破壊株は、シスプラチンに対して非常に高い感受性を示すが、5-FU 代謝物 FdUrd に対してもわずかに感受性を示した。この FdUrd 感受性は野生型 FANCD1 の発現により回復したことから、FdUrd 感受性は FANCD1 欠損によるものであると結論づけた。さらにこの感受性の相補には、FANCD1 の DNA ヘリカーゼ活性、ミスマッチ修復因子 MLH1 との結合、DNA 複製関連因子 TopBP1 との結合が必要であることを示唆する結果を得た (図 3)。FANCD1 は MLH1, TopBP1 と協調し、DNA ヘリカーゼとして機能し、FdUrd に対する細胞応答に関与していることが予想される。また、関連して、新規ヌクレオシド型抗腫瘍薬

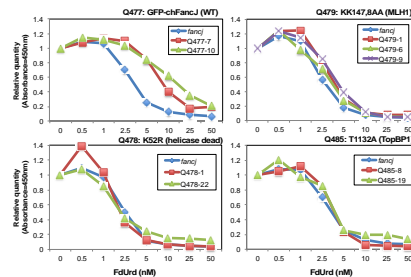


図 3. DT40細胞 FANCD1欠損株への野生型及び変異型FANCD1発現によるFdUrd感受性相補

TFTD (TAS-102, ロンサーフ) の薬効成分トリフルリジン (FTD) についての解析を進めた。FTD は、FdUrd と同様、DNA 複製ストレスを惹起し、p53 の強い活性化を引き起こすことを明らかにした。また、FTD は効率よく DNA 中に取り込まれるが、ほとんど DNA 鎖切断を誘導しないことを明らかにした。

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 9 件)

1. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Int J Oncol.* 42: 1951-60. 2013
2. Ikawa-Yoshida A, Ando K, Oki E, Saeki H, Kumashiro R, Taketani K, Ida S, Tokunaga E, Kitao H, Morita M, Maehara Y. Contribution of BubR1 to

- oxidative stress-induced aneuploidy in p53-deficient cells. *Cancer Med.* 2:447-56. 2013
3. Kubo N, Morita M, Nakashima Y, Kitao H, Egashira A, Saeki H, Oki E, Kakeji Y, Oda Y, Maehara Y. Oxidative DNA damage in human esophageal cancer: clinicopathological analysis of 8-hydroxydeoxyguanosine and its repair enzyme. *Dis Esophagus.* 27: 285-93. 2014
 4. Kawano H, Saeki H, Kitao H, Tsuda Y, Otsu H, Ando K, Ito S, Egashira A, Oki E, Morita M, Oda Y, Maehara Y. Chromosomal instability associated with global DNA hypomethylation is associated with the initiation and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol. Suppl* 4: S696-702. 2014
 5. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hitchins M, Inoue Y, Tanaka K, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, Okada S, Oda Y, Saeki H, Oki E, Maehara Y. Epigenetic Inactivation of BRCA1 Through Promoter Hypermethylation and Its Clinical Importance in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 15:498-504. 2015
 6. Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, Kuniwa M, Ando K, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Kitao H. Trifluridine Induces p53-Dependent Sustained G2 Phase Arrest with Its Massive Misincorporation into DNA and Few DNA Strand Breaks. *Mol Cancer Ther.* 14:1004-13. 2015
 7. Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H. The 1,2-Diaminocyclohexane Carrier Ligand in Oxaliplatin Induces p53-Dependent Transcriptional Repression of Factors Involved in Thymidylate Biosynthesis. *Mol Cancer Ther.* 14: 2332-42. 2015
 8. Iimori M, Watanabe S, Kiyonari S, Matsuoka K, Sakasai R, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y. Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat Commun.* 7:11117. 2016
 9. Kitao H, Morodomi Y, Niimi S, Kuniwa M, Shigeno K, Matsuoka K, Kataoka Y, Iimori M, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y. The antibodies against 5-bromo-2'-deoxyuridine specifically recognize trifluridine incorporated into DNA. *Sci Rep.* 6: 25286. 2015
 10. 北尾洋之、松岡和明、飯森真人、徳永えり子、佐伯浩司、沖英次、前原喜彦 トリフルリジン・チピラシル塩酸塩 (TAS-102: TFTD) の抗腫瘍効果における分子機序 癌と化学療法 43 巻 1 号 8-14. 2016
 11. 北尾洋之、清成信一、飯森真人、新美晋一郎、秋山真吾、枝廣圭太郎、中西良太、徳永えり子、佐伯浩司、沖英次、金治新悟、掛地吉弘、前原喜彦 オキサリプラチンと 5-FU 併用による抗腫瘍効果の分子機序 癌と化学療法 43 巻 6 号. 2016
- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. Kitao H, Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Watanabe S, Kuniwa M, Maehara Y. Cellular response to a fluorinated thymidine analogue trifluridine, a key component of the novel oral antitumor drug TAS-102 (TFTD). Gordon Research Conference-Nucleosides, Nucleotides and Oligonucleotides, Salve Regina University, Newport, RI. Poster Presentation. June 28-July 3, 2015
 2. Kitao H, Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Oki E, Maehara Y. The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis. AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Hynes Convention Center Boston, MA. Poster Presentation. Nov. 5-9, 2015
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)
- 名称：検出剤、該検出剤を含むキット、被験試料中の DNA に取り込まれたトリフルリジンを検出する方法およびトリフルリジンまたはトリフルリジンを含む抗悪性腫瘍剤の抗腫瘍効果を判定する方法
発明者：北尾洋之、諸富洋介、前原喜彦、木庭守
権利者：同上
種類：特許
番号：特許願 2015-200277 号 (P519034)
出願年月日：2015 年 10 月 8 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
九州大学大学院 消化器・総合外科（第二外科）
<http://www.kyudai2geka.com/>
九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 先端がん診断・創薬グループ
<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/group4/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北尾 洋之 (KITA0, Hiroyuki)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：30368617

(2) 研究分担者

飯森 真人 (IIMORI, Makoto)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：20546460

(2) 研究分担者

森田 勝 (MORITA, Masaru)
独立行政法人国立病院機構 (九州がんセンター)・その他部局等・消化器外科部長
研究者番号：30294937

(3) 研究分担者

沖 英次 (OKI, Eiji)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70380392