

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25740016

研究課題名(和文)放射線感受性に寄与するヌクレアーゼの同定と解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of endonucleases involved in irradiation sensitivity

研究代表者

村井 純子 (MURAI, JUNKO)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60532603

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)：がんの治療には放射線や抗がん剤が使用されます。放射線も抗がん剤もDNAに傷をつけることで、がん細胞を死に導きます。しかし、細胞はDNAの傷を修復する能力を持っているので、そちらが勝ればがん細胞は生き延びてしまいます。DNA修復に関わる遺伝子の機能を明らかにすることで、抗がん剤の効果を高める戦略を立てることが可能です。この研究では放射線やある種の抗がん剤により生じたDNA損傷の修復因子と、その作用メカニズムを明らかにしました。また、新規の抗がん剤(PARP阻害剤)の新たな作用メカニズムを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed novel function of a DNA repair gene TDP1 (tyrosyl-DNA phosphodiesterase) that is involved in the repair of DNA damages induced by irradiation and chemotherapy. Our findings would lead to a novel strategy to overcome cancers, because the combination of irradiation or chemotherapy in TDP1 deficient cancer cells or TDP1 inhibitors (under development) would augment the cytotoxicity of the treatment. Furthermore, we have discovered a novel mechanism of action for PARP inhibitors, recently developed anti-cancer agents. Although PARP inhibitors with highly catalytic PARP inhibition tend to be considered equivalent, we found that the potency of the new mechanism of action named "PARP-trapping" is markedly (more than 1,000 folds) different among five clinical PARP inhibitors and that the PARP-trapping potency corresponds to the cytotoxicity of each drug. We also revised the strategy of drug combination with PARP inhibitors based on the new mechanisms.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 抗がん剤 PARP阻害剤 トポイソメラーゼ 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 電離放射線照射により生じる DNA 2重鎖切断を修復する経路(相同組換えと非同相末端結合)は、ほぼ解明された。しかし、電離放射線が作る切断端の化学修飾を処理する酵素(DNA切断酵素や合成酵素等)については知見が少ない。この化学修飾が除去されない限り、相同組換えと非同相末端結合とは2重鎖切断端を結合できないので、この除去ステップは細胞の生き死にとって非常に重要である。同様に、放射線照射によって大量に生じる1重鎖切断を修復する場合にも、切断端の化学修飾を予め除く必要がある。

(2) PARP阻害剤は、最近になって卵巣がんに対する投与がFDAで認められた抗がん剤である。開発当初からpoly(ADP-ribose)polymerase 1 and 2(PARP1/2)の酵素活性が抗がん作用のメカニズムと考えられていたが、我々は2012年に新規の作用メカニズムとして、PARPはある種のPARP阻害剤存在下で、DNAの断端に結合してPARP-DNA複合体を形成することを示した。PARP-DNA複合体もまた(1)で研究するDNA断端処理に必要な酵素により処理される可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 研究目的は、電離放射線照射により生じるDNA断端処理に必要な酵素を遺伝学的手法で特定すること。

(2) PARP-DNA複合体の細胞毒性メカニズム、PARP-DNA複合体に対する耐性機構の解明、合理的な他剤併用療法の選択について研究すること。

3. 研究の方法

(1) DNA断端処理に必要な酵素のひとつであるtyrosyl-DNA phosphodiesterase 1(TDP1)のノックアウト細胞を用いて、TDP1がどのような構造のDNA断端処理をおこない、細胞生存に寄与しているかを、培養細胞と生化学的手法を用いて解析した。

(2) 臨床治験で使用されている5種類のPARP阻害剤を用いて、各薬剤間の作用の違い。他剤(トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤)との合理的な併用療法について検討した。またNIH(アメリカ国立衛生研究所)との共同研究で、PARP阻害剤の耐性に寄与する可能性のある遺伝子を網羅的に検索した。特定した遺伝子について、CRISPR/Cas9を用

いて培養細胞でノックアウト細胞を作製し、その遺伝子の機能について研究した。

4. 研究成果

(1) TDP1のノックアウト細胞は放射線に弱いながらも感受性(死にやすさ)を示し、トポイソメラーゼ阻害剤に強い感受性を示したので、抗がん治療で生じるDNA断端の処理に寄与している事が明らかになった。TDP1の基質を生化学的に検討したところ、既知の基質以外にも、HIV治療や白血病治療で使用されるDNA合成阻害剤(チェーンターミネータと総称される一群)によって生じるDNA断端の処理にも寄与している事が明らかになった(論文7)。

(2) PARP阻害剤5種類が、酵素阻害活性はほぼ同等であるにも関わらず、抗がん効果に1,000倍以上の差があることに気づいた。この差が生まれるメカニズムを研究したところ、抗がん効果の強さに相関して、PARP阻害剤にはPARP-DNA複合体を形成する作用があることを発見した(論文4)。PARP-DNA複合体はDNAポリメラーゼの伸張を妨げ、細胞への毒性が極めて高かった。申請者らの発見は、PARPの酵素阻害活性では説明のつかなかった、PARP阻害剤間の効果の違いを明確に示し、現行のPARP阻害剤を新たにPARP-DNA複合体形成能力によって分類する必要性を示した。また、この発見を元に、合理的なPARP阻害剤の他剤併用両方についても研究したところ、これまで相乗作用が知られていたPARP阻害剤+トポイソメラーゼ阻害剤、PARP阻害剤+テモゾロマイドについて、相乗作用のメカニズムが異なる事を明らかにした(論文2)。

NIHとの共同研究で、PARP阻害剤の感受性に関わる新規遺伝子SLFN11を同定し、SLFN11の発現制御に転写因子FLI1が関与している事を明らかにした(論文1)。SLFN11の機能については鋭意研究中である。

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7件)

[1] W. Tang, S. Bilke, L. Cao, J. Murai, G. Sousa, M. Yamade, L. Rajapakse, S. Varma, J. Helman, J. Khan, P. Meitzer, Y. Pommer, SLFN11 is a transcriptional

target of EWS-FLI1 and a determinant of drug response in Ewing's sarcoma, Clin Cancer Res. [Epub ahead of print] (査読あり)

[2] **J. Murai**, Y. Zhang, J. Morris, J. Ji, S. Takeda, J.H. Doroshow, Y. Pommier, Rationale for poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus catalytic inhibition, The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 349 (2014) 408-416. (査読あり)

[3] **J. Murai**, C. Marchand, S.A. Shahane, H. Sun, R. Huang, Y. Zhang, A. Chergui, J. Ji, J.H. Doroshow, A. Jadhav, S. Takeda, M. Xia, Y. Pommier, Identification of novel PARP inhibitors using a cell-based TDP1 inhibitory assay in a quantitative high-throughput screening platform, DNA repair, 21 (2014) 177-182. (査読あり)

[4] **J. Murai**, S.Y. Huang, A. Renaud, Y. Zhang, J. Ji, S. Takeda, J. Morris, B. Teicher, J.H. Doroshow, Y. Pommier, Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib, Molecular cancer therapeutics, 13 (2014) 433-443. (査読あり)

[5] Y. Maede, H. Shimizu, T. Fukushima, T. Kogame, T. Nakamura, T. Miki, S. Takeda, Y. Pommier*, **J. Murai***, Differential and common DNA repair pathways for topoisomerase I- and II-targeted drugs in a genetic DT40 repair

cell screen panel, Molecular cancer therapeutics, 13 (2014) 214-220.
*Corresponding authors. (査読あり)

[6] B.B. Das, S.Y. Huang, **J. Murai**, I. Rehman, J.C. Ame, S. Sengupta, S.K. Das, P. Majumdar, H. Zhang, D. Biard, H.K. Majumder, V. Schreiber, Y. Pommier, PARP1-TDP1 coupling for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage, Nucleic acids research, 42 (2014) 4435-4449. (査読あり)

[7] S.Y. Huang, **J. Murai**, I. Dalla Rosa, T.S. Dexheimer, A. Naumova, W.H. Gmeiner, Y. Pommier, TDP1 repairs nuclear and mitochondrial DNA damage induced by chain-terminating anticancer and antiviral nucleoside analogs, Nucleic acids research, 41 (2013) 7793-7803. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

1) 第47回日本骨軟部腫瘍学会 シンポジウム (2014)

2) 第73回日本ガン学会 シンポジウム (2014)

3) American Association of Cancer Research AACR 2014 ポスター発表 (2014)

4) American Association of Cancer Research AACR 2014 シンポジウム (2015)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村井 純子 (MURAI, Junko)

京都大学大学院医学研究科 特定助教

研究者番号 : 60532603

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :