

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830075

研究課題名(和文) EGFR核内移行阻害によるDNA損傷修復抑制を標的とした新たな集学的癌治療の確立

研究課題名(英文) The potency of DNA repair suppression mediated by DNA-PKcs de-phosphorylation through blocking of EGFR nuclear translocation

研究代表者

牧野 晴彦 (HARUHIKO, MAKINO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20467707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二本鎖損傷は細胞にとって最も脅威となるDNA損傷であり、放射線や抗癌剤が抗腫瘍効果を示す要因の一つと考えられており、非相同末端結合経路においてDNA-PKcsの活性化が重要な役割を担っている。DNA二本鎖損傷がおこると、がん細胞膜に発現するEGFRは、トポイソメラーゼ阻害薬によって、核内移行が誘導されたがシスプラチンでは誘導されなかった。EGFRの核内移行はDNA-Pkcsのリン酸化を規定している可能性があり、野生型EGFRを持った肺腺癌細胞において、DNA-PKcs阻害剤と二本鎖損傷を起こすトポイソメラーゼ阻害薬を併用することで、抗腫瘍効果を有意差をもって上げることが示された。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand breaks (DSBs) are the most cytotoxic form of DNA damage and are induced by ionizing radiation and specific chemotherapeutic agents, such as topoisomerase inhibitors. Cancer cells acquire resistance to such therapies by repairing DNA DSBs. A major pathway for the repair of DNA DSBs is non-homologous end-joining (NHEJ), which requires DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs) activity. The combination of NU7441 and topoisomerase inhibitors such as amrubicin and irinotecan had a synergistic effect on cell proliferation in A549 cells which is harboring wild type EGFR. NU7441 inhibited the growth of NSCLC cells and enhanced the chemosensitization to topoisomerase inhibitors by blocking DNA repair. A combination of NU7441 and topoisomerase inhibitor may be a promising treatment for NSCLC.

研究分野：肺癌 DNA損傷

キーワード：肺腺癌 DNA-PKcs EGFR NU7441

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦において、死亡率上位の疾患であり、進行期肺癌の平均生存期間は1年数か月と言われている。化学療法は一時的に奏功しても癌を完全に克服することはできない。肺癌化学療法の主流である殺細胞性抗癌剤はDNA損傷を誘導するが、癌細胞はそれを修復することで抗がん剤抵抗性を示す。中でもDNA2本鎖損傷を修復するNHEJ経路の中心的役割を果たすDNA-PKcsは、特に放射線治療に対する抵抗性について良く研究されている。研究代表者らはさらに、癌細胞表面に多く存在するEGFR(上皮成長因子受容体)が、放射線によって生じたDNA2本鎖損傷に対して、核内に移行した後DNA-PKcsと結合することでリン酸化を誘導しDNA損傷修復を誘導することを報告している。EGFRとDNA-PKcsは抗がん治療によるDNA損傷を修復し、治療抵抗性を示す要因と考えられている。

2. 研究の目的

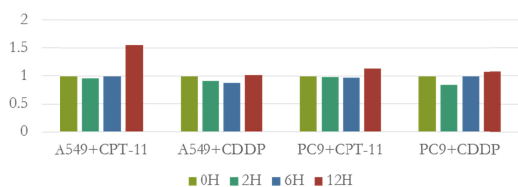
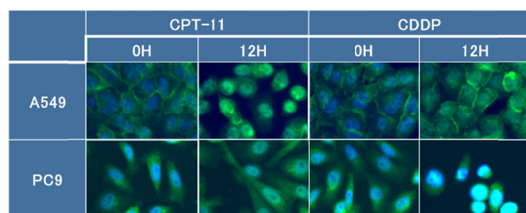
肺腺癌細胞において、殺細胞性の抗癌剤を作用させることによってEGFRの核内移行とDNA-PKcsのリン酸化を誘導し、治療抵抗性を示すのかを検討する事で、肺がん治療における新たな治療標的を探索することを目的としている。

3. 研究の方法

肺腺癌細胞(EGFR野生型:A549とEGFR変異型:PC9)において、各種抗がん剤によるEGFR核内移行の違いを検討し、DNA-PKcsのリン酸化誘導について検討した。さらにA549細胞に対する各種抗がん剤のDNA二本鎖損傷の発生と修復過程とアポトーシス誘導の違いとDNA-PKcsのリン酸化阻害薬による相乗効果についても検討した。

4. 研究成果

抗がん剤によるEGFRの局在についての検討(上:蛍光顕微鏡による画像(EGFR:緑 DAPI:青) 下:イメージアナライザーCX5による核内のEGFR濃度の割合)

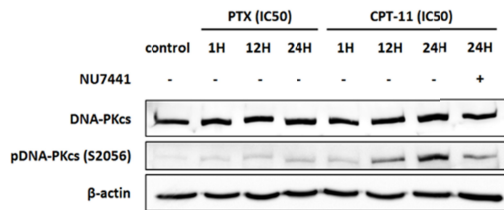
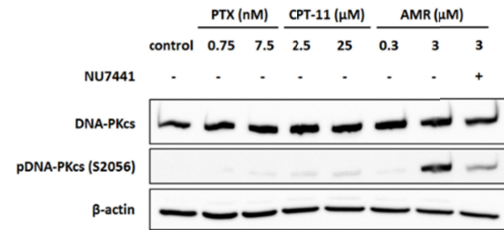


野生型EGFRはトポイソメラーゼ阻害薬(CPT-11)で核内に移行したが、白金製剤(CDDP)では有意ではなかった。EGFR変異細胞ではEGFRの核内移行は見られなかった。

DNA損傷を直接引き起こすトポイソメラーゼ阻害薬では放射線照射後と同様DNA損傷修復が必要となっていることが考えられた。EGFR変異型ではEGFRは核内への移行が見られず、これがDNA損傷修復を誘導できない一因となっていることが考えられた。

Western blotによる野生型EGFR肺癌細胞における各種抗がん剤作用によるDNA-PKcsリン酸化の検証

DNA損傷修復とEGFRの核内移行のターゲットとなるDNA-PKcsの活性化の検証が必要と考えた。

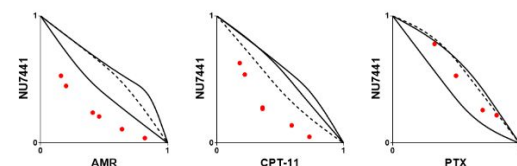


(上)A549細胞に対する各種抗がん剤のIC50と10%濃度のIC50を1時間作用させた場合 (下)IC50濃度を長時間作用させた場合

トポイソメラーゼ阻害薬作用では濃度依存性にDNA-PKcsのリン酸化が誘導されたが、微小管重合阻害薬では誘導されなかった。薬剤によってDNA-PKcsのリン酸化を必要とするものとそうでないものがあることが示唆された。同じtopoisomerase阻害薬でも1本鎖損傷を起こし、それが修復の過程で2本鎖損傷を来すCPT-11と直接二本鎖損傷を誘導するAMRでは、DNA-PKcsのリン酸化誘導にも時間差を生じていることが示され、薬剤併用のタイミングにおいても非常に示唆に富んだ結果が得られた。DNA

<Iso-borogramによる各種抗がん剤とDNA-PKcs阻害薬の併用効果

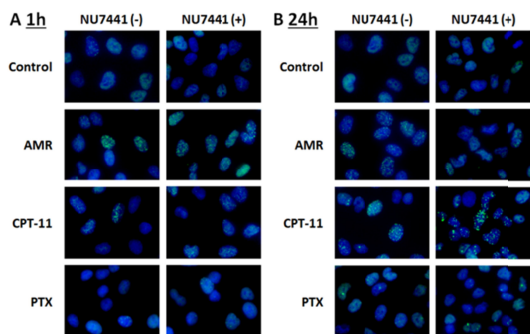
A549細胞において、DNA-PKcs阻害薬(NU7441)による各種抗がん剤の抗腫瘍効果へ影響について検討した。



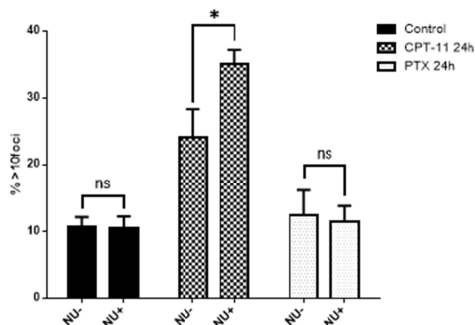
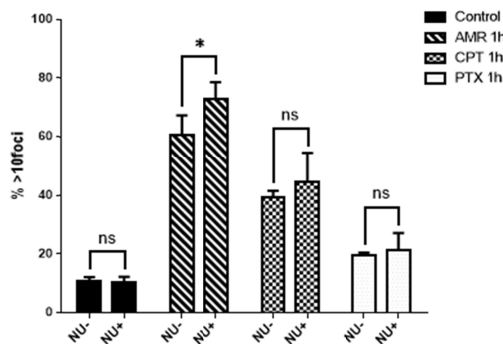
A549においてトポイソメラーゼ阻害薬はDNA

PKcs 阻害薬との併用で相乗的な抗腫瘍効果を示したが、微小管重合阻害剤である PTX は相加効果にとどまった。

各種抗がん剤による DNA 二本鎖損傷誘導と DNA PKcs 阻害薬併用による影響について



細胞 : A549 緑 : 53BP1 foci = DNA 二本鎖損傷
A 各種薬剤作用 1 時間後 B 24 時間後
(* AMR に DNAPKcs 阻害薬を併用すると細胞の変形が強すぎて DNA 二本鎖損傷の評価は困難)



各種抗がん剤作用後に DNA 二本鎖損傷が 10 個以上確認できる細胞の割合

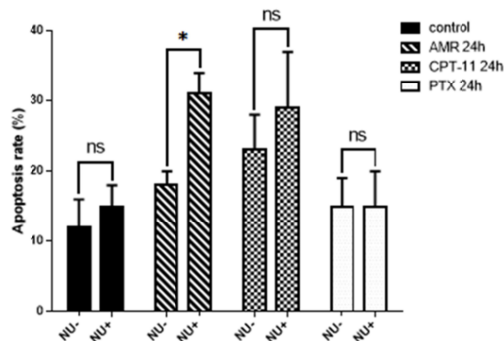
トポイソメラーゼ阻害薬と DNA PKcs 阻害薬を併用すると有意差をもって DNA 二本鎖損傷が誘導されたが、微小管重合阻害薬では DNA 二本鎖損傷に変化はもたらさなかった。

各種抗がん剤によるアポトーシス誘導と DNA PKcs 阻害薬併用による影響
A549 細胞に対して各種抗がん剤 IC50 濃度を作用させた場合のアポトーシス誘導をフロ

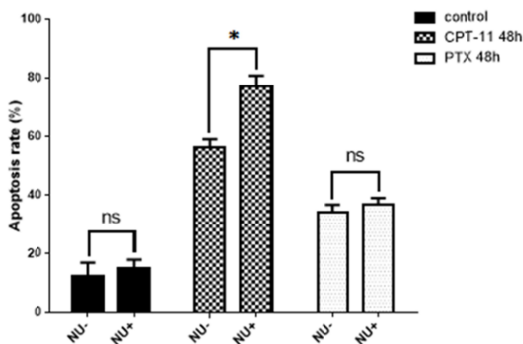
ーサイトメトリーを用いて AnnexinV 染色を測定することで検討した。

A : 24 時間後 B : 48 時間後

A 24h



B 48h



抗がん剤作用 24 時間後各種抗がん剤はアポトーシスを誘導したが、DNA PKcs 阻害剤は AMR に対してのみ有意差をもってアポトーシス誘導を増やした。CPT-11 は 48 時間後にはアポトーシスの誘導を増やした。微小管重合阻害やくである PTX は DNA PKcs 阻害薬によって、アポトーシス誘導への影響は見られなかった。

トポイソメラーゼ 阻害薬である AMR は作用直後に DNA 二本鎖損傷を起こし、それが DNA PKcs のリン酸化を引き起こし DNA 損傷修復が行われ、抗がん剤への抵抗性を示す要因となっていると考えられる。トポイソメラーゼ

阻害薬である CPT-11 は DNA1 本鎖損傷を起こし、それが DNA 複製の過程で 2 本鎖損傷となることで抗腫瘍効果を示すが、そこには時間差が存在する。微小管重合阻害薬である PTX は肺癌細胞 A549 に対してアポトーシスは誘導するが、DNA 二本鎖損傷はほとんど生じることがなく異なる機序で抗がん作用を示す。そのため DNA-PKcs のリン酸化は誘導されないため DNA 損傷修復をブロックしても抗腫瘍効果における相乗効果は見られない。

以上の結果は、治療抵抗性である野生型 EGFR をもつ非小細胞肺癌細胞において、DNA 二本鎖損傷を誘導するトポイソメラーゼ阻害薬と DNA 損傷修復を行う DNA-PKcs 阻害薬が有効な治療選択となり得ることを示唆しており、抗がん剤との併用においても DNA-PKcs を介した DNA 損傷修復機構が新たな治療標的となり得ることを示唆している。

殺細胞性抗癌剤の治療抵抗性のメカニズム解明とともに、治療抵抗性癌細胞の DNA 損傷修復をブロックすることで抗がん剤の治療感受性を上げることができるともかもしれない。

今後は安全性も考慮した実験を重ね、臨床での実用を目指したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文 計 1 件〕

DNA-PK Inhibition by NU7441 Enhances Chemosensitivity to Topoisomerase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells by Blocking DNA Damage Repair. M.Yanai H.Makino B.Ping et al. Yonago Acta Med (2017 Mar 9;6(1)16-23.) 査読有り

〔学会発表 計 4 件〕

EGFR nuclear translocation contribute radio-resistance through threonine 2609 phosphorylation of DNA-dependent Protein Kinase H.MAKINO M.YANAI etal 15th International Congress of Radiation Research 京都国際会館、京都府京都市, 2015 年5月

Somatic mutation in EGFR harboring NSCLCs are deficient of EGFR nuclear translocation-mediated DNA repair against IR, Hypoxia and Chemotherapy. M.Yanai H.Makino etal 15th International Congress of Radiation Research 京都国際会館、京都府京都市, 2015 年5月

非小細胞肺癌における抗がん剤と DNA-PKcs 阻害剤 (NU7441) の併用効果についての検討

矢内正晶 牧野晴彦 他 第 57 回 日本肺癌学会学術集会 福岡国際センター 福岡県 博多 2016 年 12 月

The Potency of DNA-PKcs phosphorylation mediated by EGFR nuclear translocation as a new target of anti-cancer agent
H.Makino

The 16th Biennial Congress of the Metastasis Research Society Chengdu, China 2016 年 9 月

6 . 研究組織

鳥取大学。医学部附属病院。助教

牧野 晴彦 (Haruhiko Makino)

研究者番号 : 20467707