

71. DNA 修復遺伝子解析による抗癌剤効果予測因子の確立

掛地 吉弘

神戸大学 大学院医学研究科 外科学講座 食道胃腸外科分野

Key words : DNA 修復遺伝子, 抗癌剤効果予測因子

緒言

我が国で罹患率の高い胃・大腸癌の治療は外科治療と化学療法により治療成績が向上してきたが、高度進行・転移再発癌に対しては化学療法の治療効果を高めることが望まれる。個々の症例で癌組織の抗癌剤に対する感受性は異なるので、各々の薬剤作用の分子機序を明らかにし、治療効果を予測する predictive marker を探索し、その標的分子を応用したより効果的な治療法の開発を目指している。

本研究の目的は、消化器癌、特に胃・大腸癌において標準治療で用いられる 5-fluorouracil (5-FU)、Irinotecan (CPT)、Platinum (CDDP、L-OHP)、Taxanes (Docetaxel、Paclitaxel) の各々の薬剤について作用点を探索して感受性を規定している分子を同定し、治療効果の predictive marker の確立と感受性規定因子を標的とした治療法の開発を目指すことである。

方法、結果および考察

1. 大腸癌における DNA 修復遺伝子 *FANCD1* 発現と 5-FU 感受性の関連¹⁾

ファンconi貧血 (Fanconi Anemia, FA) はまれな小児遺伝性疾患で、骨髄不全、骨格異常、高発癌性が主な臨床症状である。現在までに 18 の FA 原因遺伝子が同定されている。*FANCD1* は遺伝性非ポリポーシス大腸がん原因遺伝子 *MLH1* とも会合していることが報告され、*FANCD1* が FA 原因遺伝子であるだけでなく、家族性乳癌発症や家族性大腸癌、さらには他の散発性癌発症抑制にも深く関わっている可能性があった²⁾。

九州大学消化器・総合外科で外科手術を施行された 219 例の大腸癌患者より提供を受けた標本を用い、組織免疫染色法により *FANCD1* を染色した。染色強度と臨床病理学的因子等との関連を比較したところ、以下の知見が得られた。

- 1) 癌部においては、非癌部に比べ、有意に *FANCD1* 発現が亢進していた。
- 2) 中でも *FANCD1* 発現の高い群においては、5-FU を用いた術後化学療法の治療効果が少なかった (図 1A)。
- 3) *MLH1* 発現が正常な癌においては、2) の関係が見られたが、*MLH1* 発現が見られない癌においては、*FANCD1* 発現と 5-FU による治療効果との間に有意な相関が見られなかった。
- 4) *MLH1* を欠損した大腸癌細胞株 HCT116 と *MLH1* 発現を回復した HCT116 3-6 株に *FANCD1* を過剰発現させたところ、HCT116 3-6 でのみ 5-FU に対し耐性を示した (図 1B)。

以上の結果から、*FANCD1* 過剰発現が *MLH1* を介して癌細胞の 5-FU 耐性化を引き起こすことが原因で、*FANCD1* 発現が高い症例で 5-FU を含む術後化学療法の治療効果が少なくなることが示唆された。

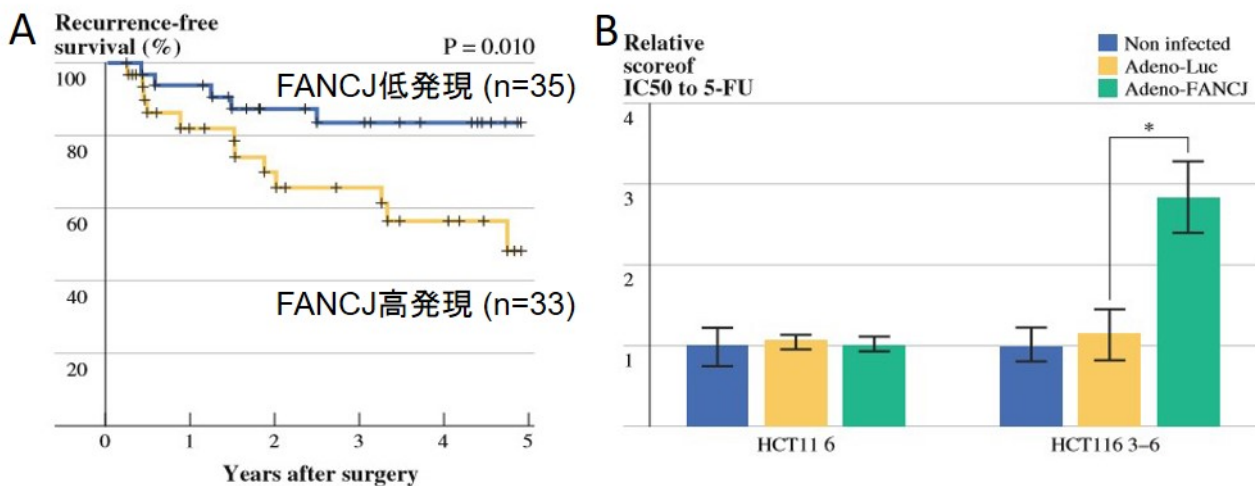


図1. A) Stage II/III 大腸癌に対して手術 + 5-FU を含んだ術後補助化学療法を施行した症例の無再発生存曲線。B) 大腸癌細胞株における FANCJ 発現と 5-FU 耐性。* $P < 0.05$ (unpaired t test) (文献¹⁾ より)

2. 大腸癌におけるトリフルリジン・チピラシル塩酸塩 (TAS-102: TFTD) の抗腫瘍効果^{3,4)}

治癒切除不能な進行・再発大腸癌に対して、5-FU を基本とする標準治療に応答・不耐となった後の三次・四次治療として 5-FU とは作用機序の異なる TFTD が有効な薬剤の一つと期待されている。Trifluridine (FTD) は腫瘍組織のチミジン代謝経路へ働きかけ、抗癌作用を発揮すると考えられている⁵⁾。

ヒト結腸癌細胞株 HCT-116, RKO およびヒト肺癌細胞株 A549 に IC_{50} の濃度で FTD と FdUrd を処理したところ、FTD は三つの細胞株すべてで細胞周期を G2 期に停止させた。一方、FdUrd による細胞周期の停止は細胞間で差がみられた。ウエスタンブロット法を用いた解析では、FTD 処理により DNA 複製ストレスの指標の一つである Chk1 蛋白 Ser345 のリン酸化が一過的に誘導され、続いて p53 と p21 蛋白の蓄積が認められた。p53 遺伝子をノックアウトした HCT-116 細胞 [HCT-116 p53^{-/-}] および siRNA により p53 発現を抑制した細胞 (HCT-116, A549) においては、HCT-116, A549 で認められた G2 期停止がみられなかったことから、FTD 処理による G2 期停止は p53 に依存していると考えられた³⁾。

一般的に細胞分裂期 (M 期) の開始・進行は、Cyclin/B1/Cdk1 複合体のキナーゼ活性によって制御されている。Cyclin B1 は G2 期に細胞質に蓄積され、G2 期終了時に核へ移行し、M 期中期での分裂直前にその蓄積はピークに達し、染色体分離、細胞分裂誘導後、急速に分解される。ところが、FTD 処理により G2 期に停止した HCT-116 細胞において Cyclin B1/Cdk1 の mRNA および蛋白量を評価したところ、染色体分離、細胞分裂を完了していないにもかかわらず mRNA 発現低下および各蛋白質の消失が認められた (図 2A、B)。このような現象は、ヒト正常細胞株の細胞老化誘導時において報告されており、その際の Cyclin B1 消失には mRNA レベルでの発現低下に加え、p21 による核内移行とプロテアソーム APC/CCdh1 による蛋白質分解が関与する。そこで、siRNA 法で p21 の発現を抑制した場合、あるいはプロテアソーム阻害剤 (MG132) を処理した場合の FTD 処理による Cyclin B1 局在変化と蛋白量変動を、細胞免疫染色法およびウエスタンブロット法により検討した。p21 発現を抑制した場合および MG132 を処理した場合、いずれにおいても FTD 処理時にみられる Cyclin B1 消失は部分的に緩和された (図 2C、D)。これらの結果から、FTD による G2 期停止時にみられる Cyclin B1 消失は細胞老化誘導時と同様に p21 とプロテアソームが関与することが明らかとなった³⁾。

以上より、p53 が正常に機能するヒト癌細胞株において、FTD 接触時に、1) 複製ストレス応答が活性化すること、2) その後 p53-p21 経路が活性化すること、3) 細胞はゲノム DNA が複製を完了した G2 期で停止し、M 期への進行が抑制されること、4) M 期進行に必須の CyclinB1-Cdk2 のタンパク量が消失することが明らかになった^{3,4)}。

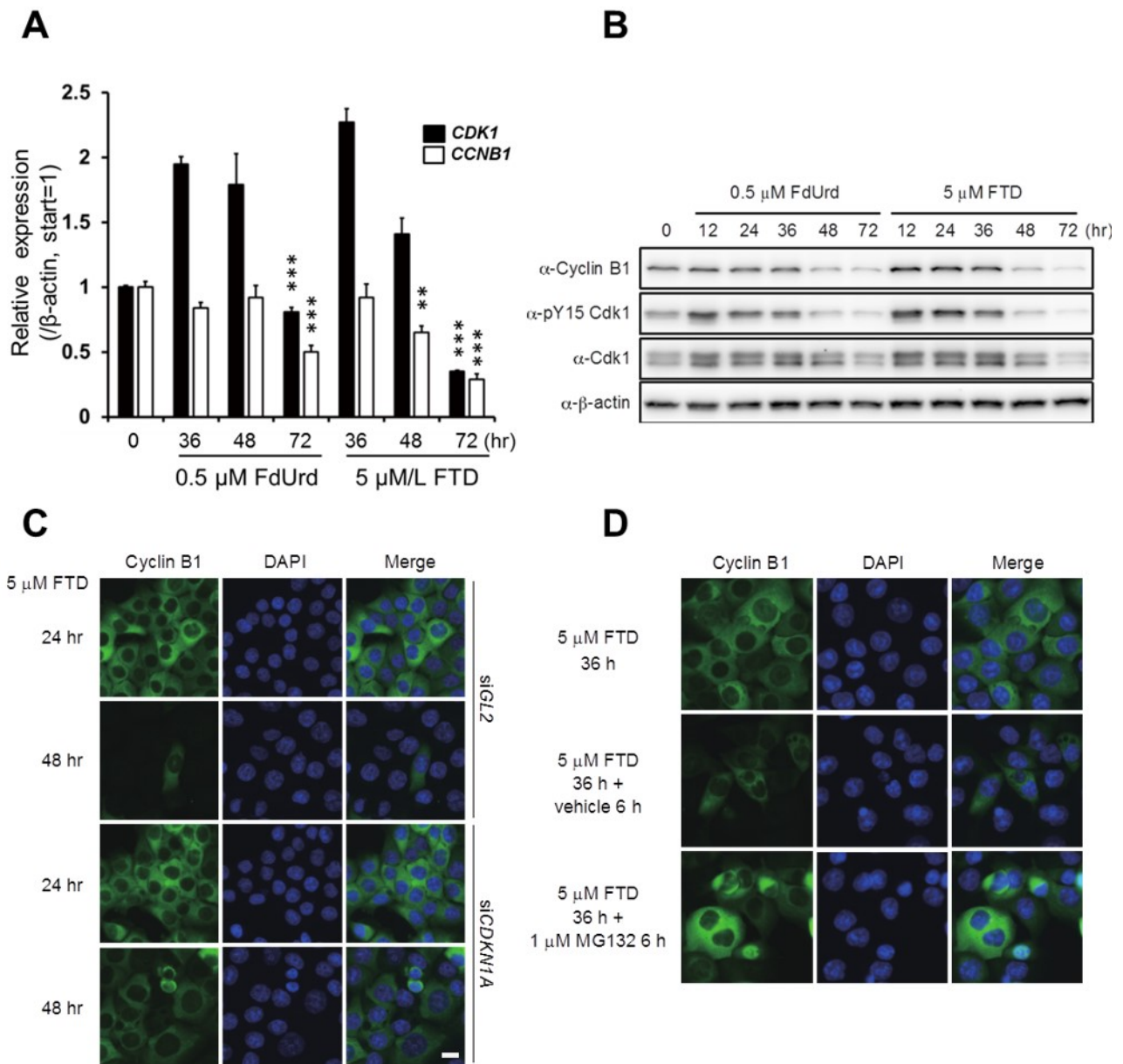


図2. FTD 処理後の mRNA (A)、タンパク質 (B) の発現変化と p21 siRNA 及び MG132 処理時の細胞免疫 (C, D)。(文献³) より) ***P < 0.001, **P < 0.01 (unpaired *t* test) . scale bar: 20 μ m.

3. 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^{6,7)}

プラチナ製剤は癌治療において、併用化学療法の一つの要素として様々な癌腫に対して使用され、5-FU の抗腫瘍効果を高める作用があると考えられる。オキサリプラチンは、シスプラチン等の他のプラチナ製剤と同様に同一 DNA 上のグアニン塩基に結合し、プラチナを介して DNA 鎖上あるいは鎖間のグアニン塩基を架橋する。架橋した際に DNA 鎖上に形成される付加物は、シスプラチンやカルボプラチンの場合は cis-diammine キャリアーリガンドという比較的小さなものであるのに対し、オキサリプラチンの場合は、1,2-diaminocyclohexane (DACH) キャリアーリガンドと呼ばれる嵩高いものが形成される。p53 の機能が保持されたヒト大腸癌細胞株 HCT116 を用いた実験では、オキサリプラチンが p53 を強く活性化すること、さらに活性化した p53 が核型 dUTPase 遺伝子発現制御領域 (プロモーター領域) への転写因子 Sp1 の結合および機能を拮抗的に阻害し、核型 dUTPase 発現を抑制すること、さらにオキサリプラチンにより dUTP/dTTP 比の増加が見られるが、それが 5-FU あるいは FdUrd によりさらに増加することが報告されている⁸⁾。

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 にオキサリプラチンを曝露させると早い時間から miR-34a 前駆体が発現誘導されることを確認し (図 3A)、miR-34a 模擬産物を細胞内に導入すると E2F1 発現抑制、核型 dUTPase 発現抑制が誘導されることを確認した (図 3B) ⁶⁾。dTTP 生合成に関わる因子をコードする遺伝子の発現調節領域の構造には、核型 dUTPase に加え、dihydrofolate reductase (DHFR)、Thymidine kinase 1 (TK1)、Thymidylate synthase (TS) の転写調節領域に Sp1、E2F 結合配列が存在し、いずれも p53 野生型の細胞においてオキサリプラチン曝露時に強い発現抑制が観察された。オキサリプラチン曝露 48 時間後の HCT116 細胞内 dTTP 量は検出困難なレベルにまで低下した (図 3C) ⁶⁾。このようなオキサリプラチン曝露による dTTP 枯渇は、5-FU (FdUMP) による TS 阻害時の dUTP/dTTP 量比増加をさらに亢進させ、dUTP のゲノム DNA への取込みを促進すると考えられ、DNA 鎖切断を介する細胞殺傷能、ひいては抗腫瘍効果を高めることに貢献していると予想された。

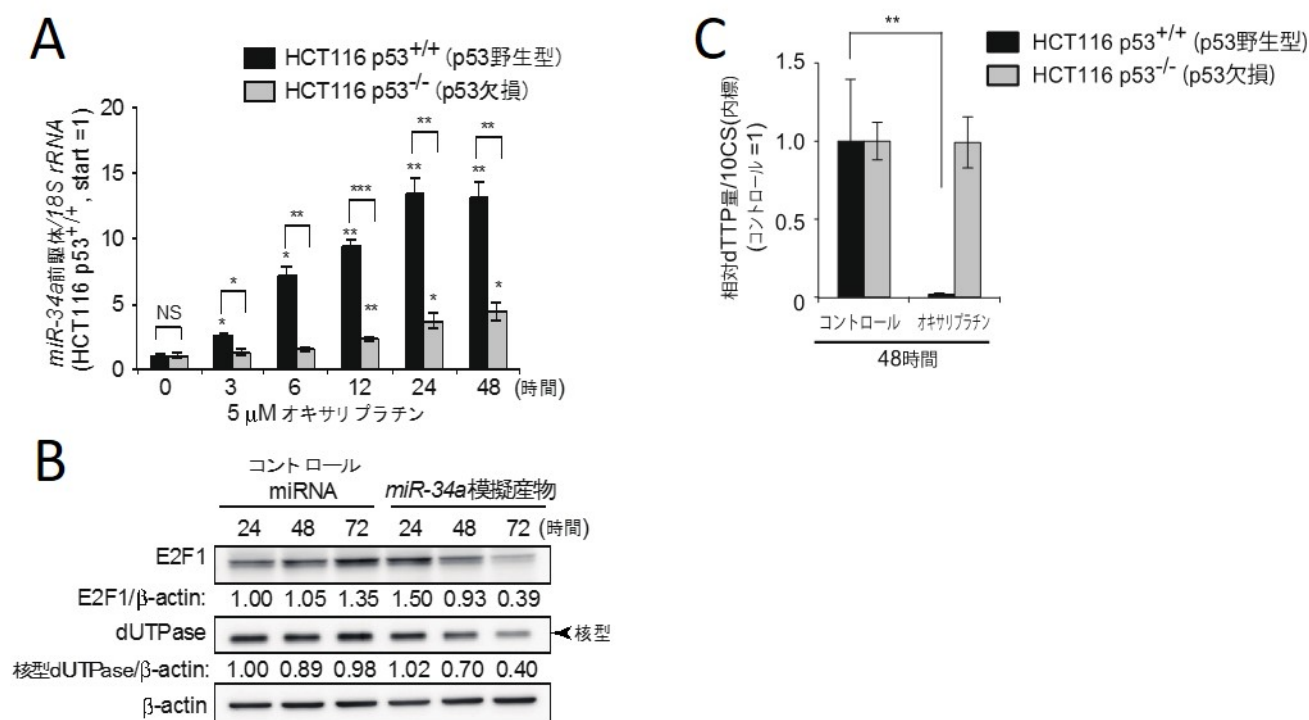


図 3. A: オキサリプラチン曝露による miR-34a 発現誘導の p53 依存性、B: miR-34a 模擬産物による E2F1、核型 dUTPase の発現消失、C: オキサリプラチン曝露による p53 依存的な dTTP 枯渇 (文献^{6,7)} より) *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (unpaired *t* test) .

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究院がん分子病態学講座の北尾洋之である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakanishi R, Kitao H, Fujinaka Y, Yamashita N, Iimori M, Tokunaga E, Yamashita N, Morita M, Kakeji Y, Maehara Y. FANCI expression predicts the response to 5-fluorouracil-based chemotherapy in MLH1-proficient colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(11):3627-35. doi: 10.1245/s10434-012-2349-8. PMID: 22526901
- 2) Xie J, Guillemette S, Peng M, Gilbert C, Buermeier A, Cantor SB. An MLH1 mutation links BACH1/FANCI to colon cancer, signaling, and insight toward directed therapy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3:1409-16. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0118. Epub 2010 Oct 26. PMID: 20978114

- 3) Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, Kiniwa 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.* 2015;14(4):1004-13.
- 4) Kitao H, Matsuoka K, Iimori M, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Miyamoto Y, Baba H, Maehara Y. Antitumor Molecular Mechanism of Trifluridine and Tipiracil Hydrochloride (TAS-102: TFTD). *Gan To Kagaku Ryoho.* 2016;43(1):8-14. Review. Japanese. PMID: 26809521
- 5) Lenz HJ, Stintzing S and Loupakis F: TAS-102, a novel antitumor agent: a review of the mechanism of action. *Cancer Treat Rev* 41(9): 777-783, 2015. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.06.001. PMID: 26428513
- 6) 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.* 2015;14(10):2332-42. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0748. PMID: 26208523
- 7) Kitao H, Kiyonari S, Iimori M, Niimi S, Akiyama S, Edahiro K, Nakanishi R, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Kanaji S, Kakeji Y, Maehara Y. The molecular aspect of antitumor effect by oxaliplatin in combination with 5-FU. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2016;43(6):715-722. Review. Japanese.
- 8) Wilson PM, Fazzino W, LaBonte MJ, Lenz HJ, Ladner RD. Regulation of human dUTPase gene expression and p53-mediated transcriptional repression in response to oxaliplatin-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2009. 37(1): 78-95. doi: 10.1093/nar/gkn910. PMID: 19015155