

DNA二本鎖切断修復アッセイ系を用いた 放射線療法・化学療法の増感剤の探索

[1] 組織

代表者：荻原 秀明

(国立がん研究センター研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 36万5220円、

旅費 3万4780円

[2] 研究経過

本研究の目的は、放射線・抗がん剤の増感剤を探索することである。

がん治療において、放射線治療、化学療法はがん細胞にDNA損傷を与えることでがん細胞死を誘発する目的で行われてきた。放射線治療においては、放射線照射装置の技術的な発展により腫瘍部位に集中的に照射することが可能になりつつある。しかし、人体に照射できる照射線量には限界量があるため、限界まで照射した場合でも完全に腫瘍を退縮できない場合もある。また、化学療法においては、シスプラチン等の従来のDNA損傷を誘発する抗がん剤は全身に投与するため、副作用が問題となっていた。しかし、近年Olaparib等のPARP阻害剤もDSBを誘発するものの副作用は少ないとされる薬剤が開発されてきている。このように放射線や抗がん剤の多くは、主にDNA二本鎖切断(DSB)を誘発し、その修復にはDSB修復機構である非相同末端結合(NHEJ)、相同組換え修復(HR)が関与する。即ち、放射線治療や化学療法において、NHEJやHRを阻害する化合物を併用すれば、放射線、DNA傷害剤によって生じたDSBの修復を抑制することでがん細胞死を効率的に誘発することができる。このようなDSB修復関連因子の阻害剤は、効率的な治療効果が期待できると共に、照射量、投与量の低減化による副作用の低減化も期待できる。しかし、DSB修復関連因子の阻害剤はいくつか存在しているものの臨床応用には至っていない。

そこで本研究では、正常細胞の増殖に影響が少なく、かつがん細胞への放射線感受性、抗がん剤感受性が増感・増強する化合物を同定し、放射線治療、

化学療法の新規増感法の開発を目指す。

放射線によるDSBの修復には主に、NHEJが重要である。また、副作用が少なく臨床応用へ有望な抗がん剤であるPARP阻害剤によるDSBの修復には、主にHRが重要である。即ち、放射線増感剤にはNHEJ促進因子、PARP阻害剤の増感剤にはHR促進因子が標的となり得る。そこで、以下の2つの観点から増感剤の探索を行う。

(1) 放射線増感剤としてのNHEJ阻害剤の探索

(2) PARP阻害剤の増感剤としてのHR阻害剤の探索

我々は、これまでにヒト細胞内でNHEJの活性を簡便に測定できる独自のアッセイ系を開発してきた。そして、このアッセイ系を用いることで、CBP、p300などのHAT阻害剤がNHEJの促進に寄与し、HAT阻害剤の中でGarcinolがNHEJを効率よく抑制し放射線増感作用を有することを見出した。そこで、(1)に関しては我々が開発したNHEJアッセイ系、(2)に関してはMaria Jasinらが開発したHRアッセイ系を用いて、化合物ライブラリーからNHEJ、HR活性を抑制する化合物をハイスループットでスクリーニングし、候補となった化合物の中から正常細胞に影響が少なく、放射線増感作用、PARP阻害剤増強作用のある化合物を同定する。

そこで候補化合物のNHEJ、HRへの影響を修復タンパク質KU70/KU80やRAD51などのDSBへの集積によって調べるために、加齢ゲノム制御プロテオーム寄附研究部門・安井明教授らが開発したDNA損傷応答可視化システムによって調べるために本共同研究を進めた。

研究活動については、安井教授および宇井助教と電子メールや研究会議および東北大学加齢医学研究所で綿密な打ち合わせを行った。東北大学加齢医学研究所でDNA損傷応答可視化システムによってDNA修復タンパク質のDSBへの集積実験が行われた。

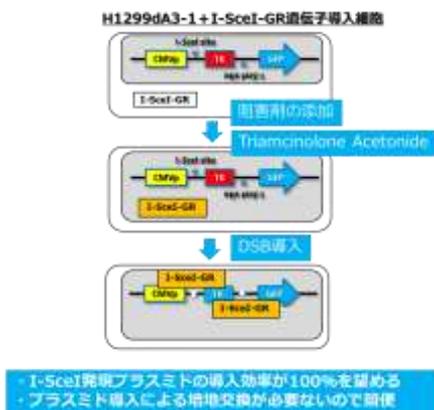
[3] 成果

(3-1) 研究成果

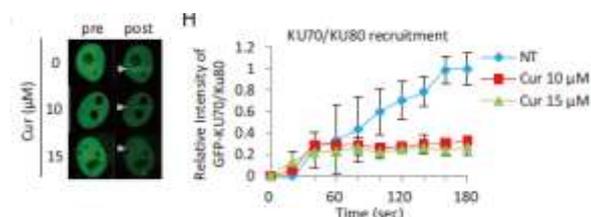
本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、NHEJ アッセイ系を用いて NHEJ 活性を抑制するような化合物の網羅的探索するために最適なアッセイ系の確立を試みた。今までに我々は、ヒト細胞内での NHEJ 活性を測定できる H1299 d A3-1 細胞株を樹立した。しかし、この細胞を用いた NHEJ アッセイは、I-SceI 制限酵素の発現プラスミドをアッセイごとに遺伝子導入する必要があり、実験作業工程が煩雑になるためハイスループットスクリーニングに適さない。そこで、Triamcinolone acetone(TA)添加によって I-SceI 制限酵素を誘導する発現プラスミドを H1299 d A3-1 細胞株に安定的に導入することを検討した。現在までに薬剤耐性になったクローンを選択した段階にある。今後、TA 添加により I-SceI が発現するクローンを単離する予定である。

NHEJ阻害剤のスクリーニング系の構築



第2に、Curcumin による DSB 修復の抑制効果について検討した。我々は、いままでにヒストンアセチル化酵素が DSB 修復において促進的な働きがあることを見出した経緯から、ヒストンアセチル化酵素の阻害効果を有する化合物について DNA 損傷剤への増感効果について調べてきた。その中で CBP/p300 阻害剤として知られている Curcumin が、DSB 修復経路である NHEJ および HR の両方の経路を抑制する効果があることを見出した。また、Curcumin 処理により NHEJ 修復タンパク質 KU70/80 および HR 修復タンパク質である RAD51 の DSB への集積が抑制された。

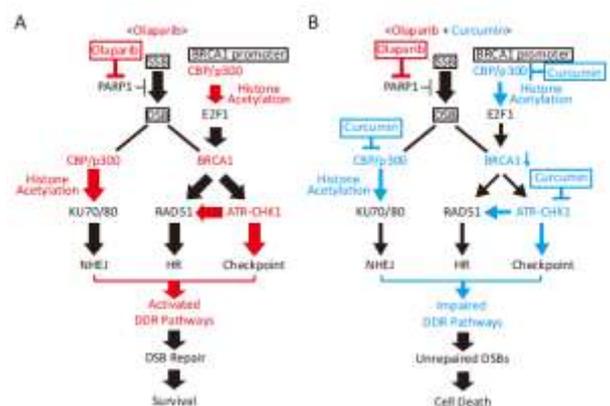


また、Curcumin 処理により DSB 周辺のヒストンのアセチル化が減弱することが ChIP アッセイにより明らかとなった。したがって Curcumin による DSB 修復の抑制効果の要因は CBP/p300 の阻害効果が発現していることが示唆された。また、Curcumin により DSB 修復タンパク質 BRCA1 の発現が抑制されること、ATR の活性が阻害されることにより HR および DNA 損傷応答が抑制されることが示唆された。このように Curcumin は CBP/p300 や ATR を阻害することで様々な DNA 損傷応答経路を抑制する作用があることが示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究成果により、(1)の論文を報告するに至った。本共同研究により、Curcumin が NHEJ や HR の抑制効果を持ち、修復タンパク質の DSB への集積に抑制的な影響を与えていることを見出すことができた。また、本共同研究の進展により Harvard 大学の塩谷博士との共同研究に結びつき、HR や DNA 損傷応答に関与する ATR が Curcumin の新規標的であることを見出すことができた。本共同研究により、Curcumin の DSB 修復に対する抑制効果をもたらす主な標的因子が CBP/p300 と ATR であることが示唆された。このように本共同研究において多くの学外研究者らの協力が得られたことで論文として報告するに至ることができた。また、本研究により、副作用が少ない Curcumin と PARP 阻害剤を併用することによって、がん細胞に対する増感効果が得られることが明らかになった。今後、本研究成果は、PARP 阻害剤などの化学療法における Curcumin あるいはその誘導体の増感剤としての研究への発展が期待される。

[4] 成果資料



(1) Ogiwara H, Ui A, Shiotani B, Zou L, Yasui A, Kohno T. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. *Carcinogenesis*. 2013; 34:2486-2497.