

表 題 大腸癌における SN-38 と olaparib の併用効果に関する基礎的検討

論文の区分 博士課程

著 者 名 田原 真紀子

担当指導教員氏名 安田 是和 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系 専攻
消化器疾患学 分野

2014年5月1日申請の学位論文

目次

第1章 研究背景と目的

- 1-1) 大腸癌の疫学と治療
- 1-2) Microsatellite Instability (MSI) 陽性大腸癌について
- 1-3) Topoisomerase I 阻害剤の作用機構
- 1-4) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤について
- 1-5) DNA 損傷に対する細胞内応答
- 1-6) 本研究の目的

第2章 実験方法

- 2-1) 使用細胞株と薬剤
- 2-2) MSI 解析
- 2-3) シークエンス解析
- 2-4) *In vitro* での細胞増殖アッセイ
 - a. [3H]-チミジン取り込みアッセイ
 - b. セルカウントアッセイ
 - c. コロニー形成アッセイ
- 2-5) 細胞周期解析
- 2-6) アポトーシス解析
- 2-7) 定量的 real-time RT-PCR
- 2-8) Western blot 法
- 2-9) 蛍光抗体二重染色法
- 2-10) siRNA を用いた蛋白発現の抑制
- 2-11) *In vivo* での腫瘍増殖抑制効果の分析
- 2-12) 統計学的解析

第3章 実験結果

- 3-1) ヒト大腸癌細胞株における MSI 解析と遺伝子異常
- 3-2) DNA 修復関連分子の発現解析
- 3-3) ヒト大腸癌細胞株における PARP 阻害剤 (olaparib : AZD2281) の効果
- 3-4) ヒト大腸癌細胞株における SN-38 と olaparib の併用効果
 - a. 細胞増殖抑制効果
 - b. 細胞周期解析とアポトーシス解析
 - c. コロニー形成アッセイ
 - d. 二本鎖 DNA 損傷修復関連マーカー (53BP1、 γ H2AX、Rad51) および細胞周期マーカー (BrdU) を用いた蛍光抗体二重染色法による検討
- 3-5) 二本鎖 DNA 損傷修復関連タンパク (Mre11、Rad50、Rad51) 発現抑制による SN-38 と olaparib 感受性への影響
- 3-6) *In vivo* での irinotecan と olaparib の腫瘍増殖抑制効果と有害反応の検討
- 3-7) Rad51 阻害剤 (B02) と SN-38、olaparib の併用効果

第4章 考察

第5章 結論

第6章 引用文献

第7章 謝辞

第1章 研究背景と目的

1-1) 大腸癌の疫学と治療

本邦における大腸癌の罹患率は 1990 年代前半までは増加し、その後は横ばいである。大腸癌死亡率は 1990 年代半ばまで増加し、その後は漸減傾向である。2011 年の部位別がん死亡数において大腸癌は男性では肺癌、胃癌に次ぎ第 3 位、女性では第 1 位である (1)。近年の手術手技の向上や従来抗がん剤のみならず新たな分子標的薬を含めた化学療法に進歩に伴い、大腸癌死亡率の増加は抑えられているものの、固形腫瘍の中では罹患率、死亡率いずれも上位を占めている。

遠隔転移を伴う切除不能大腸癌 (stage IV) はおよそ 20% であり、5 年生存率は約 19% とされている (2)。切除不能大腸癌および術後補助療法における化学療法は現在 5-FU を中心とした治療が第一選択とされているが、再発あるいは増悪時には 5-FU 抵抗性となることが多く (3)、新たな治療法の開発が望まれる。現在切除不能進行大腸癌において、National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ガイドラインによれば topoisomerase I 阻害剤である irinotecan は 5-FU やロイコボリンとの併用であるいは分子標的薬との併用で一次治療から三次治療まで幅広く用いられている (4)。

1-2) Microsatellite Instability (MSI) 陽性大腸癌について

ヒトゲノム DNA 中には 1-数塩基の単純な繰り返し配列 (マイクロサテライト) が数十万コピー以上存在することが知られている。腫瘍組織においてこれらマイクロサテライト反復配列が正常組織と異なる反復回数を示す場合、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) と呼ばれ、これらは

MLH1, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*などの DNA ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 遺伝子の異常により起こる (5)。MMR は DNA 複製時に生じたミスマッチを MutS (*MSH2* と *MSH3* の二量体、あるいは *MSH2* と *MSH6* の二量体) が認識し、MutL (*PMS2* と *MLH1* の二量体) とさらに 4 量体を形成してミスマッチ部位を除去、修復する (6) (図 1A)。MMR 異常の結果、様々な遺伝子の異常が積み重なり発癌に至る (図 1B)。MSI 陽性大腸癌の一部は MMR 遺伝子の生殖細胞系列変異が原因で生じる遺伝性非ポリポーシス大腸癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer: HNPCC または Lynch 症候群) であり全大腸癌の約 2-3%に認められる (7)。臨床的に認められる MSI 陽性大腸癌の多くは *MLH1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化により生じたエピジェネティック変異が原因であることが知られており、全大腸癌の約 15%に認められる (8) (図 1C)。MSI 陽性大腸癌では他の様々な遺伝子のフレームシフト変異を誘導する。例えば、*BAX* は p53 を介するアポトーシスと関連し、MSI 陽性癌の約 50%に変異がみられる (9, 10)。*TGFBR2* はがん抑制遺伝子で MSI 陽性癌の約 75%に変異がみられる (9)。*DSB* 修復に関わる *MRE11* あるいは *RAD50* にもフレームシフト変異が報告されており、それぞれ約 74-80%、30%とされている (11-15)。また、MSI 陽性大腸癌の他の特徴としては、細胞増殖に関わるがん遺伝子である *KRAS* 変異とは互いに排他的な関係にあるとの報告や、特にメチル化形質を持つ大腸癌には、細胞増殖に関わる *BRAF* 遺伝子の変異が多い (約 53%) との報告がある (16, 17)。一方 Lynch 症候群では *KRAS* の codon13 のグリシンからアスパラギン酸への変異 (G13D) 変異が多く、これらの患者は予後が良いと報告されている (18)。p53 は外的ストレスに対して細胞周期停止やアポトーシスなど様々な細胞内応答に関連するがん抑制遺伝子であり、大腸癌においては約半数に変異をもつと言われており、MSI 陽性大腸癌では p53 野生型が多いとされている (17)。以上のことから、MSI 陽性大腸癌は様々な特徴を有し一般の散発性大腸癌とは抗がん剤感受性が異なる可能性がある。薬剤感受性に関しては、MSI 陽性大腸癌は topoisomerase I 阻害剤に対し高感受性であるとの報告があ

る (19-22)。

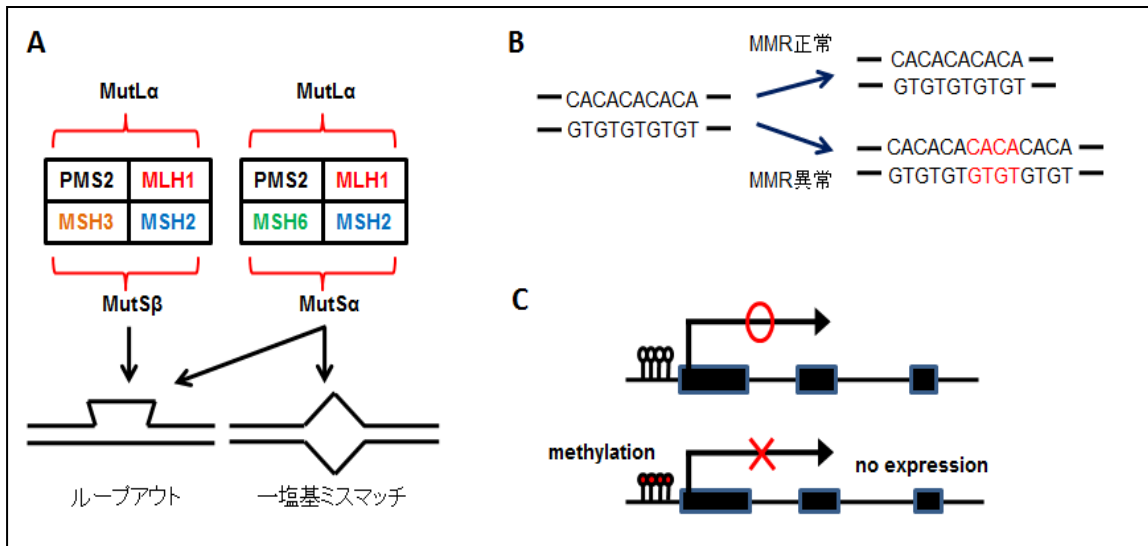


図 1. ミスマッチ修復タンパクの修復機能と遺伝子プロモーター領域のメチル化

A : ミスマッチ修復タンパクは MutS の 2 量体がミスマッチ部位を認識し、続いて MutL と 4 量体を形成し、ミスマッチを含む領域の DNA を除去する。B : ミスマッチ異常の結果、様々な遺伝子のフレームシフト変異が起こる。C : 遺伝子のプロモーター領域のメチル化により遺伝子発現の不活化が起こる。

1-3) Topoisomerase I 阻害剤の作用機構

Topoisomerase I 阻害剤である irinotecan は抗がん性植物アルカロイドのひとつで、本邦で開発された薬剤であり、生体内では carboxylesterase によって加水分解され、活性型代謝物である SN-38 (7-ethyl-10-hydroxy-camptothecine) に変換される (23, 24)。Topoisomerase I は通常、DNA 複製時や翻訳時に DNA - topoisomerase I 複合体を形成し、一本鎖 DNA の状態を作ることによって DNA 二重らせん構造を緩和させ、その後 DNA を再結合する。SN-38 は DNA - topoisomerase I 複合体を安定化させることで DNA 再結合を阻害し、最終的に二本鎖 DNA 切断 (double strand break : DSB) を引き起こし、細胞死へと誘導する (25) (図 2)。

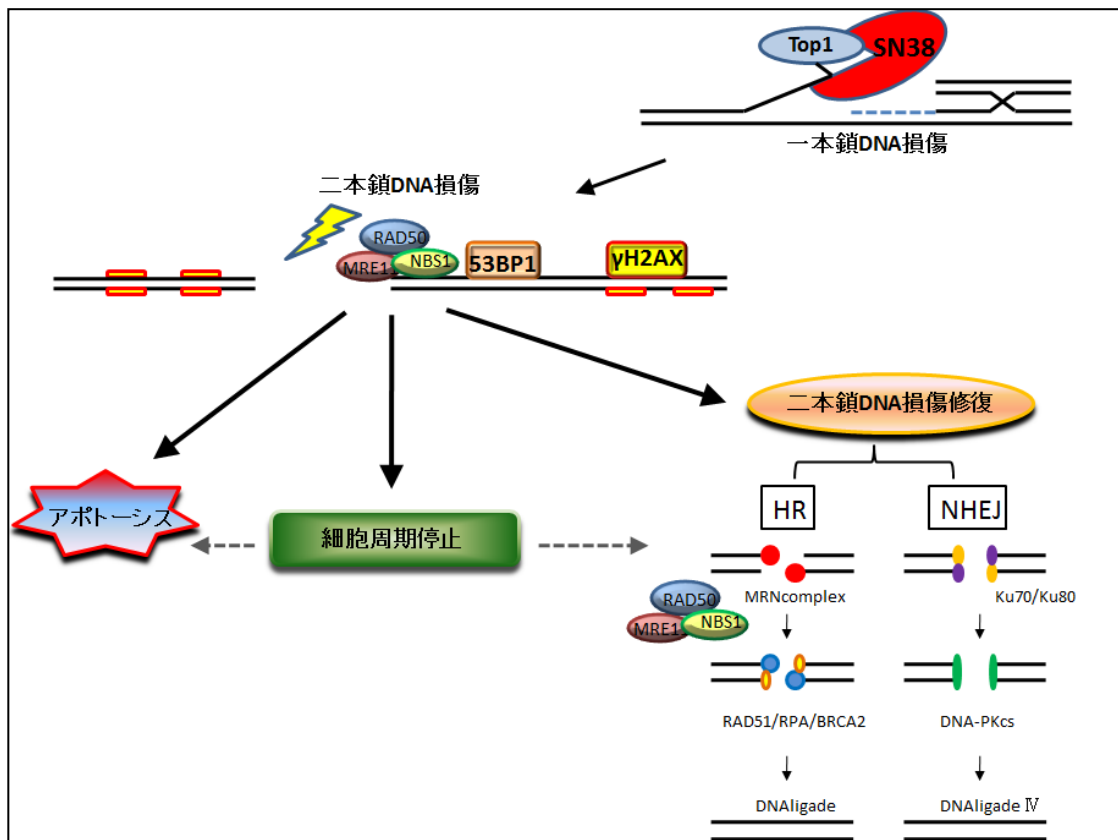


図 2. Topoisomerase I 阻害剤の作用と細胞内応答

Top I は遺伝子の転写や複製時に二本鎖 DNA の一方を切断して再結合させる役割を果たす。SN-38 は Top I -DNA 複合体を安定化することによって再結合を阻害し、最終的に二本鎖 DNA 損傷を引き起こす。DNA 損傷部位においてヒストン H2AX がリン酸化 (γH2AX) されると、引き続いて 53BP1 や Nbs1、BRCA1 などがリクルートされ、さらに他のシグナル分子を損傷部位に集積させる。DNA 損傷が認識されると、細胞内で細胞周期停止、修復、アポトーシス誘導などの様々な反応が起こる (HR : homologous recombination, NHEJ : non-homologous end-joining)。

1-4) Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤について

近年、がん治療において DNA 修復機構が新たな標的として注目を浴びている。poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) family は 17 種類 (PARP-1、PARP-2 等)

の分子が存在し、NAD を基質としてタンパク質に ADP-ribose 残基を鎖状に付加重合し poly(ADP-ribose) (PAR) を合成する翻訳後修飾を行う。PARP は一本鎖 DNA 損傷 (single strand break : SSB) を認識し、PAR を合成することでさらに他の修復タンパク (DNA ligase III、DNA polymerase β 、XRCC1 等) をリクルートし、塩基除去修復 (Base Excision Repair : BER) に関わるほか、細胞分化や遺伝子調節等に関わる (26-28)。PARP 阻害剤は主に PARP-1、PARP-2 を標的とし、特に DSB 修復機構に関わる BRCA1 や BRCA2 変異をもつ遺伝性乳がん卵巣がん症候群 (hereditary breast/ovarian cancer : HBOC) に対し合成致死性による DNA 損傷を与えることで有用性が示され、現在臨床試験が進行中である (29, 30) (図 3A)。

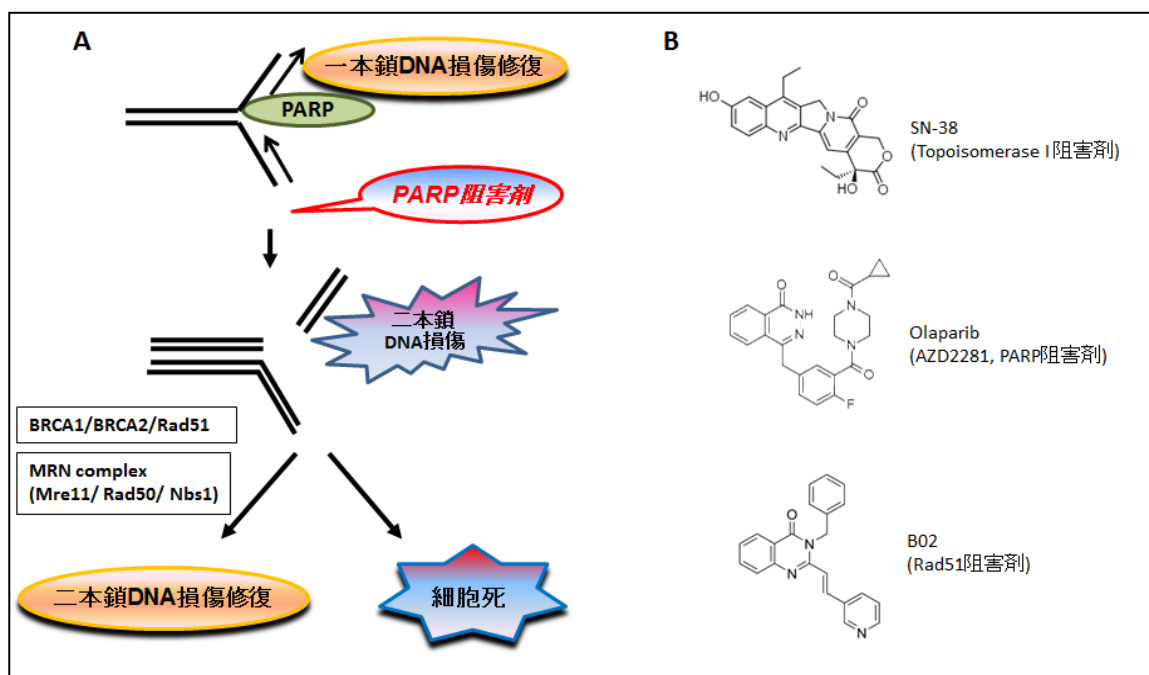


図 3. PARP 阻害剤の作用と使用薬剤の化学構造式

A : 一本鎖 DNA 損傷を修復する PARP の機能を阻害すると、二本鎖 DNA 損傷修復機構がもともと欠損した細胞では細胞死が誘導される。 B : SN-38、olaparib、B02 の化学構造式。

近年 PARP は DSB 修復機構である非相同末端再結合 (non-homologous

end-joining : NHEJ) や相同組み換え (homologous recombination : HR) との関連も報告されているが (31-33)、PARP の DSB 修復における役割はまだ解明されていない。PARP 阻害剤の一つである olaparib (AZD2281) は現在乳癌・卵巣癌において臨床第 II 相、第 III 相試験が行われている。

Topoisomerase I 阻害剤は前述のように最終的に DSB を引き起こすが、PARP 阻害剤を加えることで合成致死性と類似した機序により併用効果が期待され、これらの併用治療の有用性も報告されている (34-39)。しかしながら PARP 阻害剤が Topoisomerase I 阻害剤の感受性を増加させる作用機序は未だ明らかではなく、また、MMR 機構との関わりも知られていない。

1-5) DNA 損傷に対する細胞内応答

DNA 損傷に対する培養細胞株での細胞内応答は様々であり、この DNA 損傷応答の違いが薬剤感受性に影響を与えている。放射線や抗がん剤などの外的因子によって起こる細胞内の DNA 損傷に対し、ゲノム安定性を維持するためには迅速な DNA 損傷の認識と DSB 修復が効果的に行われることが必要である (図 2)。DSB 部位においては、ヒストンリン酸化 (γ H2AX) が広範囲に起こり、その後引き続き Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体や 53BP1、BRCA1 などの DNA 損傷応答タンパクを DSB 部位にリクルートする (40)。これらのタンパクの DSB 部位への集積は、蛍光抗体法による観察で核内の foci 形成として認められる。DNA 損傷を感知すると ataxia telangiectasia mutated (ATM) や ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) などの transducer タンパクを介し、様々な effector タンパクへとシグナル伝達され、細胞内において DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシスの誘導などが引き起こされる (図 2)。現在、二本鎖 DNA 損傷マーカーとして γ H2AX や 53BP1 タンパクが広く用いられている。

一本鎖 DNA 損傷 (SSB) 修復機構には MMR、BER、ヌクレオチド除去修復

(NER : Nucleotide Excision Repair) が挙げられる。さらに致死的なダメージとなる DSB の修復機構として、相同組み換え修復 (homologous recombination : HR) と非相同末端再結合 (non-homologous end joining : NHEJ) がある (図 2)。Mre11 と Rad50 は Nbs1 とともに MRN 複合体を形成し、ATM チェックポイントキナーゼを活性化し、DSB の sensor molecule として作用するが、一方 Rad51 や BRCA1/2 は HR に不可欠な分子である (41-46)。

1-6) 本研究の目的

大腸癌は前述のように MMR 異常などの分子生物学的な特徴が異なる細胞群が存在し、それに伴い抗がん剤感受性も異なる可能性がある。また現在の化学療法においては薬剤耐性や有害反応による治療継続困難などにより治療効果に限界があり、新たな治療法の開発が不可欠である。本研究では DNA 修復機構に着目し、MMR 異常をもつ大腸癌細胞株を用いて、これら細胞株の分子生物学的な特徴を明らかにするとともに、MMR 異常が SN-38 あるいは irinotecan と PARP 阻害剤の一つである olaparib との併用治療に与える影響を検討することを目的とした。また、作用機序を解明することにより、DNA 修復機構を標的とした新たな癌治療の可能性について検討した。

第2章 実験方法

2-1) 使用細胞株と薬剤

SN-38 と irinotecan (CPT-11) はそれぞれ Sigma-Aldrich (USA)、SANDOZ (東京)より購入した。Olaparib (AZD2281) は AstraZeneca 株式会社 (大阪) より供与頂いた。Rad51 阻害剤である B02 (47, 48) は Sigma-Aldrich より購入した (図 3B)。SN-38、olaparib、B02 は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して 10 mM とし、使用時まで - 20°C で保存した。Irinotecan は in vivo の実験で使

用時まで常温で保存した。

ヒト大腸癌細胞株 SW48、RKO、HCT116、HT29 は American Type Culture Collection (ATCC, USA) より購入した。LoVo はヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪) より購入した。C-1、SW1116、colo320HSR は国立がんセンターより供与頂いた。HCT-15 は東北大学加齢医学研究所より供与頂いた。いずれも 10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS) と 100 µg/ml のカナマイシン (Sigma) を加えた RPMI1640 培地 (Life Technologies Japan, 東京) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件下で培養し、3-7 日間ごとに継代を行った。

SW48 と RKO は *MLH1* のプロモーター領域のメチル化により発現が低下し、MSI を示す (49)。HCT116、LoVo と HCT-15 は MMR 遺伝子変異をもち、それぞれ *MLH1* (p.S252X)、*MSH2* (p.R359fsX8)、*MSH6* (p.L290fsX1, p.D1171fsX4) の変異をもつ (50)。

2-2) MSI 解析

細胞株より DNA 抽出を行う際は、フェノール・クロロホルム抽出法にて行った。MSI 解析には、国際的に用いられている Bethesda マーカーの中でも、感度・特異度の高い BAT25 (4 番染色体 遺伝子内の 1 塩基 (A) リピート) と BAT26 (2 番染色体 遺伝子内の 1 塩基 (A) リピート) を用いた (51)。これら特異的プライマーを用いて PCR を行った (52)。プライマーの配列を以下に示した。

BAT25 : Forward 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'

Reverse 5'-AACCATTCAACATTTTAAACC-3'

BAT26 : Forward 5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'

Reverse 5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'

PCR は 10x PCR buffer、1.25 mM dNTP、0.2 µmol/l プライマー、0.125 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Life Technologies Japan、東京) を含む 25 µl

の反応液により行われた。PCR 反応は 94°C12 分の後、94°C30 秒、58°C30 秒、74°C30 秒を 35 サイクル行った。その後 74°C7 分の伸長反応を行った。1 μ l の PCR 産物をホルマミドと ROX size standard を含む 12 μ l の loading buffer と混合し、95°C2 分変性させた。その後、ABI 310 PRISM sequencer (PerkinElmer Japan, 神奈川県) で泳動した。解析は GeneScan analysis software (PerkinElmer) にて行った。正常血液の DNA を control として用いた。

2-3) シークエンス解析

表 1. シークエンス解析に用いた PCR プライマー

Gene	Forward	Reverse
KRAS exon2	GACTGAATATAAACTTGTGG	CTATTGTTGGATCATATTCG
BRAF exon15	CTTTACTTACTACACCTCAG	TAACTCAGCAGCATCTCAGG
BAX exon3 (G)8	ATCCAGGATCGAGCAGGGCG	ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG
TGFBR2 exon4 (A)10	AAGCTCCCCTACCATGACT	TGCACTCATCAGAGCTACAG
MSH3 exon7 (A)8	CCAGCTATCTTCTGTGCATCTC	CATTTGTTCCCTCACCTGCAA
MSH6 exon5 (C)8	GGGTGATGGTCCTATGTGTC	CGTAATGCAAGGATGGCGT
MRE11 intron4 (T)11	AATATTTTGGAGGAGAATCTTAGGG	AATTGAAATGTTGAGGTTGCC
RAD50 exon13 (A)9	AACTGCGACTTGCTCCAGAT	CAAGTCCCAGCATTTCATCA

使用した細胞株の分子生物学的特徴を調べるために、主に MSI との関わりが報告されている癌関連遺伝子変異を調べた。*KRAS* の exon2、*BRAF* の exon15、また、MSI 陽性大腸癌でフレームシフト変異が報告されている遺伝子群 (*BAX*、*TGFBR2*、*MSH3*、*MSH6*、*MRE11*、*RAD50*) の特異的なプライマーを作成し (表 1)、細胞株より DNA 抽出を行い、PCR を行った。PCR は 10x PCR buffer、1.25 mM dNTP、0.5 μ M プライマー、0.125 U AmpliTaq Gold DNA polymerase を含む 25 μ l の反応液により行われた。PCR 反応は 95°C10 分の後、94°C30 秒、56°C30 秒、72°C1 分を 35 サイクル行った。その後 72°C10 分の伸長反応を行った。PCR 産物は Big-Dye Terminator v1.1 Sequencing Standard Kit (Life Technologies Japan) を用いて、3100 Genetic Analyzer (Life

Technologies Japan) によるダイレクトシーケンス法により解析した。

2-4) *In vitro* での細胞増殖アッセイ

a. [3H]-チミジン取り込みアッセイ

放射性物質であるトリチウム (3H) で標識したチミジンを細胞内に取り込ませ、シンチレーションカウンターで放射性物質を測定することで直接的に DNA 合成量を測定する方法である。96-well plate に $2-4 \times 10^3$ 個 / well の細胞を播種し、100 μ l の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、さらに 48 時間培養した。olaparib は SN-38 を添加する 1 時間前に添加した。48 時間後に well 内の細胞が 80-90% confluent になるようにした。48 時間培養の後、1%の[3H]-チミジンを含む培地を 100 μ l 添加した (1 μ Ci/well)。1 時間培養の後、培地を除去し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、10%TCA で氷上 10 分間固定した。上清を除去し、50 μ l NaOH を添加し 37°C で 10 分間インキュベートし細胞を溶解した。各 well あたり 30 μ l を 96-well luma plate (PerkinElmer) に移しかえて乾燥させ、TopCount NXT microplate scintillation counter (PerkinElmer) にて放射能 (CPM : count / minutes) を測定した。全ての測定は replicate (n = 6) で行い、独立して 3 回施行した。浮遊細胞である colo320HSR は本方法で測定できなかったため対象外とした。各 well の細胞生存率 (%コントロール) は以下の計算式を用いて算出した。

細胞生存率 (%コントロール) = (各 well の CPM - background) x 100 / (コントロール well の CPM - background)

細胞生存率を GraphPad Prism V5.0 software (GraphPad Software, Inc., USA) を用いて薬剂量-反応曲線 (dose-response curve) にて近似し、50% 細胞生存率を示す薬剂濃度を IC₅₀ 値として算出した。

b. セルカウントアッセイ

ハンディ型のセルカウンターである Scepter 2.0 cell counter (Merck Millipore, USA) はチップ内の電圧測定にて細胞数を計測するとともに細胞の大きさや体積も同時に測定可能である。我々は大腸癌細胞株に SN-38 を投与し、Scepter 2.0 cell counter により細胞数と同時に細胞径を測定することで、G2/M 期細胞周期停止やアポトーシスの変化を同時に解析できることを報告した (53)。

24-well plate に $1-3 \times 10^4$ 個 / well の細胞を播種し、500 μ l の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、さらに 48 時間培養した。その後、トリプシン-EDTA にて細胞を剥離し、一定量の培地で希釈した。各 well の細胞数および細胞径を Scepter 2.0 cell counter にて測定し、Scepter Software Pro 2.1 computer software (Merck Millipore) を用いて解析した。測定は triplicate で行った。

c. コロニー形成アッセイ

6-well plate に $1-2 \times 10^2$ 個 / well の細胞を播種し、2 ml の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、6、12、24、48 時間培養した。各時間培養した後、薬剤を除いた培地でさらに 7-10 日間培養し、コロニーを形成させた。コロニーは 0.25% クリスタルバイオレットを含むエタノールで染色し、細胞が 50 個以上のコロニーをカウントした。コントロール細胞のコロニー形成能に対する、薬剤添加細胞のコロニー形成能の比率を計算した。測定は triplicate で行った。

2-5) 細胞周期解析

IN Cell Analyzer 1000 (GE Healthcare, 東京) による細胞周期解析は

propidium iodide (PI) 染色により核の蛍光強度を測定し細胞周期を解析する方法である。過去に、大腸癌細胞株に SN-38 を投与した後、Scepter 2.0 cell counter により得られた細胞径のデータを、IN Cell Analyzer 1000 による細胞周期解析と比較検討し、細胞径の増加は G2/M 期細胞周期停止を反映することを報告した (53)。本研究では IN Cell Analyzer 1000 による細胞周期解析を行うとともに、Scepter 2.0 cell counter により細胞径測定を行い、G2/M 期細胞周期停止の代用マーカーとした。

IN Cell Analyzer 1000 による解析については、96-well plate に $2-4 \times 10^3$ 個 / well の細胞を播種し、100 μ l の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、さらに 48 時間培養した後、PBS で洗浄し、70% エタノールを添加し 4°C で 60 分間インキュベートし、細胞を固定した。次にエタノールを除去し、0.2% の Triton X-100、1 μ l の PI (BioVision, USA)、1 μ l の RNase A (Worthington Biochemical Co., USA) を含む 100 μ l の PBS を添加し、室温 60 分間インキュベートし核染色を行った。IN Cell Analyzer 1000 にてウェルごとに 9 視野のイメージをスキャンし、IN Cell Investigator software (GE Healthcare) にて PI の蛍光強度を測定した。

2-6) アポトーシス解析

細胞の早期アポトーシスの検出には、早期アポトーシス細胞膜内のホスファチジルセリンに結合する annexin V の染色を用いて行った。6-well plate に $5-10 \times 10^4$ 個 / well の細胞を播種し、2 ml の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、さらに 48 時間培養の後、トリプシン-EDTA で細胞を剥離した。 2×10^5 個の細胞を採取し、annexin V Apoptosis Detection kit (BioVision, USA) を用いてビオチン標識した annexin V を室温 5 分間の反応で結合させ、Cy5 標識 streptavidin (フナコシ株式会社、東京) と生細胞染色として用いた calcein-AM (Life Technologies Japan) を室温 10 分間の反応で染

色した。この後、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technology, USA) を用いて Apoptosis fast protocol にて早期アポトーシス解析を行った。

また、過去の報告で我々は大腸癌細胞株に SN-38 を投与した後、annexin V、calcein-AM、PI で染色し蛍光顕微鏡観察にてアポトーシスの解析を行い、Scepter 2.0 cell counter により得られた細胞径のデータと比較した。早期アポトーシス細胞は annexin V と calcein-AM により染色され、後期アポトーシス細胞は annexin V と PI により染色される。細胞径測定により得られた小細胞分画は後期アポトーシス細胞を反映することが確認された (53)。本研究では Agilent 2100 bioanalyzer による解析の他、Scepter 2.0 cell counter により細胞径測定を行い、小細胞分画をアポトーシスの代用マーカーとした。

2-7) 定量的 real-time RT-PCR

細胞株より RNA 抽出を行う際は、QuickGene SP kit RNA cultured cell HC (富士フィルム株式会社、東京) を使用し、プロトコールに従って行った。1 μ g の total RNA より PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis kit (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いて cDNA を作成した。使用した細胞株の DNA 修復に関わる遺伝子の発現量を検討した。QIAGEN 株式会社 (東京) より関連遺伝子の RT-PCR 用プライマーを購入した：PARP-1 (カタログ No. : QT00032690)、PARP-2 (QT00063525)、53BP1 (QT01886990)、RAD51 (QT00072688)、BRCA2 (QT00008449)、MRE11 (QT00037926)、RAD50 (QT00037170)、NBN (QT00075775)。TOP1 と β -actin においては以下に示す特異的プライマーを作成した。

TOP1 : Forward 5'-TCCGGAACCAGTATCGAGAAGA-3'

Reverse 5'-CCTCCTTTTCATTGCCTGCTC-3'

β -actin : Forward 5'-GGCACCCAGCACAAATGAAGATCAAGAT-3'

Reverse 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGAT-3'

LightCycler 480 system (Roche Applied Science, USA) と Syber Green Master Mix (タカラバイオ株式会社) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は 95°C15 分の後、94°C15 秒、55°C30 秒、72°C30 秒を 40 サイクル行った。定量は $\Delta\Delta$ CT 法を用いて行い、 β -actin を内在性コントロールとした。

2-8) Western blot 法

目的の細胞を 100 mm ディッシュに播種し、10 ml の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、さらに 24 時間培養した。治療後、培地を除去して PBS で洗浄し、Protease inhibitor cocktail (Sigma) を添加した RIPA buffer (Sigma) を用いて溶解した。溶解液を 4°C、8000g で 10 分間遠心し、上清を、解析を行うまでに -80°C で保存した。DC プロテインアッセイキット II (Bio-Rad, USA) を用いて Lowry 法に基づく比色定量法を使用し、タンパク質定量を行った。BECKMAN COUNTER と DU7500 spectrophotometer を使用して吸光度を測定し、サンプルのタンパク定量を行った。10-20 μ g のタンパクを 10% アクリルアミドゲル (READY GELS J, Bio-Rad Laboratories) で電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。1% カゼインを用いて 1 時間ブロッキングした後、0.1% の Tween-20 を含む Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) で溶解した一次抗体を用いて 4°C で一晩インキュベートした。二次抗体は HRP 標識抗マウスあるいは抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz, USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。検出は ECL Prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare Japan) を用いて行った。

使用した一次抗体は以下の通りである：マウスモノクローナル抗 PAR (10H) 抗体 (GeneTex, USA)、マウスモノクローナル抗 PARP-1 抗体 (Santa Cruz)、マウスモノクローナル抗 PARP-2 抗体 (Merck Millipore)、ウサギポリクローナル抗 Mre11 抗体 (Cell Signaling Technology, USA)、マウスモノクローナル抗 Rad50 抗体 (GeneTex)、ウサギポリクローナル抗 Nbs1 抗体 (Novus Biologicals,

USA)、ウサギポリクローナル抗 Rad51 抗体 (Santa Cruz)。マウスモノクローナル抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz) を内在性コントロールとした。

2-9) 蛍光抗体二重染色法

目的の細胞をポリリジンコーティングされた chamber slide に播種し、1 ml の培地で 24 時間培養した。その後各濃度の SN-38 または olaparib を添加し、一定時間 (6-48 時間) 培養した。その後、培地を除去し PBS で洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド (PFA) にて 4°C で 20 分間固定した。Rad51 染色に関しては固定前に cytoskeleton buffer (10 mM PIPES (pH: 6.8), 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% Triton-X 100) にて 4°C、5 分間の透過処理を行った。BrdU 染色の場合は、固定前に BrdU 10 μ M / well を添加し、37°C で 1 時間培養し、PBS 洗浄後、0.5% TritonX-100 にて室温で 15 分間反応させた。BrdU 染色の場合はブロッキングの前に 1 規定 塩酸にて 4°C で 10 分間、2 規定 塩酸にて室温 10 分間、2 規定 塩酸にて 37°C 20 分間の DNA 変性処理を行い、その後 0.1 M ホウ酸バッファにて室温 12 分で中和を行った。PBS 洗浄後、2-5% の正常ヤギ血清にて室温で 30-60 分間ブロックした。一次抗体を室温 1 時間で反応させた。PBS 洗浄後、1000 倍希釈の DAPI を含む二次抗体 : Alexa Fluor 647 標識抗マウス IgG 抗体 (Life Technologies Japan)、Alexa Fluor 488 標識抗ラビット IgG 抗体 (Life Technologies Japan) (いずれも 250 倍希釈) を用いて、室温で 30 分間反応させた。PBS 洗浄後スライドを Fluoromount Plus (Cosmo Bio, 東京) にて封入した。蛍光顕微鏡観察には BIOREVO BZ9000 (Keyence, 大阪) を用いた。画像データは BZ-II Analyzer 1.10 Software (Keyence) を用いて記録、解析した。細胞核の観察には少なくとも 4 視野、100-200 個の核の観察を行った。BrdU 染色細胞のカウントには少なくとも 6 視野、200-1300 個の細胞を観察した。

使用した一次抗体は以下の通りである : ウサギポリクローナル抗 53BP1 抗体

(Abcam, UK)、ウサギポリクローナル抗 Rad51 抗体 (Santa Cruz)、マウスモノクローナル抗 γ H2AX 抗体 (Merck Millipore)、マウスモノクローナル抗 BrdU 抗体 (Sigma-Aldrich)。

2-10) siRNA を用いた蛋白発現の抑制

Mre11、Rad50、Rad51 のタンパク発現を RNA 干渉により抑制するために、ターゲットに対する siRNA (small interfering RNA) と、タンパク発現を抑制しないネガティブコントロール siRNA を Life Technologies Japan より購入した。購入した siRNA は以下の通りである：Silencer Select siRNA ; Mre11 (カタログ No. : 4390824 s8960)、Rad50 (4390824 s792)、Rad51 (4392420 s11734)、ネガティブコントロール (AM4613)。HCT116 細胞株に対しては購入したネガティブコントロール siRNA により細胞毒性がみられたため、Silencer siRNA construction Kit (Life Technologies Japan) を用いてネガティブコントロール siRNA を作成した。Rad51 に対する siRNA の交錯配列をもとに以下のように作成した。

Forward 5'-ACGTATGGATCTAAGATGGtt -3'

Reverse 5'-CCATCTCGATCCATACGTat-3'

24-well plate に $1-3 \times 10^4$ 個 / well の細胞を播種し、500 μ l の培地で 24 時間培養した。その後 Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (Life Technologies Japan) を用いて 10 nM の siRNA をプロトコールに従い細胞内に導入した。さらに 24 時間後に培地を交換し、各濃度の SN-38 または olaparib を添加し 48 時間培養した。その後細胞をトリプシン-EDTA にて剥離しセルカウントアッセイを行った。Western blot 解析においては 100 mm ディッシュにて培養し、siRNA 導入後 24 時間で細胞を剥離し解析を行った。

2-11) *In vivo* での腫瘍増殖抑制効果の分析

5 週齢の SCID Hairless Outbred (SHO™) マウス (Crl:SHO-Prkdc^{scid}Hr^{hr}) (Charles River Japan, 横浜) の皮下に 5×10^6 個の HT29 あるいは SW1116 細胞を注射し腫瘍移植片モデルを作成した。腫瘍体積が 100 mm^3 に達したところでマウスを以下のように無作為に 4 群に割り付けた：コントロール群、olaparib 単独治療群、irinotecan 単独治療群、olaparib と irinotecan の併用治療群。治療開始を day 0 とした。olaparib (50 mg / kg) は 9%β-シクロデキストリンにて溶解し (54)、経口投与で 5 日間投与 (day0-4)、2 日間休薬 (day5-6) を繰り返した。Irinotecan (10 mg / kg) は腹腔内投与で週 2 回投与 (day0、day3) を繰り返した。併用治療においては irinotecan 投与の 1 時間前に olaparib を投与した。腫瘍の長径：a(mm) と短径：b (mm) を週 3 回測定し、腫瘍体積 (tumor volume : TV) を以下の式にて算出した： $TV = (a \times b^2) / 2 (\text{mm}^3)$ 。同時に週 3 回体重測定を行った。相対腫瘍体積 (relative tumor volume : RTV) は day 0 に対する day X の体積とした。SW1116 の移植マウスにおいては day 30 で血液を採取し、SRL (東京) に依頼して血液サンプルの解析を行った。

2-12) 統計学的解析

In vitro で得られたデータは平均 ± 標準偏差 (SD) で表示した。*In vivo* で得られたデータは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表示した。2 群間の差の検定には Student's t-test を用いた。4 群間の差の検定には analysis of variance (ANOVA) 分散分析を用いて、 $P < 0.05$ の場合に各群の比較には Tukey's test あるいは Tukey-Kramer method を用いた。 $P < 0.05$ を有意とみなした。統計学的解析は全て GraphPad Prism V5.0 software を用いて行った。

第3章 実験結果

3-1) ヒト大腸癌細胞株における MSI 解析と遺伝子異常

本研究で使用したヒト大腸癌細胞株の分子生物学的特徴を調べるため、まず MSI 解析を行った (図 4)。SW48、RKO、HCT116、LoVo、HCT-15 の 5 種類の細胞株はいずれも BAT25、BAT26 にフレームシフト変異を認めた。但し、LoVo は *MSH2* 遺伝子変異をもつため、*MSH2* 遺伝子内のリピート配列を検出するマーカーである BAT26 は検出されなかった。

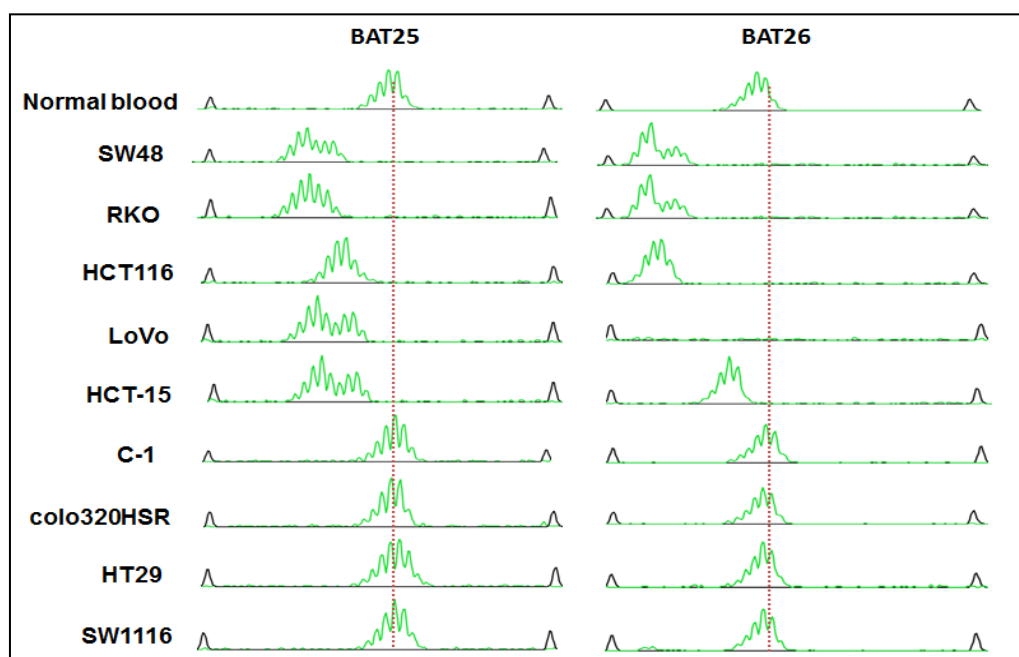


図 4. MSI 解析

SW48、RKO、HCT116、LoVo、HCT-15 において MSI が認められた。

MSI 陽性癌において報告されている遺伝子のフレームシフト変異をシーケンス法により解析した (図 5、表 2)。*BAX* は HCT116 と LoVo で変異がみられた。*TGFBR2* は MSI 陽性株すべてにおいて変異がみられた。*MLH1* 異常株である SW48、RKO、HCT116 において、MutS の構成成分である *MSH3* または *MSH6* において変異が確認された。さらに、MSI 陽性株において、DSB 修復に

関わる因子である *MRE11* の両アレルまたは片アレルのフレームシフト変異を認めた。RKO、HCT116、LoVo の 3 株で *RAD50* に片アレルのフレームシフト変異を認めた。

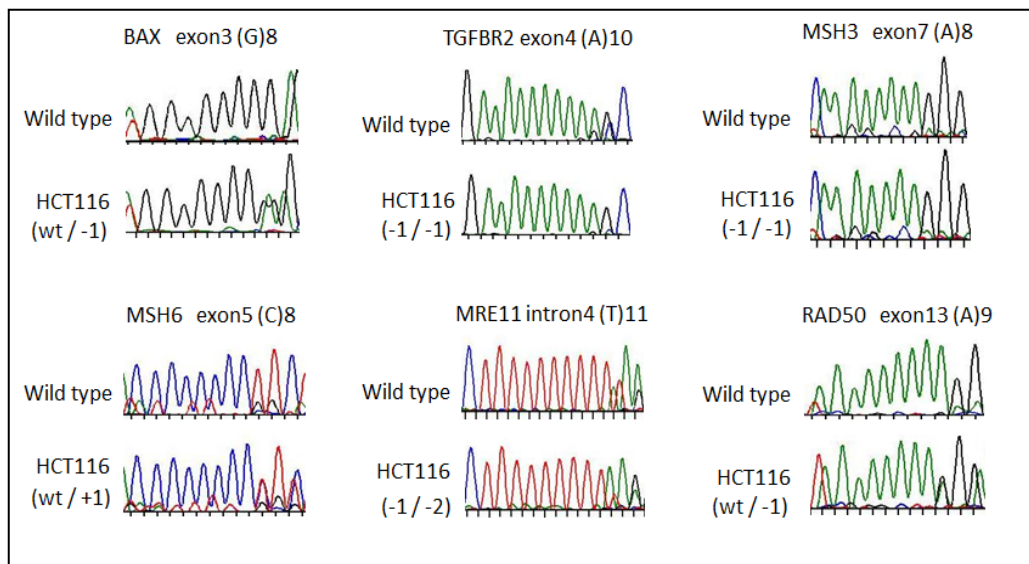


図 5. シークエンス法による frameshift 変異解析

HCT116 細胞株の DNA を用いて各遺伝子 (*BAX*、*TGFBR2*、*MSH3*、*MSH6*、*MRE11*、*RAD50*) のモノヌクレオチドリピート配列をシークエンス法にて調べた。HCT116 はいずれもリピート配列の異常がみられた。

表 2. 大腸癌細胞株における MMR 異常と各遺伝子の frame shift 変異

cell line	doubling time (h)	MSI	MMR gene status	BAX exon3 (G)8	TGFBR2 exon4 (A)10	MSH3 exon7 (A)8	MSH6 exon5 (C)8	MRE11 intron4 (T)11	RAD50 exon13 (A)9
SW48	35	MSI-H*	MLH1 methylation	wt***	-1 / -2	wt	wt / +1	-1 / -1	wt
RKO	18	MSI-H	MLH1 methylation	wt	wt / -2	-1 / -1	wt	-1 / -2 / -3	wt / -1
HCT116	14	MSI-H	MLH1(-/-)	wt / -1	-1 / -1	-1 / -1	wt / +1	-1 / -2	wt / -1
LoVo	24	MSI-H	MSH2(-/-)	+1 / -1	-1 / -2	wt	wt	-1 / -1	wt / -1
HCT-15	20	MSI-H	MSH6(-/-)	wt	wt / -1	wt	wt	-2 / wt	wt
C-1	36	MSS**		wt	wt	wt	wt	wt	wt
colo320 HSR	22	MSS		wt	wt	wt	wt	wt	wt
HT29	24	MSS		wt	wt	wt	wt	wt	wt
SW1116	24	MSS		wt	wt	wt	wt	wt	wt

*: microsatellite instability-high, **: microsatellite stable, ***: wt: wild-type

BRAF と *KRAS* の遺伝子変異をシークエンス法にて解析した (表 3)。MSI

陽性癌である RKO と microsatellite stable (MSS)である HT29 に *BRAF* の codon600 のバリンからグルタミン酸への変異 (V600E) がみられた。HCT116、LoVo、HCT-15 においては *KRAS* の codon13 のグリシンからアスパラギン酸への変異 (G13D) がみられた。IARC TP53 database により *TP53* 変異を調べた (55) (表 3)。C-1 に関しては我々の研究室にて以前 *TP53* 変異を解析し、野生型であることを確認している。MSI 陽性細胞株の中では HCT-15 のみが *TP53* 変異型であった。

表 3. 大腸癌細胞株における遺伝子変異

cell line	KRAS exon2		BRAF exon15		TP53***	
	status	mutational type	status	mutational type	status	mutational type
SW48	wt*		wt		wt	
RKO	wt		mut	c.1799T>A, p.V600E	wt	
HCT116	mut**	c.38G>A, p.G13D	wt		wt	
LoVo	mut	c.38G>A, p.G13D	wt		wt	
HCT-15	mut	c.38G>A, p.G13D	wt		mut	c.1101-2A>C (hetero) substitution intronic , c.722C>T (hetero), p.S241F
C-1	mut	c.35G>T, p.G12V	wt		wt	
colo320HSR	wt		wt		mut	c.742C>T (homo), p.R248W
HT29	wt		mut	c.1799T>A, p.V600E	mut	c.818G>A (homo), p.273H
SW1116	mut	c.35G>C, p.G12A	wt		mut	c.476C>A (homo), p.A159D

*: wild-type, **: mutant-type, ***: IARC TP53 database

3-2) DNA 修復関連分子の発現解析

使用細胞株 9 種類における *TOP1* と DNA 修復関連遺伝子 (*PARP1*, *PARP2*, *TP53BP1*, *MRE11*, *RAD50*, *NBN*, *RAD51*, *BRCA2*) の mRNA 発現を定量的 real-time RT-PCR 法により解析した (図 6)。*TOP1*, *PARP1*, *PARP2*, *RAD51*, *BRCA2* においては正常血液細胞より癌細胞株において mRNA 発現が高い傾向にあった。

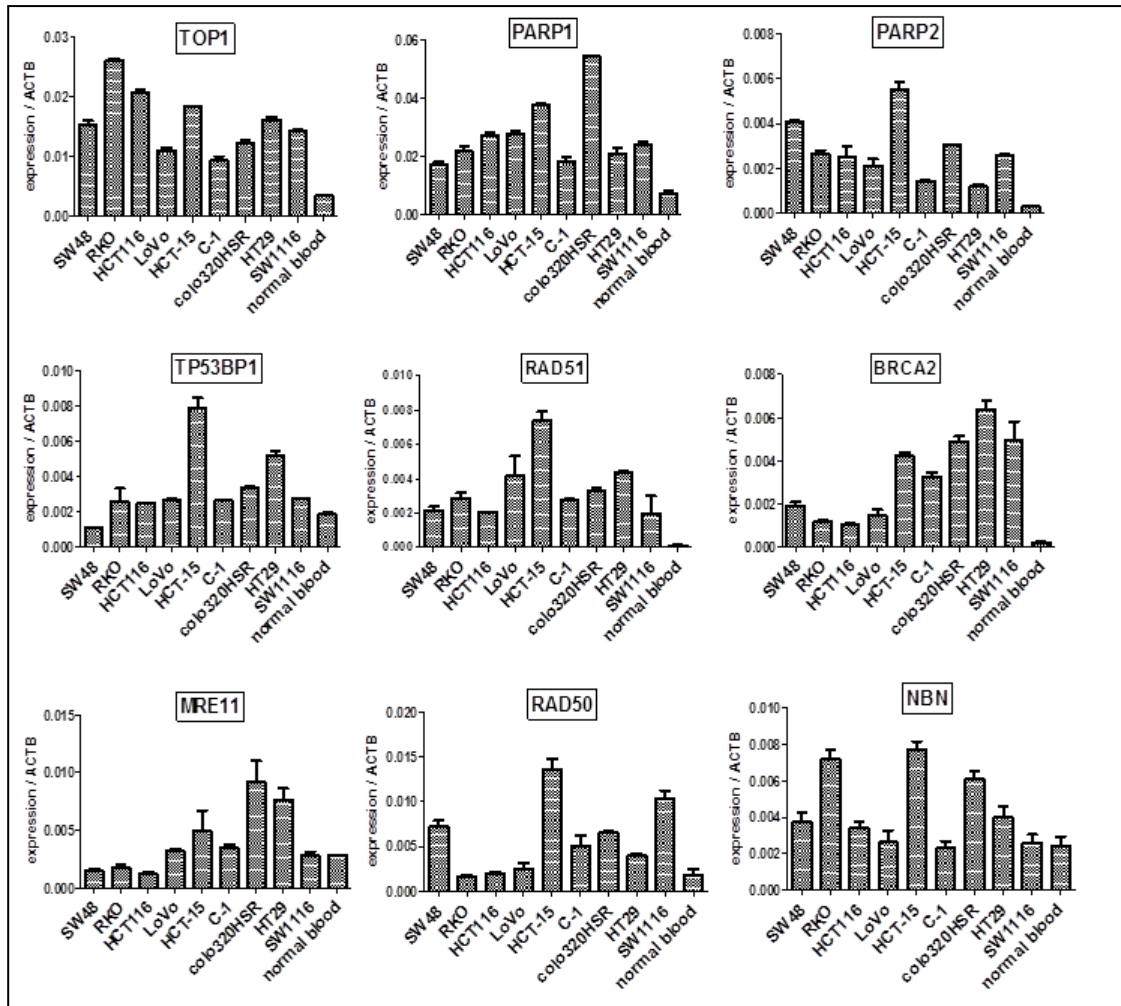


図 6. 大腸癌細胞株における TOP1 と DNA 修復関連遺伝子の mRNA 発現

大腸癌細胞株 9 種における TOP1 と DNA 修復関連遺伝子の mRNA 発現を定量的 real-time RT-PCR 法により解析した。測定値は triplicate の平均±SD にて表示した。内在性コントロールには β -actin を用いた。

また、DNA 修復関連遺伝子のタンパク発現を Western blot 法により解析した (図 7)。MRE11 の両アレルあるいは RAD50 の片アレルにおけるフレームシフト

ト変異のある細胞株では mRNA 発現とタンパク発現ともに低い傾向にあった。

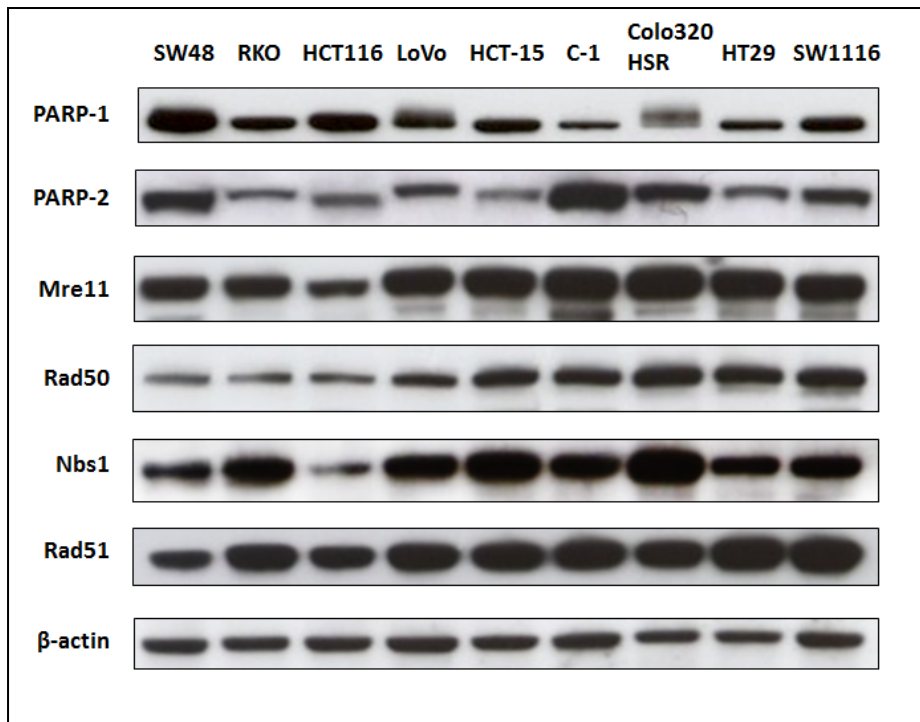


図 7. 大腸癌細胞株における DNA 修復関連分子のタンパク発現

大腸癌細胞株 9 種における DNA 修復関連分子のタンパク発現を Western blot 法により解析した。内在性コントロールには β -actin を用いた。

3-3) ヒト大腸癌細胞株における PARP 阻害剤 (olaparib : AZD2281) の効果

Olaparib の効果を評価するために、まず olaparib 単剤における細胞増殖抑制効果を $[3H]$ -チミジン取り込みアッセイにより調べた (図 8A)。olaparib 単剤の IC_{50} 値を比較すると、HCT116 が最も感受性が高く IC_{50} 値は $2.5 \mu M$ であり、SW1116 が最も感受性が低く、 IC_{50} 値は $100 \mu M$ 以上であった。次に、HCT116 細胞株を用いて、olaparib による PAR 合成抑制効果を調べるため、SN-38 または oplaparib 投与後の PAR、PARP-1、PARP-2 のタンパク発現を Western blot 法により調べた (図 8B)。HCT116 に $1 nM$ の SN-38 を投与すると PAR 合成が増加した。これに各濃度の olaparib を併用すると、濃度依存性に SN-38 による

PAR 合成が阻害され、特に 10 nM 以上の濃度の olaparib で PAR 合成抑制効果が著明であった。一方、PARP-1 や PARP-2 の発現レベルは不変であった。

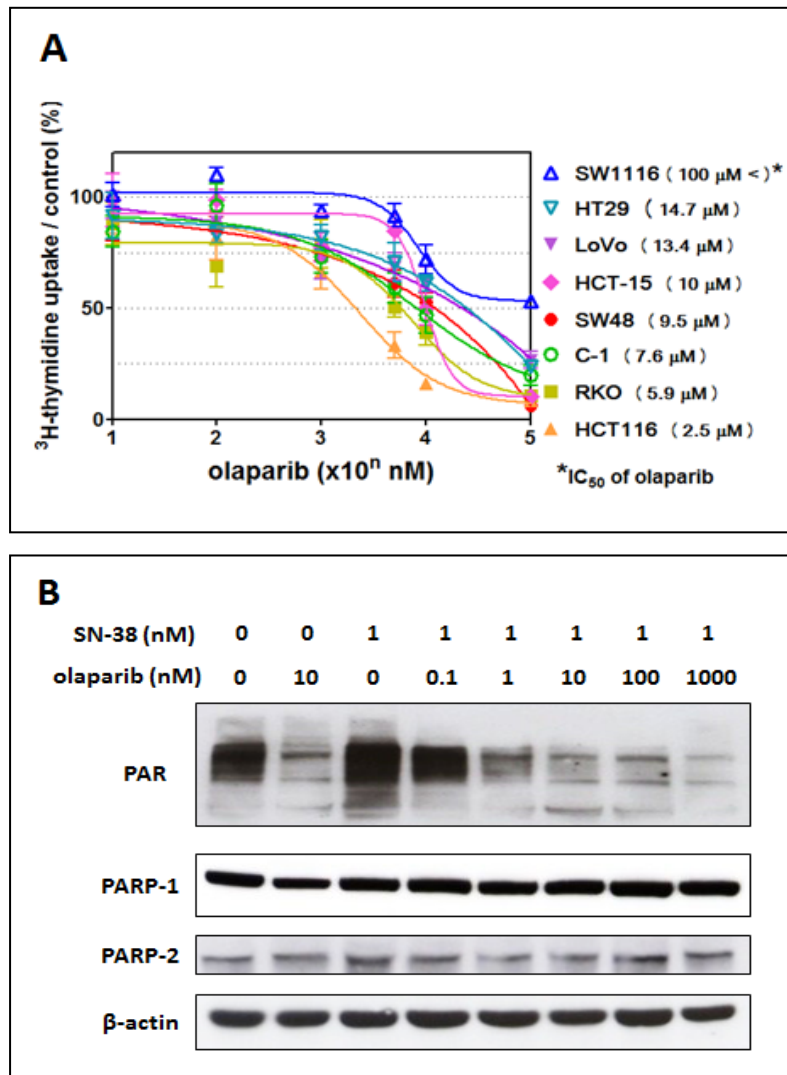


図 8. 大腸癌細胞株における olaparib の細胞増殖抑制効果と PAR 合成阻害効果

A : 大腸癌細胞株 9 種において olaparib を 48 時間持続接触させ、細胞増殖抑制曲線を $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイにより解析し IC₅₀ 値を測定した。測定は n = 6 で行い、独立して 3 回施行し、平均 \pm SD にて表示した。B : HCT116 細胞株を用い、1 nM の SN-38 または各濃度の olaparib を 24 時間持続接触させ、PAR、PARP-1、PARP-2 のタンパク発現を Western blot 法により解析した。内在性コントロールには β -actin を用いた。

次に、MMR 異常をもつ HCT116 と MMR 正常である HT29 (それぞれ SN-38 に対する感受性が異なる(19, 22, 53)) の二つの細胞株を用いて、各濃度の olaparib による SN-38 の感受性変化を、 $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイを用いて検討した (図 9)。HCT116 において、0.5 nM あるいは 1 nM の SN-38 による細胞増殖抑制効果は、10 nM 以上の olaparib を併用することにより有意に増強した ($P < 0.01$)。また、HT29 においても同様に、2.5 nM あるいは 5 nM の SN-38 による細胞増殖抑制効果は、10 nM 以上の olaparib を併用することにより有意に増強した ($P < 0.0001$)。10 nM の olaparib は細胞に対する増殖抑制が見られない一方で、PAR 合成を抑制し、SN-38 感受性増強効果が有意に得られることが確認された。以上の結果より、以後の実験では 10 nM の olaparib を用いることとした。

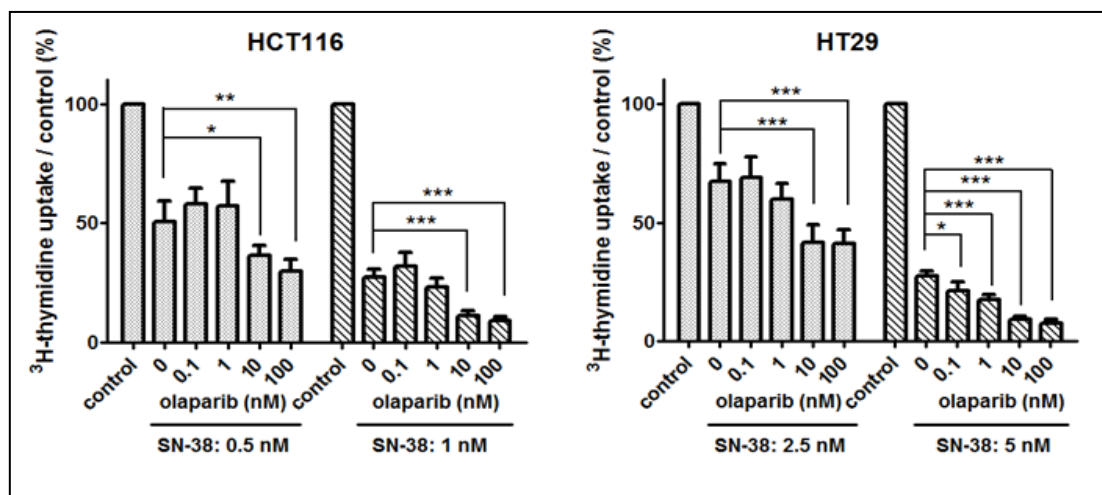


図 9. olaparib の SN-38 感受性増強効果の検討

HCT116 細胞株と HT29 細胞株において、各濃度の SN-38 および olaparib を 48 時間持続接触させ、細胞増殖抑制効果を $[^3\text{H}]$ -チミジン取り込みアッセイにより調べた。測定値は $n = 6$ の平均 \pm SD にて表示した。SN-38 単剤と、SN-38+olaparib の併用の 2 群間の比較は Student's t-test により解析した (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$)。

3-4) ヒト大腸癌細胞株における SN-38 と olaparib の併用効果

a. 細胞増殖抑制効果

Olaparib の SN-38 感受性増強効果が MMR 異常の違いに関わるかどうかを調べるため、MMR の状態が異なる大腸癌細胞株を用いて各種の細胞増殖アッセイにて SN-38 と olaparib の併用効果を検討した。まず各細胞株に SN-38 または olaparib を 48 時間持続接触させ、 $[3H]$ -チミジン取り込みアッセイにより SN-38 の IC_{50} 値を算出した。10 nM の olaparib の併用の有無により SN-38 の IC_{50} 値を比較した (図 10)。HCT-15 以外の細胞株で olaparib は SN-38 の IC_{50} 値をおよそ半分に有意に低下させた。

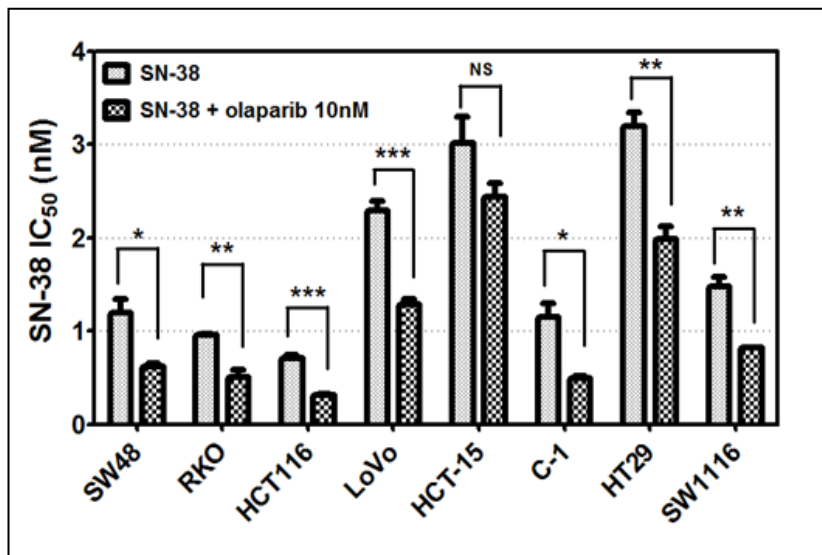
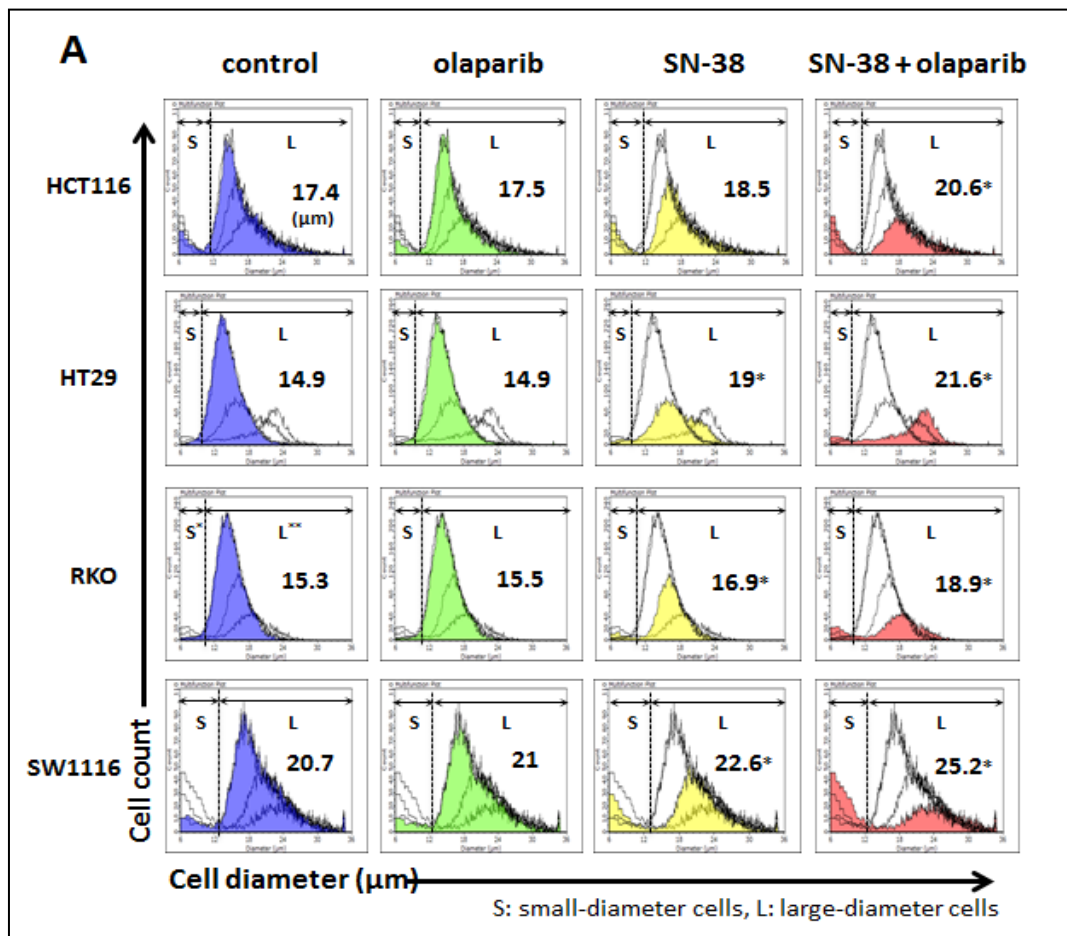


図 10. olaparib の有無による SN-38 の IC_{50} 値の比較

大腸癌細胞株 8 種において SN-38 単剤、あるいは 10 nM の olaparib を併用した時の SN-38 の IC_{50} 値を $[3H]$ -チミジン取り込みアッセイにより測定した。測定は独立して 3 回施行し、平均 \pm SD にて表示した。各細胞株において、SN-38 単剤と、SN-38+olaparib の併用の 2 群間の比較は Student's t-test により解析した (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; NS, not significant)。

b. 細胞周期およびアポトーシス解析

次に MMR の状態が異なる 4 つの細胞株 (HCT116、HT29、RKO、SW1116) を用いて、SN-38 または olaparib を 48 時間持続接触させ、Scepter 2.0 cell counter にてセルカウントと細胞径測定を行った (図 11)。



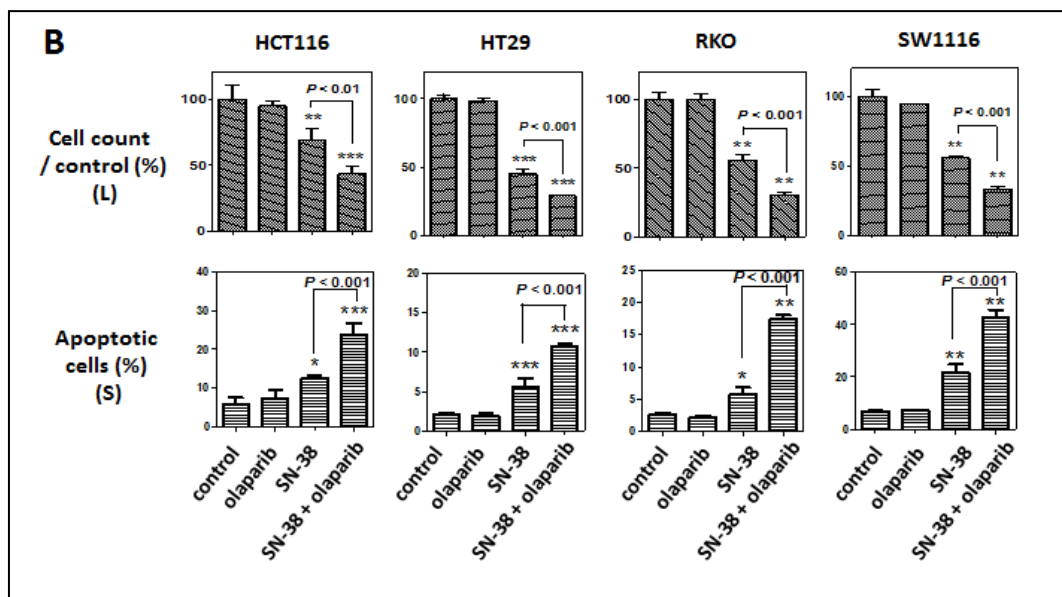


図 11. SN-38 および olaparib 投与後の細胞数計測および細胞径測定

A : 4 種類の細胞株を用いて SN-38 または olaparib 投与後、Scepter 2.0 cell counter にてセルカウントと細胞径測定を行った。SN-38 濃度は IC₅₀ 値をもとに HCT116、RKO、SW1116 については 1 nM、HT29 については 4 nM とした。グラフ内の数値は large-diameter cells の平均細胞径 (μm) (n = 3)を示す。いずれの細胞株においても one-way ANOVA で $P < 0.0001$ であり、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.001$)。B : セルカウントは large-diameter cells を計測し、アポトーシス細胞は small-diameter cells の全細胞数に対する割合で示した。測定値は n = 3 の平均 ± SD にて表示した。いずれも one-way ANOVA で $P < 0.0001$ であり、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

SN-38 の投与濃度はそれぞれの細胞株の IC₅₀ 値をもとに HCT116、RKO、SW1116 については 1 nM、HT29 については 4 nM とした。セルカウントアッセイにより測定された SN-38 の細胞増殖抑制効果は、DNA 合成量を直接反映する [3H]-チミジン取り込みアッセイにより測定された細胞増殖抑制効果よりも見かけ上低い。これは SN-38 により細胞周期停止を起こした細胞はセルカウントではカウントされるのに対し、[3H]-チミジン取り込みアッセイではカウ

ントされないためであると考えられる (53)。Scepter 2.0 cell counter による測定の結果、いずれの細胞株においても olaparib は SN-38 による細胞増殖抑制効果をさらに増強させた (SN-38 vs. SN-38 + olaparib : HCT116, $P < 0.05$; HT29, RKO, SW1116, $P < 0.001$)。また、olaparib は細胞集団 (large-diameter cells) の平均細胞径を増加させ (SN-38 vs. SN-38 + olaparib : HCT116, $P < 0.01$; HT29, RKO, SW1116, $P < 0.001$)、相対的な小細胞分画 (small-diameter cells) を増加させた (SN-38 vs. SN-38 + olaparib : 各細胞株とも $P < 0.001$) (図 11)。MMR 異常の有無に関わらず、olaparib は G2/M 期細胞周期停止とアポトーシスを誘導し、SN-38 感受性を増強させることが示唆された。

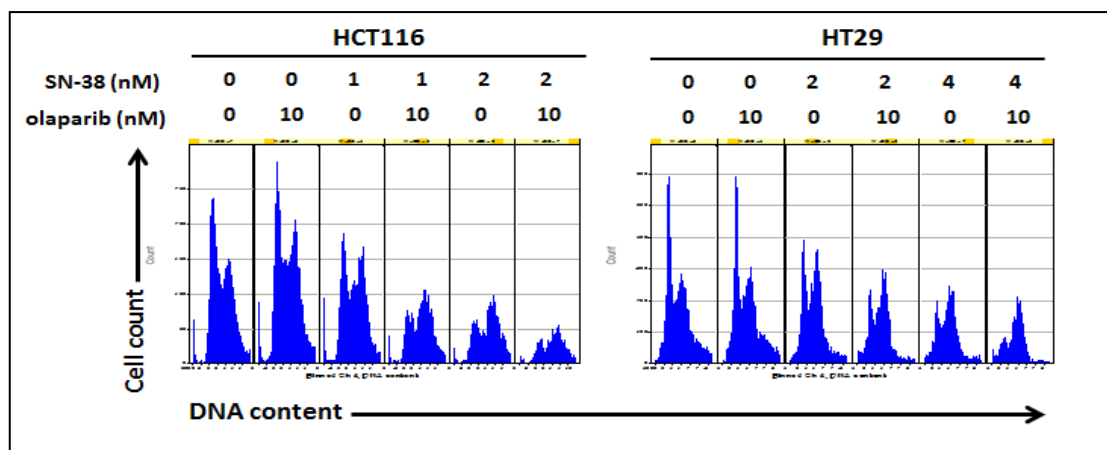


図 12. SN-38 および olaparib 投与後の細胞周期解析

HCT116 細胞株と HT29 細胞株を用いて各濃度の SN-38 または olaparib 投与後、In Cell Analyzer 1000 による細胞周期解析を行った。

さらに、IN Cell Analyzer 1000 による細胞周期解析と Agilent 2100 bioanalyzer による早期アポトーシス解析を行った (図 12、13)。細胞周期解析では HCT116 と HT29 において、olaparib は SN-38 による G2/M 期細胞周期停止をさらに誘導し、また、olaparib は SN-38 を 2 倍濃度添加した場合と同

等の効果をもたらした (図 12)。アポトーシス解析ではいずれの細胞株においても olaparib は SN-38 との併用により早期アポトーシス細胞の増加をもたらし、特に RKO と SW1116 においては著明なアポトーシスの増加を認めた (図 13)。しかしながら、olaparib 単独ではセルカウントのみならず、細胞周期やアポトーシスにも変化がみられなかった。

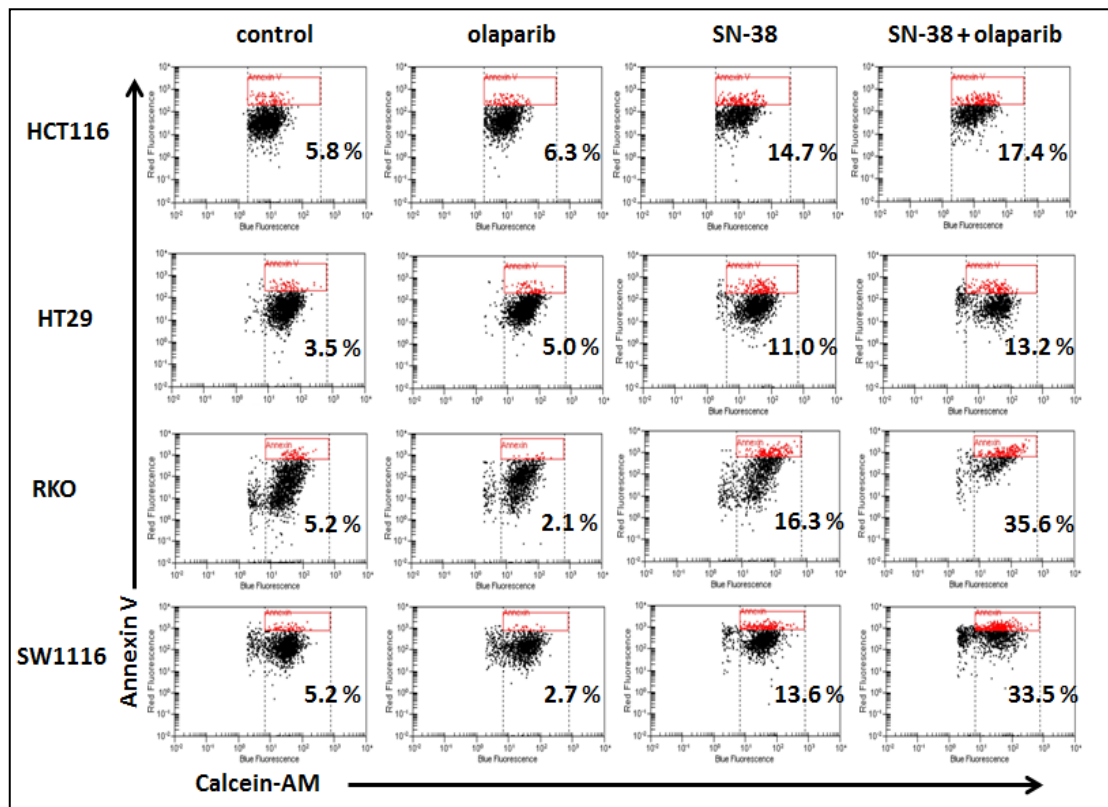


図 13. SN-38 および olaparib 投与後の早期アポトーシス解析

4 種類の細胞株を用いて SN-38 および olaparib 投与後、Agilent 2100 bioanalyzer にて早期アポトーシス解析を行った。SN-38 濃度は HCT116、RKO、SW1116 については 1 nM、HT29 については 4 nM とした。数値は annexinV と calcein-AM により染色される早期アポトーシス細胞の割合を示した。

c. コロニー形成アッセイ

本研究にて使用した大腸癌細胞株の doubling time (1回の細胞分裂にかかる時間) は 14-36 時間と異なる (表 2)。薬剤の接触時間が治療効果に与える影響を検討するために、MMR の状態および doubling time が異なる 2 つの細胞株 (HCT116、HT29) を用いて、SN-38 または olaparib を各時間 (6、12、24、48 時間) で持続接触させ、コロニー形成アッセイを行った (図 14)。

いずれの細胞株においても、12 時間以上の持続接触により olaparib と SN-38 の併用群ではコントロールと比較しコロニー形成能を有意に抑制した。さらに 24 時間以上の持続接触では SN-38 単剤においてもコロニー形成能を有意に抑制したが、olaparib は SN-38 によるコロニー形成抑制率をさらに低下させた (SN-38 vs. SN-38 + olaparib : HCT116, $P < 0.05$ (24h), $P < 0.01$ (48h); HT29, $P < 0.05$ (24h), $P < 0.001$ (48h))。

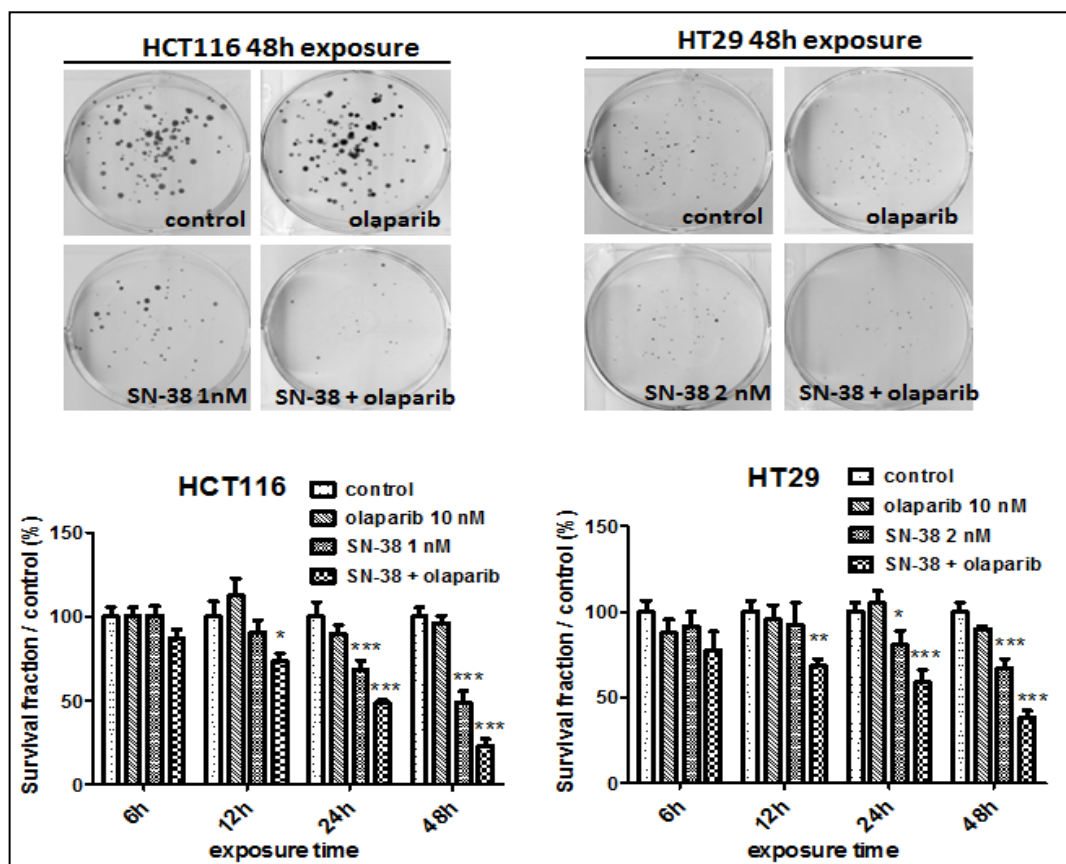


図 14. コロニー形成アッセイ

HCT116 細胞株と HT29 細胞株を用いて SN-38 または olaparib を各時間持続接触させた後、コロニー形成アッセイを行った。SN-38 濃度は HCT116 : 1 nM、HT29 : 2 nM とした。測定値は $n = 3$ の平均 \pm SD にて表示した。4 群の比較で one-way ANOVA で $P < 0.05$ であった場合、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

d. 二本鎖 DNA 損傷修復関連マーカー (53BP1、 γ H2AX、Rad51) および細胞周期マーカー (BrdU) を用いた蛍光抗体二重染色法による検討

SN-38 は DSB を誘導することが報告されており、一方 PARP 阻害剤は SSB の修復阻害あるいは DNA 修復に関わるタンパクの PAR 合成阻害が報告されている (26-28, 56, 57)。Olaparib が SN-38 により起こる DSB を増加させるかどうかを評価するため、DSB マーカーである 53BP1 の核内 foci 形成を蛍光抗体法により調べた。まず、HCT116 細胞株を用いて SN-38 および olaparib を各時間 (6、12、24、48 時間) で持続接触させ、S 期特異的な細胞周期マーカーである BrdU と 53BP1 に対する抗体を用いて蛍光抗体二重染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した (図 15)。48 時間の持続接触により、SN-38 と olaparib の併用治療は SN-38 単剤治療に比較し有意に BrdU の取り込みを低下させ、DNA 合成停止を反映した (SN-38 vs. SN-38 + olaparib : $P < 0.01$) (図 15A)。これは [3H]-チミン取り込みアッセイによる DNA 合成能の評価と一致した結果であった。

一方、SN-38 単剤あるいは SN-38 と olaparib の併用治療では 6-12 時間の短時間持続接触で 53BP1 の核内 foci 形成が BrdU の取り込みとともに観察され、S 期特異的に DSB が生じていることを示した。24 時間以上経過すると BrdU の取り込みがなく 53BP1 の核内 foci のみが残存する細胞が増加した (図 15B)。以後の実験において S 期特異的な DSB を検出するため、薬剤の持続接触時間を 12 時間と設定した。

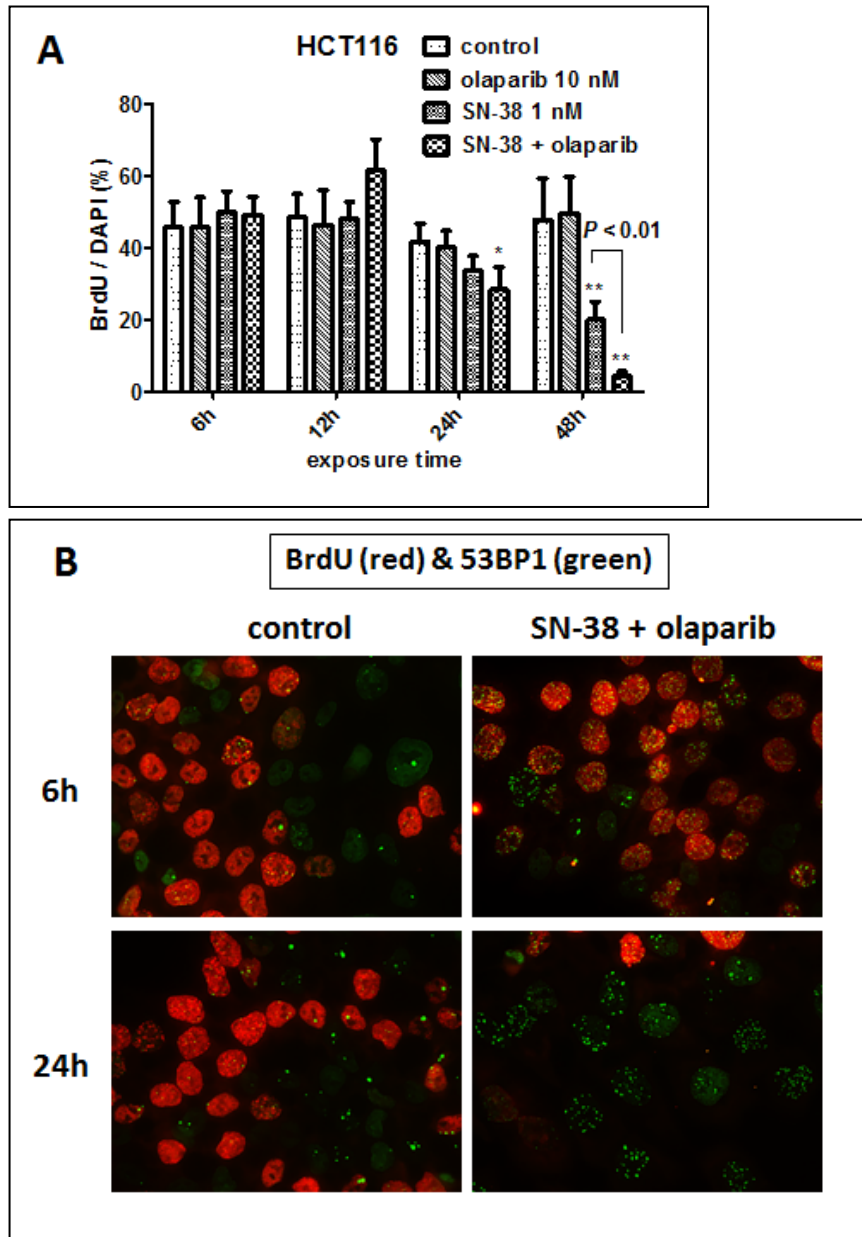


図 15. BrdU と 53BP1 による蛍光抗体二重染色法

HCT116 細胞株を用いて SN-38 または olaparib を各時間持続接触させた後、BrdU と 53BP1 に対する抗体を用いて二重染色を行った。A : BrdU 染色細胞の割合を測定した。測定値は $n = 6$ の平均 \pm SD にて表示した。4 群の比較で one-way ANOVA で $P < 0.05$ であった場合、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。B : 6 時間あるいは 24 時間持続接触させた後、BrdU 染色細胞と 53BP1 の核内 foci 形成を観察した。

次に、MMR の状態が異なる 2 つの細胞株 (HCT116、HT29) を用いて、SN-38 または olaparib を 12 時間持続接触させ、53BP1 の核内 foci 形成を蛍光抗体法により検討した (図 16)。いずれの細胞株においても、olaparib 単剤ではコントロールと比較し変化がなかったが、SN-38 投与により 53BP1 の核内 foci 形成が有意に増加し、また olaparib を加えることにより SN-38 による foci 形成はさらに増加した。

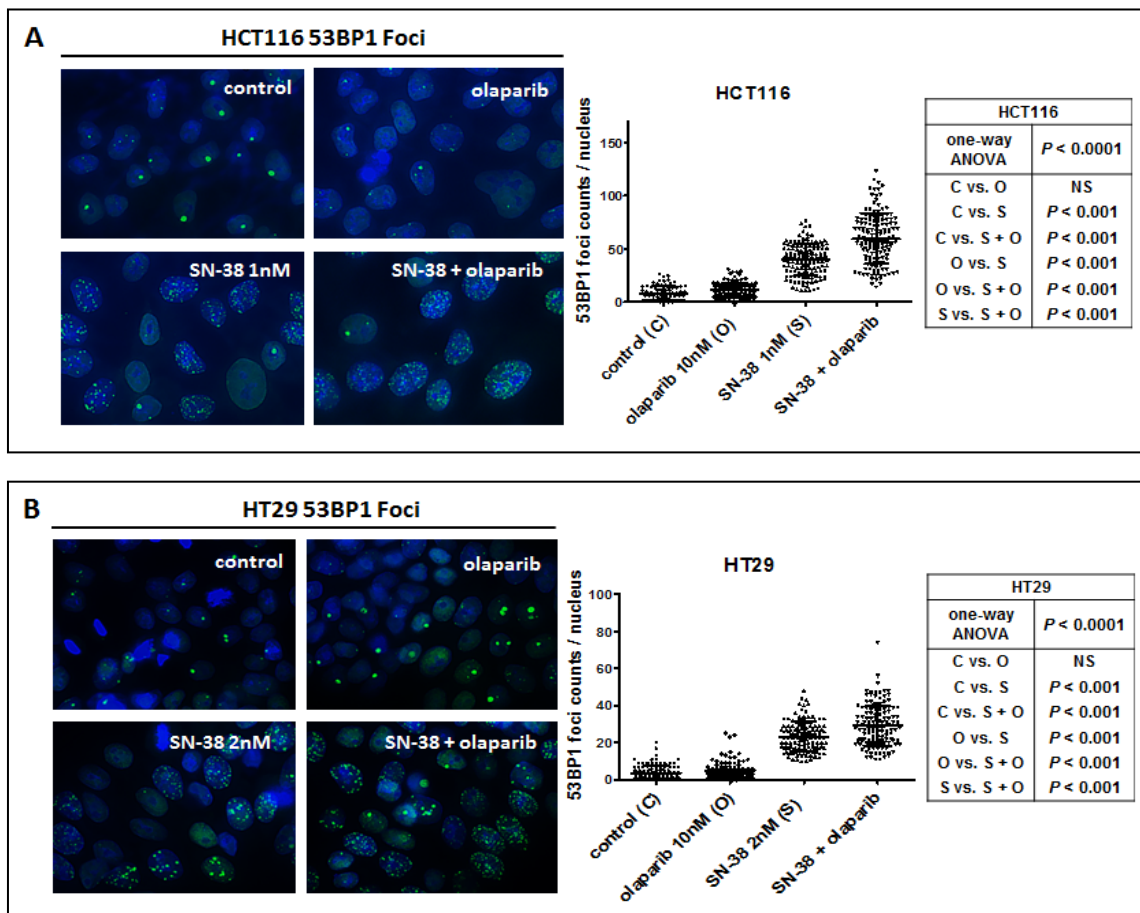


図 16. 53BP1 の核内 foci 形成の比較

HCT116 細胞株 (A) と HT29 細胞株 (B) を用いて SN-38 または olaparib を 12 時間持続接触させた後、53BP1 の核内 foci をカウントした。測定値は $n = 77-147$ の平均 \pm SD にて表示した。4 群の比較では one-way ANOVA で $P < 0.0001$ であった。2 群の比較は Tukey-Kramer method により行った。

次に、DSB 後の修復機能を調べるため、HT29 細胞株を用いて SN-38 または olaparib を 12 時間持続接触させた後、53BP1 と同様の DSB マーカーである γ H2AX の核内 foci 形成と、DSB の主な修復経路である相同組み換え修復 (homologous recombination : HR) に不可欠な分子である Rad51 の核内 foci 形成を蛍光抗体二重染色法により検討した (41-46) (図 17)。Olaparib 単剤ではコントロールと比較し変化がなかった。SN-38 投与により γ H2AX と Rad51 の核内 foci 形成はともに有意に増加し、両者は同部位に集積した。また olaparib を加えることにより γ H2AX と Rad51 の foci 形成はさらに増加した。この結果より olaparib は SN-38 による DSB 部位への Rad51 の集積をさらに増加させることが示唆された。

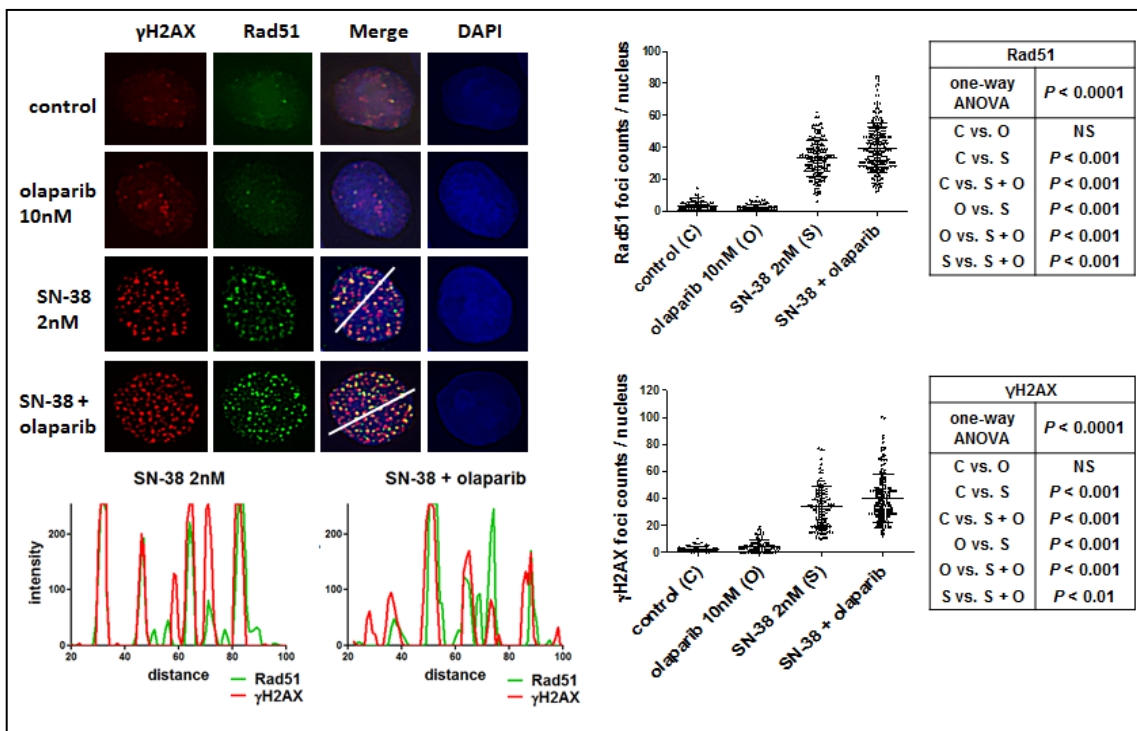


図 17. Rad51 および γ H2AX の核内 foci 形成の比較

HT29 細胞株を用いて SN-38 または olaparib を 12 時間持続接触させた後、Rad51 および γ H2AX の核内 foci をカウントした。測定値は $n = 61-193$ の平均 \pm SD にて表示した。4 群の比較では one-way ANOVA で $P < 0.0001$ であった。2 群の比較は Tukey-Kramer method により行った。

各細胞株の DNA 損傷修復に関わるタンパク (PARP-1、PARP-2、Mre11、Rad50、Nbs1、Rad51) の発現レベルは異なるものの (図 7)、これら発現レベルの違いは olaparib の SN-38 感受性増強効果とは関連がなかった。また、HCT116、HT29、RKO、SW1116 の 4 つの細胞株において SN-38 または olaparib を 48 時間持続接触させた後、DNA 損傷修復に関わる Mre11、Rad50、Rad51、PAR のタンパク発現を Western blot 法により調べた。PAR 合成は olaparib を投与した細胞において抑制されていることが確認されたが、Mre11、Rad50、Rad51 のタンパク発現は薬剤投与後の細胞においてコントロールと比較し変化がなかった (図 18)。

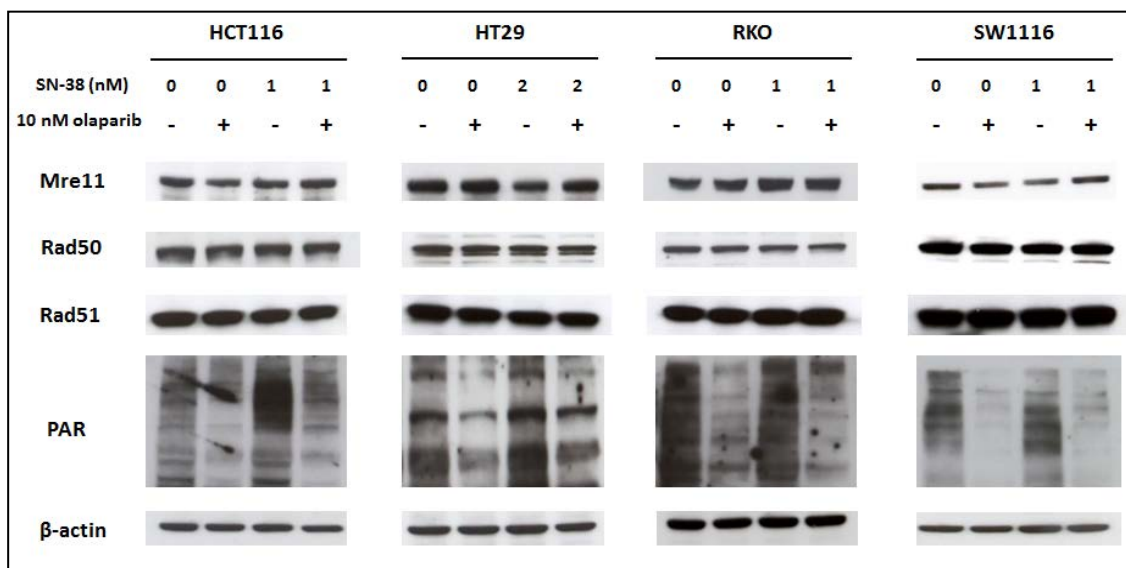


図 18. SN-38 または olaparib 投与後の Mre11、Rad50、Rad51、PAR の発現解析

4 種類の細胞株を用いて SN-38 および olaparib を 48 時間持続接触させた後、Mre11、Rad50、Rad51、PAR のタンパク発現を Western blot 法により調べた。

3-5) 二本鎖 DNA 損傷修復関連タンパク (Mre11、Rad50、Rad51) 発現抑制による SN-38 および olaparib 感受性への影響

Olaparib の SN-38 感受性増強効果に関与する DSB 修復因子を検討するため

に、DSB 修復関連タンパクである Mre11、Rad50、Rad51 をターゲットとして、siRNA を用いてそれぞれ単一ノックダウンを行い、SN-38 および olaparib の感受性変化を検討した。細胞株は、MMR 異常がなく *MRE11* と *RAD50* が wild-type であり、siRNA の導入が良好であった SW1116 細胞株を用いた (図 19)。SW1116 に Mre11、Rad50、Rad51 それぞれをターゲットとする siRNA を導入し、24 時間後にタンパク発現を Western blot 法にて確認したところ、目的のタンパク発現が抑制されていることが確認された。また、Rad51 に対する siRNA を導入した細胞では Rad51 の核内 foci 形成が抑制されていることが確認された(図 19)。SW1116 細胞に siRNA を導入し 24 時間後に SN-38 または olaparib を 48 時間持続接触させ、Scepter 2.0 cell counter にてセルカウントアッセイを行うとともに細胞径測定により細胞周期やアポトーシスの変化を検討した (図 19、20)。

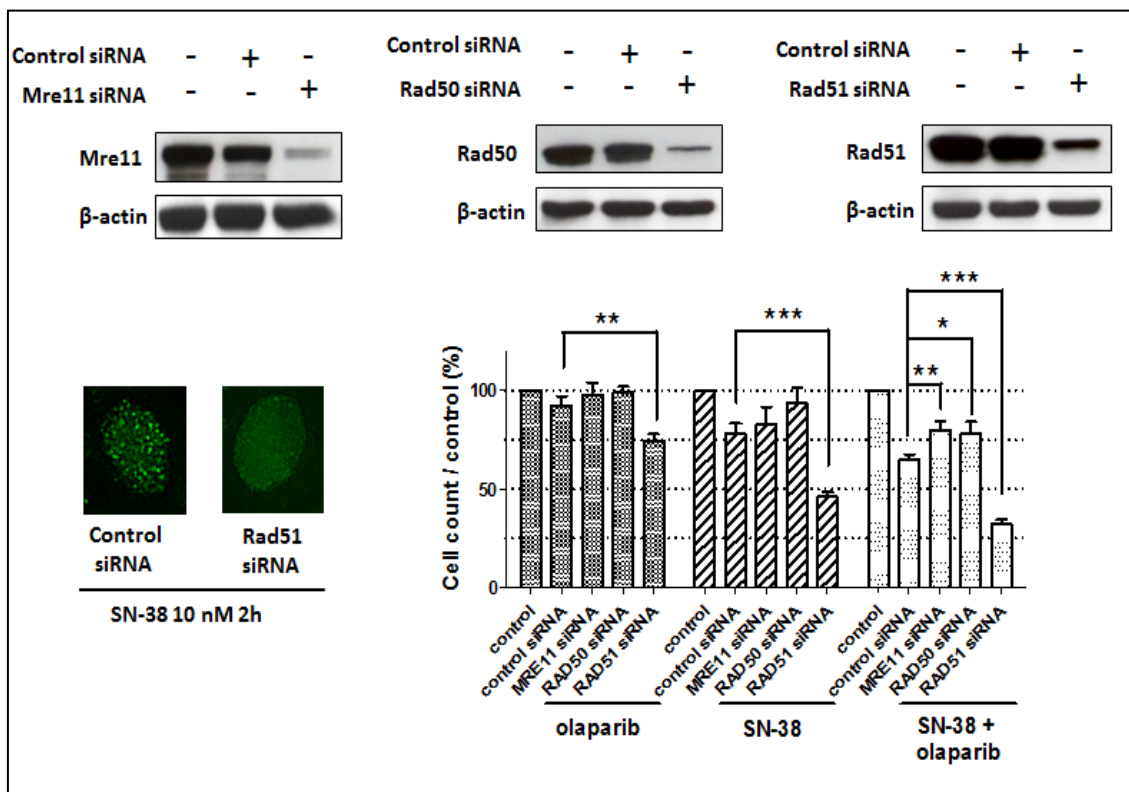


図 19. Mre11、Rad50、Rad51 の発現抑制による SN-38 および olaparib 感受性への影響-1
SW1116 細胞株を用いて Mre11、Rad50、Rad51 をターゲットとする siRNA を導入し、24

時間後にタンパク発現を Western blot 法により確認したところ、それぞれ効果的にノックダウンされていた。また、Rad51 のノックダウン細胞では Rad51 の核内 foci 形成が抑制されていることを確認した。siRAN 導入 24 時間後に、SN-38 (1 nM) または olaparib (10 nM) を 48 時間持続接触させた後、Scepter 2.0 cell counter を用いてセルカウントアッセイを行った。コントロール siRNA とターゲットの siRNA の 2 群間の比較は Student's t-test を用いて行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$)。

Rad51 ノックダウン細胞においてはネガティブコントロールと比較し、SN-38 単剤、SN-38 と olaparib の併用のみならず、olaparib 単剤においても感受性が増加した (図 19)。また、平均細胞径は Rad51 ノックダウン細胞において olaparib 単剤、SN-38 単剤、SN-38 と olaparib の併用、それぞれにおいて増加がみられ、G2/M 期細胞周期停止が誘導されたことを示唆した。また、小細胞分画も同様に Rad51 ノックダウン細胞において olaparib 単剤、SN-38 単剤、SN-38 と olaparib の併用、それぞれにおいて増加がみられ、アポトーシスが增加したことを示唆した (図 20)。一方、Mre11 または Rad50 ノックダウン細胞においてはネガティブコントロールと比較し、感受性の増強はみられなかった。

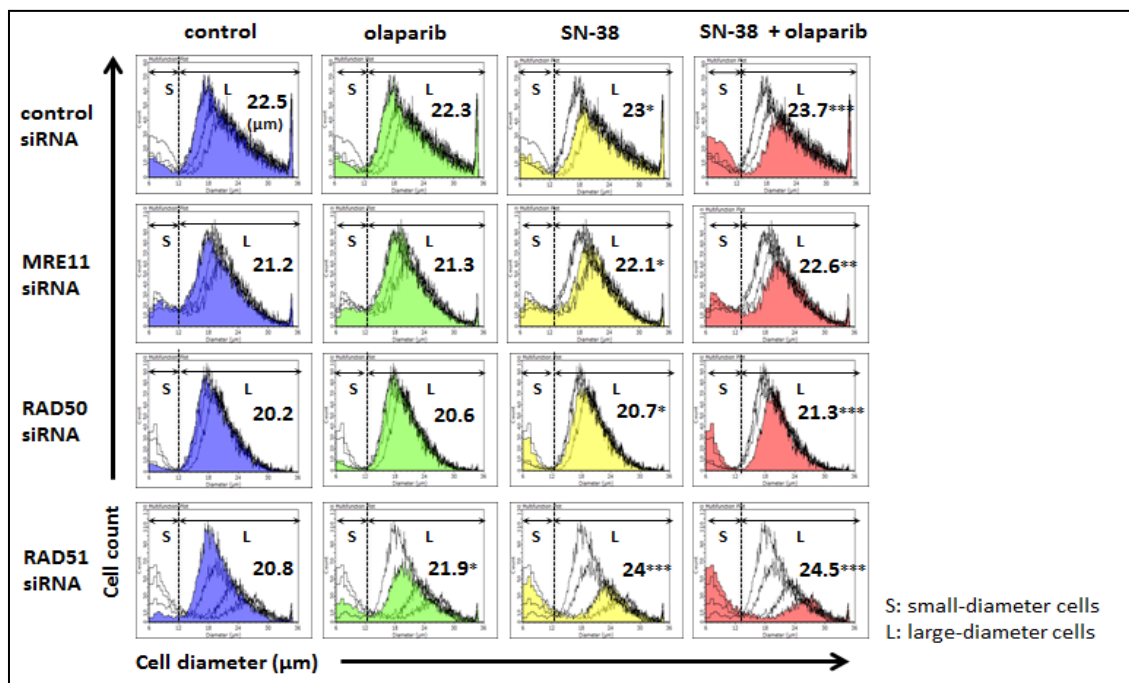


図 20. Mre11、Rad50、Rad51 の発現抑制による SN-38 および olaparib 感受性への影響-2

SW1116 細胞株を用いて Mre11、Rad50、Rad51 をターゲットとする siRNA を導入し、24 時間後に SN-38 または olaparib を 48 時間持続接触させた後、Scepter 2.0 cell counter を用いてセルカウントアッセイと同時に細胞径測定を行った。グラフ内の数値は large-diameter cells の平均細胞径 (μm) (n = 3) を示す。各ノックダウン細胞株の平均細胞径は one-way ANOVA で $P < 0.01$ であり、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

MMR 異常があり *MRE11* と *RAD50* にフレームシフト変異を認める HCT116 細胞株においても、Rad51 をノックダウンし、同様に SN-38 および olaparib の感受性を評価した (図 21)。siRNA を導入 24 時間後に Rad51 タンパク発現を Western blot 法にて確認し、Rad51 発現が抑制されていることを確認した (図 21A)。SW1116 細胞株と同様に Rad51 ノックダウン細胞においてはネガティブコントロールと比較し、olaparib 単剤、SN-38 単剤、SN-38 と olaparib の併用、

いずれにおいても感受性が増加した (図 21B)。また、細胞径測定により、Rad51 ノックダウン細胞においては olaparib 単剤、SN-38 単剤、SN-38 と olaparib の併用、それぞれにおいて G2/M 期細胞周期停止やアポトーシスが増加していることが示された (図 21C)。

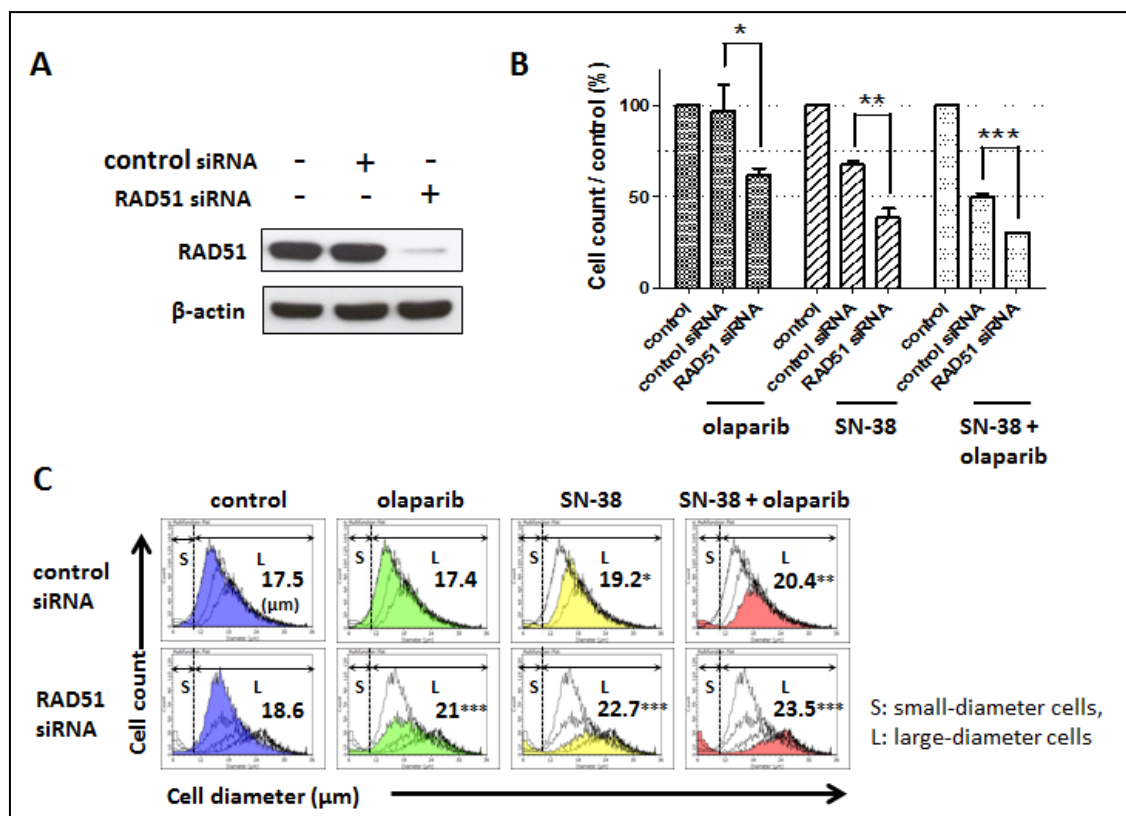


図 21. Rad51 の発現抑制による SN-38 および olaparib 感受性への影響

HCT116 細胞株を用いて Rad51 をターゲットとする siRNA を導入し、24 時間後にタンパク発現を Western blot 法により確認したところ、効果的にノックダウンされていた (A)。siRNA 導入 24 時間後に、SN-38 (1 nM) または olaparib (10 nM) を 48 時間持続接触させた後、Scepter 2.0 cell counter を用いてセルカウントアッセイ (B) および細胞径測定 (C) を行った。B: コントロール siRNA とターゲットの siRNA の 2 群間の比較は Student's t-test を用いて行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$)。C: グラフ内の数値は large-diameter cells の平均細胞径 (μm) (n = 3) を示す。各ノックダウン細胞株の平均細胞径は one-way ANOVA で $P < 0.001$ で

あり、コントロールと治療群の 2 群の比較は Tukey's test により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)。

3-6) *In vivo*における irinotecan と olaparib の腫瘍増殖抑制効果と有害反応の検討

In vivo 実験において irinotecan と olaparib の併用治療の腫瘍増殖抑制効果を検討するために、SN-38 感受性の異なる 2 つの細胞株 (HT29、SW1116) のマウス移植片モデルを作成した。それぞれのマウスモデルにおいて、コントロール群、olaparib 単独治療群、irinotecan 単独治療群、olaparib と irinotecan の併用治療群の 4 群に分けて治療を開始した。

HT29 のマウス移植片モデルにおいて、irinotecan 単剤群ではコントロール群と比較し有意な抗腫瘍効果が得られなかったが、olaparib と irinotecan 併用群において有意に腫瘍増殖を抑制した (図 22)。一方 SW1116 のマウス移植片モデルにおいては、irinotecan 単剤群、olaparib と irinotecan の併用群それぞれにおいてコントロール群と比較し有意に腫瘍増殖を抑制し、irinotecan 単剤群と olaparib と irinotecan の併用群の間では有意差が得られなかったが、trend test では併用群が単剤群より腫瘍増殖を抑制する傾向にあった (図 22)。両細胞株のマウス移植片モデルにおいて、olaparib と irinotecan の併用治療群はコントロール群と比較し有意な体重減少や下痢などの消化器症状は見られなかった (データ未掲載)。

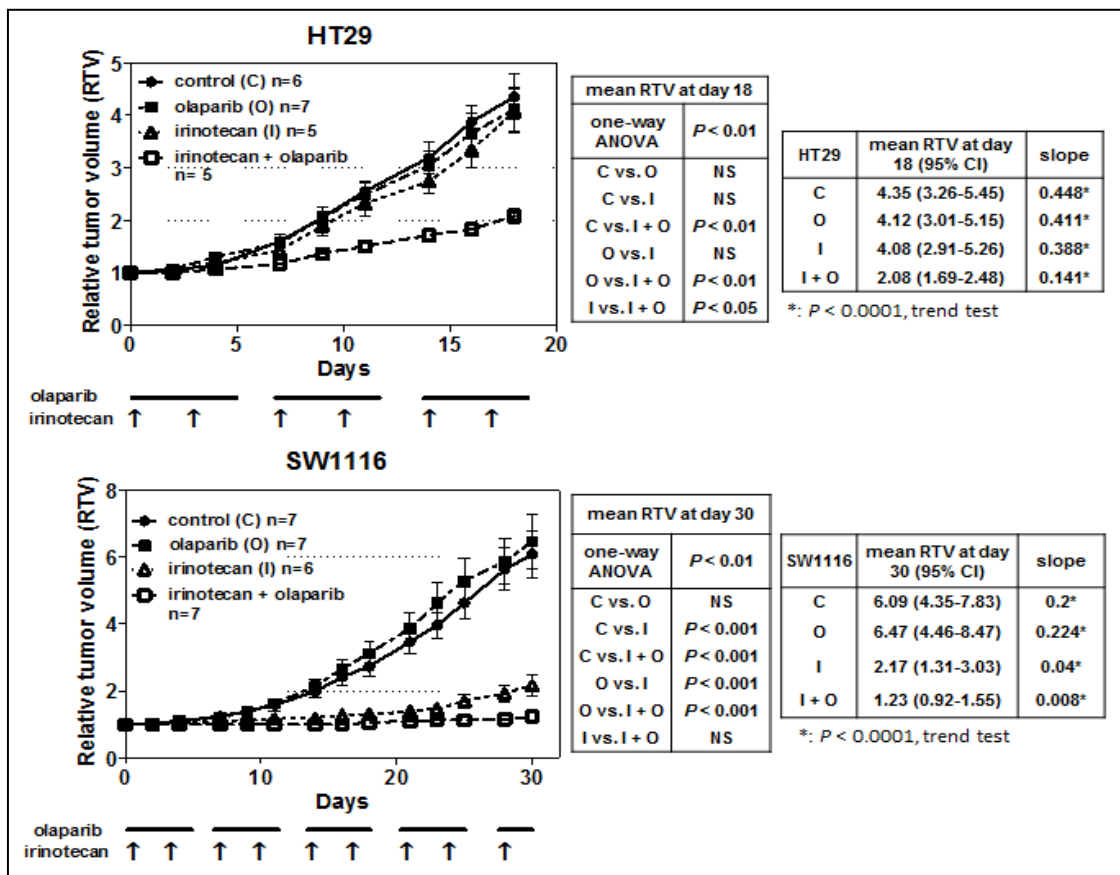


図 22. *In vivo*における irinotecan と olaparib の腫瘍増殖抑制効果

HT29 細胞株と SW1116 細胞株を用いてマウス移植片モデルを作成し、コントロール群、olaparib 治療群、irinotecan 治療群、olaparib と irinotecan の併用治療群の 4 群に分けて治療を開始した。olaparib (50 mg / kg) は経口投与で週 5 日投与 (day0-4)、irinotecan (10 mg / kg) は腹腔内投与で週 2 回投与 (day0、day3) を繰り返した。測定値は平均±SEM にて表示した。4 群の比較では one-way ANOVA で $P < 0.01$ であった。2 群の比較は Tuley-Kramer method により行った。また各群で linear trend test を行った。

また、他の有害反応として血液毒性や肝機能障害を調べるために、SW1116

のマウス移植片モデルにおいて day30 で血液サンプルを採取し、血液検査を施行した。本研究で使用した irinotecan あるいは olaparib の用量では血液毒性や肝機能障害の有害反応は見られなかった (表 4)。

表 4. SW1116 細胞株移植 SHO マウスの day30 における血液データ

	WBC (/ul)	Hb (g/dl)	Plt ($\times 10^4$ /ul)	T-bil (mg/dl)	ALT (IU/l)	ALP (IU/l)
control	883 \pm 319	14.9 \pm 0.71	85.2 \pm 23.3	0.17 \pm 0.08	48.7 \pm 18.1	196 \pm 81
olaparib	1400 \pm 804	14.7 \pm 0.69	107.6 \pm 23.5	0.18 \pm 0.10	42.7 \pm 13.6	184 \pm 65.4
irinotecan	1100 \pm 428	15.0 \pm 0.78	92.2 \pm 22.7	0.1 \pm 0.0	29 \pm 6.5	262 \pm 80
irinotecan + olaparib	1214 \pm 527	14.3 \pm 0.51	128.7 \pm 18.0**	0.14 \pm 0.08	28.1 \pm 9.6*	248 \pm 46

測定値は平均 \pm SD にて表示した。4 群の比較では one-way ANOVA で $P < 0.05$ であった場合に、2 群の比較は Tuley-Kramer method により行った (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

3-7) Rad51 阻害剤 (B02) と SN-38、olaparib の併用効果

Rad51 をターゲットとした癌治療の可能性について検討するため、Rad51 阻害剤である B02 を用いて SN-38 および olaparib との併用効果を *in vitro* にて検討した。Huang らは high-throughput screening (HTS) により選択的に Rad51 を阻害する化合物 B02 を同定した (46, 47)。B02 の Rad51 阻害効果を確認するため、HT29 細胞株を用いて各濃度 (0、1、5、10 μ M) の B02 を 24 時間持続接触させた後、10 nM の SN-38 を 2 時間接触させて DSB を誘発し、その後 γ H2AX と Rad51 の核内 foci 形成を蛍光抗体二重染色法により観察した (図 23A)。SN-38 の投与により γ H2AX と Rad51 の核内 foci 形成はともに増加するが、10 μ M の B02 を 24 時間持続接触させた細胞においては γ H2AX の foci 形成はみられるものの、Rad51 の foci 形成は減少することが確認された。一方、同細胞株において各濃度 (0、1、5、10 μ M) の B02 を 24 時間持続接触させた後、Rad51 のタンパク発現を Western blot 法により調べたところ、Rad51 タンパク発現レベルは B02 の添加によって変化がなかった (図 23B)。細胞株の感受

性試験においては 10 μM の B02 を用いることとした。

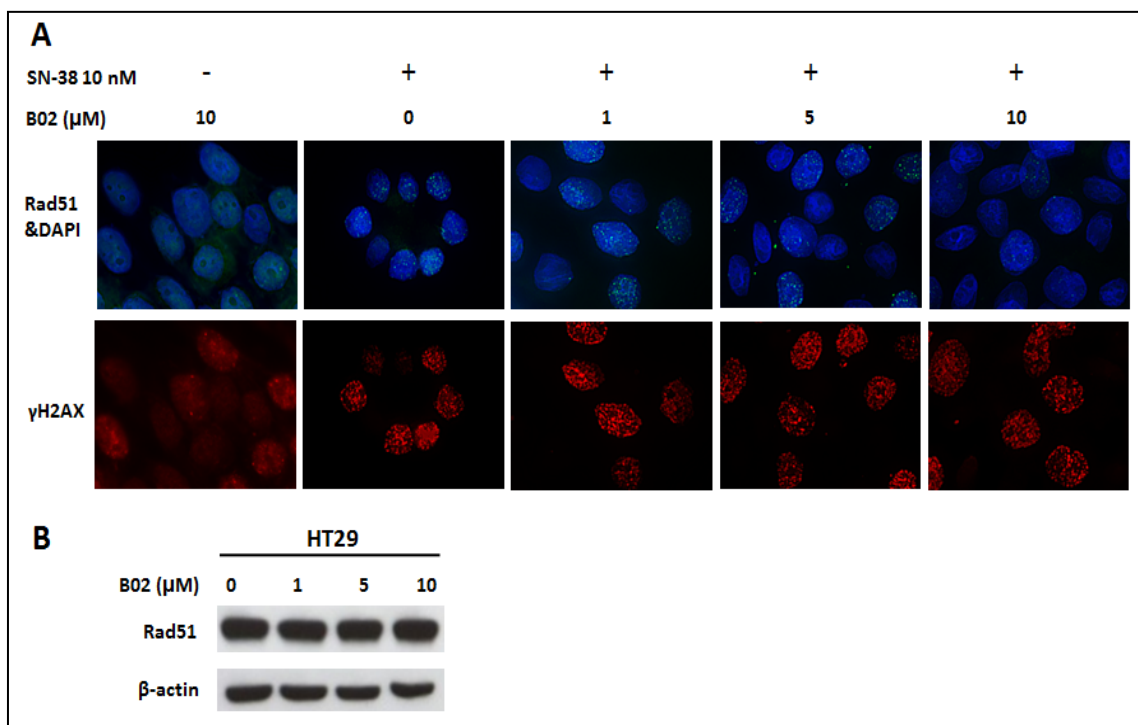


図 23. B02 の Rad51 阻害効果

A : HT29 細胞株を用いて、各濃度 (0、1、5、10 μM) の B02 を 24 時間持続接触させた後、10 nM の SN-38 を 2 時間接触させて DSB を誘発し、その後 γH2AX と Rad51 の核内 foci 形成を蛍光抗体二重染色法により観察した。B : 各濃度 (0、1、5、10 μM) の B02 を 24 時間持続接触させた後、Rad51 のタンパク発現を Western blot 法により調べた。

次に MMR の状態が異なる 2 つの細胞株 (HCT116、HT29) を用いて、SN-38、olaparib、B02 を 48 時間持続接触させ、Scepter 2.0 cell counter にてセルカウントと細胞径測定を行った (図 24)。

B02 と olaparib は SN-38 を添加する 1 時間前に添加した。B02 単剤の投与に

よって約 40%から 60%の細胞増殖抑制効果がみられた。いずれの細胞株においても SN-38 単剤あるいは B02 単剤と比較し SN-38 と B02 の併用投与により細胞増殖抑制効果が増強した。SN-38、B02 と olaparib の 3 剤併用投与により、HCT116 においてはさらに細胞増殖が抑制されたが、HT29 においては、SN-38 と B02 の 2 剤併用投与と変わらなかった (図 24)。細胞径測定においては、B02 単剤あるいは SN-38 単剤と比較し、SN-38 と B02 の併用投与によって平均細胞径が増加し、G2/M 期細胞周期停止が促進された。HCT116 においては SN-38、B02 と olaparib の 3 剤投与によりさらに G2/M 期細胞周期停止が促進された (データ未掲載)。

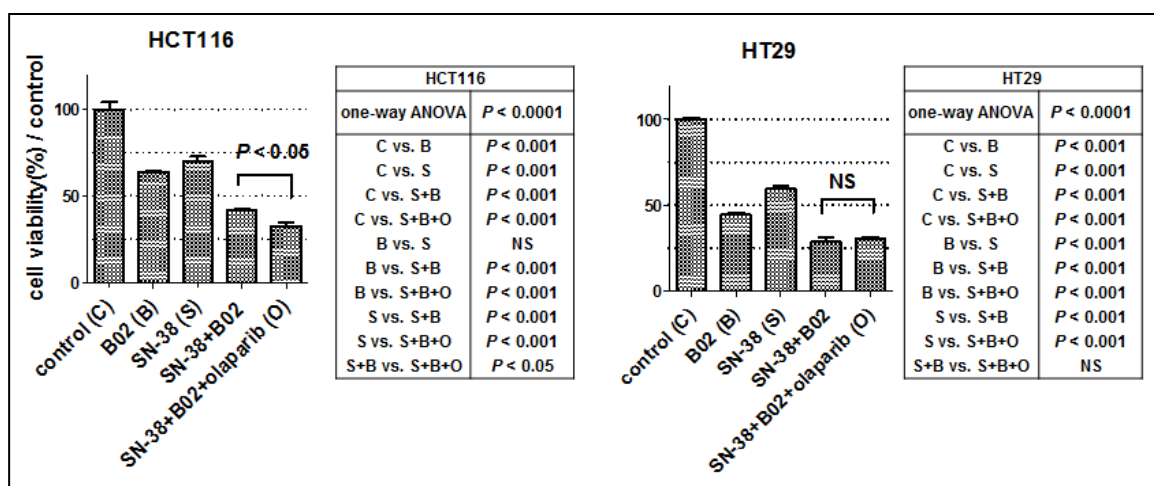


図 24. B02 の SN-38 および olaparib に対する感受性増強効果の検討

HCT116 細胞株と HT29 細胞株を用いて B02、SN-38 および olaparib を 48 時間持続接触後、Scepter 2.0 cell counter にてセルカウントを行った。SN-38 濃度は HCT116 については 1 nM、HT29 については 4 nM とした。測定値は $n = 3$ の平均 \pm SD にて表示した。いずれも one-way ANOVA で $P < 0.0001$ であり、2 群の比較は Tukey's test により行った。

第4章 考察

本研究では MMR の状態が異なる大腸癌細胞株を用いて、SN-38 あるいは irinotecan と PARP 阻害剤の一つである olaparib との併用効果を *in vitro* また

は *in vivo* にて検討した。Vilar らは MSI 陽性大腸癌が *MRE11* と *RAD50* の変異によって irinotecan に感受性が高いとしている (22)。本研究においてもこれまでの報告と同様に MSI 陽性大腸癌において *MRE11* や *RAD50* に高率にフレームシフト変異を認めた (表 2)。また、SN-38 単剤の IC₅₀ 値は *MRE11* 変異をもつ *MLH1* 異常株で低く、*MRE11* 異常が topoisomerase I 阻害剤の高感受性に関わることが示唆された (図 10)。

MRE11 異常をもつ大腸癌細胞株では DNA 修復機構の破綻が考えられるため、topoisomerase I 阻害剤と PARP 阻害剤との併用治療においても影響を与える可能性が推測されたが、[3H]-チミジン取り込みアッセイによる解析では MMR 異常の有無に関わらず、olaparib は SN-38 の IC₅₀ 値をおよそ半分に低下させた (図 10)。また、Scepter 2.0 cell counter によるセルカウントアッセイおよび細胞径測定の結果では、MMR 異常の有無に関わらず olaparib は SN-38 の細胞増殖抑制効果をさらに増強し、G2/M 期細胞周期停止やアポトーシスを誘導した (図 11-13)。特に RKO や SW1116 細胞株においてはアポトーシスを誘導しやすい傾向にあったが MMR 異常とは関わりがなかった (図 13)。

Olaparib による SN-38 感受性増加の作用機序を検討するために、DNA 損傷修復関連マーカーを蛍光抗体法により観察した。まず、S 期特異的な細胞周期マーカーである BrdU と DSB マーカーである 53BP1 に対する抗体を用いて蛍光抗体二重染色を行った。SN-38 を 6-12 時間の短時間持続接触させると 53BP1 の核内 foci 形成が BrdU の取り込みとともに観察され、olaparib はこれを増強した。24 時間以上経過すると BrdU の取り込みがなくなり 53BP1 の核内 foci のみが残存する細胞が増加した (図 15)。また、コロニー形成アッセイにおいても SN-38 単剤あるいは SN-38 と olaparib を 24 時間以上持続接触させることによりコロニー形成能を有意に抑制した (図 14)。Wu らは SN-38 による DSB は二相性であると報告しており、初期相は S 期特異的であり、遅延相はアポトーシスと関連するものであるとしている (57)。本研究において 12 時間までに観察された DSB は S 期特異的に DSB が生じていることを示し、24 時間以降に観察さ

れた DSB は細胞死に関連するものと考えられた。

S 期特異的な DSB を観察するために 2 つの細胞株 (HCT116、HT29) を用いて、SN-38 または olaparib を 12 時間持続接触させ、53BP1 の核内 foci 形成を蛍光抗体法により検討した。両細胞株において SN-38 感受性は異なるものの、olaparib を加えることにより SN-38 による foci 形成はさらに増加した (図 16)。Olaparib による SN-38 感受性増加作用は、各細胞の SN-38 感受性や MMR 異常の影響はないと考えられた。

Olaparib 単剤の IC₅₀ 値は今回使用した細胞株においては 2.5 μM 以上であり、10 nM の olaparib は細胞毒性が見られなかった (図 8)。さらに、10 nM の olaparib 単剤ではコントロールと比較して DSB の増加はなく、また細胞周期やアポトーシスにも変化は見られなかった。しかしながら SN-38 と併用することで DSB を増加させ、G2/M 細胞周期停止やアポトーシスを引き起こしたことから、単純な相加作用ではなく、SN-38 との相乗作用があることが示された。

HT29 細胞株において SN-38 投与により、DSB マーカーである γH2AX の核内 foci が増加するとともに、それと共存して HR に不可欠な分子である Rad51 の foci も増加し (図 17)、SN-38 による DSB は Rad51 を介した DNA 修復経路に関わることが示された。Olaparib は SN-38 による DSB 部位への Rad51 の集積をさらに増加させたことから、Rad51 に対する直接的な阻害作用はないと考えられた (図 17)。Mre11、Rad50、Nbs1 は 3 量体の MRN 複合体を形成し、DSB の感知や修復、ATM キナーゼの活性化などに関わる (41, 42, 44-46)。前述のように SN-38 高感受性が *MRE11* 変異による MRN 複合体の異常によるものであれば、Mre11 も SN-38 による DSB 修復経路に関わり、同時に Rad51 を介した修復経路と関連していると推測された。そこで、olaparib の SN-38 感受性増強効果に関連する DSB 修復因子を明らかにするために、MMR 異常がない SW1116 細胞株を用いて Mre11、Rad50、Rad51 をターゲットとしてそれぞれノックダウンを行い、SN-38 または olaparib の感受性変化を検討した。その結果、Mre11 や Rad50 のノックダウンでは変化がなく、Rad51 をノックダウンし

た細胞においてのみ SN-38 単剤または SN-38 と olaparib の併用、あるいは olaparib 単剤の投与でさえ細胞増殖を有意に抑制した (図 19, 20)。また、*MRE11* 変異をもつ HCT116 細胞株を用いて Rad51 のノックダウンを行ったところ、同様に SN-38 あるいは olaparib の感受性増強効果がみられた (図 21)。

以上の結果より、SN-38 により S 期特異的 DSB が誘導され、これは Rad51 を介する DSB 修復経路により修復されることが示され、olaparib を併用することによりこれらの DSB の増加とそれに伴う HR による修復経路の活性化が示唆された。p53 との関わりにおいては、野生型 p53 では Rad51 発現が抑制されるとの報告があるが (58, 59)、本研究においては p53 の変異の有無に関わらず olaparib の SN-38 感受性増強効果がみられたことから、p53 は重要な役割は果たしていないと考えられた。Olaparib の作用機序としては、ひとつは PARP 阻害に伴う SSB 修復阻害が考えられた。SN-38 により生じた SSB の一部は PARP を介して修復されていると考えられ、この SSB 修復を阻害することで SN-38 による DSB を促進する効果があると推察された (図 25)。Olaparib 単剤では細胞増殖抑制効果がなかったことから、単純に olaparib が直接 DSB を引き起こすことが主な機序ではないと考えられた。一方、PARP-1 が DSB 修復に関わる Mre11 の集積に必要との報告や (60-62)、PARP 阻害により BRCA1 や Rad51 の発現が抑制されるとの報告があり (33)、2 つ目の olaparib の作用機序として、DSB 修復への直接的な阻害作用が推測されたが、本研究においては、Rad51 を介する DSB 修復経路への直接的な阻害作用は確認できなかった。但し、PAR 合成阻害に伴い、DSB 修復経路への何らかの間接的な阻害効果があることは否定できない。Rad51 をノックダウンした細胞では olaparib 単独でも細胞増殖を抑制したことから、相互に何らかの関わりがあることが推測される。ひとつの仮説としては、olaparib 単独でもわずかな DSB が誘導されており、迅速な HR を介する修復が行われているために細胞増殖には影響がなく、本研究におけるアッセイでは DSB が検出できなかった可能性が考えられる。もう一つの仮説としては、Rad51 をノックダウンした細胞では DSB 修復経路として HR を介する経

路は機能しないため、代替経路として NHEJ が主な DSB 修復機構となる可能性がある。PARP は DSB 部位での PAR 合成による NHEJ 関連タンパクのリクルートに関わるとする報告があり (63)、olaparib は HR 修復に関しては直接的な阻害効果はないものの、NHEJ を介する修復経路を阻害することで DSB 修復が行われなくなり、細胞死が誘導されるのではないかと推測される (図 25)。3 つ目の olaparib の作用機序として、細胞膜輸送体への作用が挙げられる。SN-38 の薬剤抵抗性の原因のひとつとして、細胞膜輸送体による細胞外排出がある。細胞膜輸送体である ABC transporters の中で、ABCB1/P-gp (ATP-binding Cassette sub-family B Member 1 / P-glycoprotein) や ABCG2/BCRP (ATP-binding Cassette sub-family G Member 2 / Breast Cancer Resistance Protein) が SN-38 の細胞外排出に関わるとする報告 (64, 65) がある。一方、olaparib も ABCB1/P-gp の基質であるとする報告 (66, 67) があり、olaparib が ABCB1/P-gp の作用を減弱させることにより SN-38 の細胞外排出が減少し、SN-38 濃度が上昇する可能性がある。

いずれにしても PARP の作用機序についてはさらなる検討が必要である。

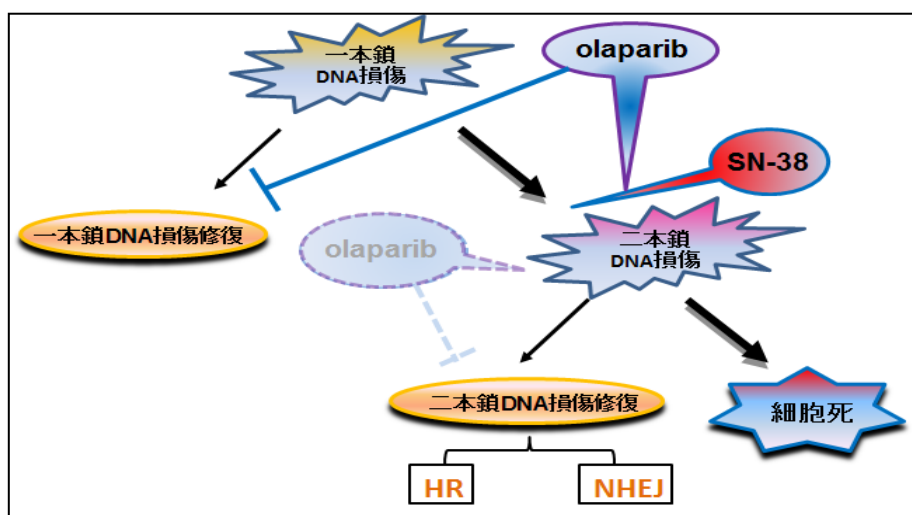


図 25. Olaparib の SN-38 感受性増強効果の作用機構のモデル

Mre11 の異常のみでは SN-38 あるいは olaparib の感受性への影響は確認でき

なかったことから、MRN 複合体が DNA 損傷のセンサーとして働いているものの DSB 修復には必要不可欠とは言えないと考えられた。しかしながら、Oplustilova らは Mre11 の異常細胞で PARP-1 阻害剤の感受性が増加したことを報告しており (68)、PARP 阻害剤と Mre11 との関連は未だ明らかでない。

マウス移植片モデルを用いて irinotecan と olaparib の併用効果を検討し、*in vivo* と同様に併用効果の有効性が示されるとともに (図 22)、体重減少や下痢などの消化器症状、血液毒性や肝機能障害などの有害反応は見られなかった (表 4)。Tentori らはラットモデルにおいて PARP 阻害剤は irinotecan による腸管毒性を回避すると報告している (38)。Irinotecan は臨床の間では消化器症状や血液毒性、肝機能障害などの有害反応が問題となることが多いが、olaparib は毒性がより少ないとされ、併用治療は irinotecan の減量を可能とし治療コンプライアンスの向上が期待される。

mRNA の発現解析では、*MRE11* や *RAD50* と異なり *RAD51* や *BRCA2* は大腸癌細胞株全般で発現が高い傾向にあることから、Rad51 が新たな癌治療のターゲットとして大腸癌に広く応用できるものと期待された (図 6)。今回、Rad51 阻害剤である B02 を用いて SN-38 および olaparib との相乗作用を検討し、B02 と SN-38 の 2 剤併用あるいは B02、SN-38 と olaparib との 3 剤併用効果の有効性が確認されたが (図 24)、B02 はスクリーニングにより同定された薬剤であり、Rad51 を効果的に阻害する濃度が 10 μM と高く、Rad51 阻害以外の作用が働いている可能性があることを否定できない。今後 Rad51 のみをターゲットとした効果的な薬剤の開発が待たれる。

第5章 結論

本研究において SN-38 あるいは irinotecan と olaparib の併用治療が MMR 異常の有無に関わらず幅広く大腸癌細胞に有用であることが示された。Olaparib の作用機序としては、SSB 修復阻害による SN-38 の DSB 促進効果あ

るいは HR を介する修復経路への間接的な阻害効果、また、細胞膜輸送体への関与などが考えられた。*In vivo* の実験において olaparib は有害反応を増加させることなく irinotecan の抗腫瘍効果を増強し、今後臨床への応用が期待された。さらに、topoisomerase I、PARP に加えて、Rad51 が癌治療の新たなターゲットとなり得る可能性が示唆された。

第6章 引用文献

1. Matsuda A, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H and The Japan Cancer Surveillance Research Group. Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2007: A Study of 21 Population-based Cancer Registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 43(3): 328-336, 2013
2. 大腸癌研究会編. 大腸癌治療ガイドライン (医師用) 2014 年度版. 金原出版, p69-70, 2014
3. Zhang N, Yin Y, Xu SJ and Chen WS. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. *Molecules* 13:1551-1569, 2008
4. National Comprehensive Cancer Network. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#site. (2014 年 3 月現在)
5. Oki E, Oda S, Maehara Y and Sugimachi K. Mutated gene-specific phenotypes of dinucleotide repeat instability in human colorectal carcinoma cell lines deficient in DNA mismatch repair. *Oncogene* 18:2143-2147, 1999
6. Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N and Modrich P. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair.

- Cell* 126:297-308, 2006
7. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, Mecklin JP and de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *The New England journal of medicine* 338:1481-1487, 1998
 8. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA and Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:6870-6875, 1998
 9. Abdel-Rahman WM, Georgiades IB, Curtis LJ, Arends MJ and Wyllie AH. Role of BAX mutations in mismatch repair-deficient colorectal carcinogenesis. *Oncogene* 18:2139-2142, 1999
 10. Miquel C, Borrini F, Grandjouan S, Auperin A, Viguier J, Velasco V, Duvillard P, Praz F and Sabourin JC. Role of bax mutations in apoptosis in colorectal cancers with microsatellite instability. *American journal of clinical pathology* 123:562-570, 2005
 11. Wen Q, Scora J, Phear G, Rodgers G, Rodgers S and Meuth M. A mutant allele of MRE11 found in mismatch repair-deficient tumor cells suppresses the cellular response to DNA replication fork stress in a dominant negative manner. *Molecular biology of the cell* 19:1693-1705, 2008
 12. Kim NG, Choi YR, Baek MJ, Kim YH, Kang H, Kim NK, Min JS and Kim H. Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite

- instability. *Cancer research* 61:36-38, 2001
13. Giannini G, Rinaldi C, Ristori E, Ambrosini MI, Cerignoli F, Viel A, Bidoli E, Berni S, D'Amati G, Scambia G, Frati L, Screpanti I and Gulino A. Mutations of an intronic repeat induce impaired MRE11 expression in primary human cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 23:2640-2647, 2004
 14. Giannini G, Ristori E, Cerignoli F, Rinaldi C, Zani M, Viel A, Ottini L, Crescenzi M, Martinotti S, Bignami M, Frati L, Screpanti I and Gulino A. Human MRE11 is inactivated in mismatch repair-deficient cancers. *EMBO reports* 3:248-254, 2002
 15. Miquel C, Jacob S, Grandjouan S, Aime A, Viguier J, Sabourin JC, Sarasin A, Duval A and Praz F. Frequent alteration of DNA damage signalling and repair pathways in human colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogene* 26:5919-5926, 2007
 16. Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH and Kim YS. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clinical cancer research* 10:191-195, 2004
 17. Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR and Issa JP. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:18654-18659, 2007
 18. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P, Molinari F, Bihl MP, Ruffe A, Foerster A, Frattini M, Terracciano L, Heinimann K and Lugli A. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite

- instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *International journal of cancer* 127:2569-2575, 2010
19. Jacob S, Aguado M, Fallik D and Praz F. The role of the DNA mismatch repair system in the cytotoxicity of the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide to human colorectal cancer cells. *Cancer research* 61:6555-6562, 2001
 20. Magrini R, Bhone MR, Hanski ML, Notter M, Scherubl H, Boland CR, Zeitz M and Hanski C. Cellular effects of CPT-11 on colon carcinoma cells: dependence on p53 and hMLH1 status. *International journal of cancer* 101:23-31, 2002
 21. Fallik D, Borrini F, Boige V, Viguier J, Jacob S, Miquel C, Sabourin JC, Ducreux M and Praz F. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer research* 63:5738-5744, 2003
 22. Vilar E, Scaltriti M, Balmana J, Saura C, Guzman M, Arribas J, Baselga J and Tabernero J. Microsatellite instability due to hMLH1 deficiency is associated with increased cytotoxicity to irinotecan in human colorectal cancer cell lines. *British journal of cancer* 99:1607-1612, 2008
 23. Kaneda N, Nagata H, Furuta T and Yokokura T. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer research* 50:1715-1720, 1990
 24. Satoh T, Hosokawa M, Atsumi R, Suzuki W, Hokusui H and Nagai E. Metabolic activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxycamptothecin, a novel antitumor agent, by carboxylesterase. *Biological & pharmaceutical bulletin* 17:662-664, 1994

25. Pommier Y, Redon C, Rao VA, Seiler JA, Sordet O, Takemura H, Antony S, Meng L, Liao Z, Kohlhagen G, Zhang H and Kohn KW. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage. *Mutation research* 532:173-203, 2003
26. Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ and Poirier GG. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 275:15504-15511, 2000
27. Mortusewicz O, Ame JC, Schreiber V and Leonhardt H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic acids research* 35:7665-7675, 2007
28. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, Meistrich ML, Austin CA and Meyer RG. Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biology of reproduction* 84:900-909, 2011
29. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC and Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434:917-921, 2005
30. Helleday T, Bryant HE and Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell cycle* 4:1176-1178, 2005
31. Miwa M and Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer science* 98:1528-1535, 2007

32. Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H and Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic acids research* 34:6170-6182, 2006
33. Hegan DC, Lu Y, Stachelek GC, Crosby ME, Bindra RS and Glazer PM. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase down-regulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2201-2206, 2010
34. Bowman KJ, Newell DR, Calvert AH and Curtin NJ. Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *British journal of cancer* 84:106-112, 2001
35. Miknyoczki S, Chang H, Grobelny J, Pritchard S, Worrell C, McGann N, Ator M, Husten J, Deibold J, Hudkins R, Zulli A, Parchment R and Ruggeri B. The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-8983, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity. *Molecular cancer therapeutics* 6:2290-2302, 2007
36. Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalitzky D, Thomas HD, Wang LZ, Webber SE, Williams KJ and Curtin NJ. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *Journal of the National Cancer Institute* 96:56-67, 2004
37. Smith LM, Willmore E, Austin CA and Curtin NJ: The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to

- topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clinical cancer research* 11:8449-8457, 2005
38. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, Muzi A, Mazzon E, Vergati M, Forini O, Lapidus R, Xu W, Dorio AS, Zhang J, Cuzzocrea S and Graziani G. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents irinotecan-induced intestinal damage and enhances irinotecan/temozolomide efficacy against colon carcinoma. *FASEB journal* 20:1709-1711, 2006
39. Miura K, Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, Matsumoto H, Takahashi A and Hareyama M. The combination of olaparib and camptothecin for effective radiosensitization. *Radiation oncology* 7:62, 2012
40. Nakamura AJ, Rao VA, Pommier Y and Bonner WM. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell cycle* 9:389-397, 2010
41. Kanaar R, Hoeijmakers JH and van Gent DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends in cell biology* 8:483-489, 1998
42. Haber JE. The many interfaces of Mre11. *Cell* 95:583-586, 1998
43. Khanna KK and Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics* 27:247-254, 2001
44. Lee AC, Fernandez-Capetillo O, Pisupati V, Jackson SP and Nussenzweig A. Specific association of mouse MDC1/NFBD1 with NBS1 at sites of DNA-damage. *Cell cycle* 4:177-182, 2005
45. Lee JH and Paull TT. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304:93-96, 2004
46. Takemura H, Rao VA, Sordet O, Furuta T, Miao ZH, Meng L, Zhang H

- and Pommier Y. Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 281:30814-30823, 2006
47. Huang F, Motlekar NA, Burgwin CM, Napper AD, Diamond SL and Mazin AV. Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening. *ACS chemical biology* 6:628-635, 2011
 48. Huang F, Mazina OM, Zentner IJ, Cocklin S and Mazin AV. Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. *Journal of medicinal chemistry* 55:3011-3020, 2012
 49. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS and Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer research* 59:2029-2033, 1999
 50. Trust Sanger Institute, Cosmic Cell Lines Project. http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines. (2014年3月現在)
 51. Pedroni M, Roncari B, Maffei S, Losi L, Scarselli A, Di Gregorio C, Marino M, Roncucci L, Benatti P, Ponti G, Rossi G, Menigatti M, Viel A, Genuardi M and de Leon MP. A mononucleotide markers panel to identify hMLH1/hMSH2 germline mutations. *Disease markers* 23:179-187, 2007
 52. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y and Nagai H. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 121:1300-1309, 2001
 53. Tahara M, Inoue T, Miyakura Y, Horie H, Yasuda Y, Fujii H, Kotake K

- and Sugano K. Cell diameter measurements obtained with a handheld cell counter could be used as a surrogate marker of G2/M arrest and apoptosis in colon cancer cell lines exposed to SN-38. *Biochemical and biophysical research communications* 434:753-759, 2013
54. Rottenberg S, Jaspers JE, Kersbergen A, van der Burg E, Nygren AO, Zander SA, Derksen PW, de Bruin M, Zevenhoven J, Lau A, Boulter R, Cranston A, O'Connor MJ, Martin NM, Borst P and Jonkers J. High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:17079-17084, 2008
55. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavitigian SV, Hainaut P and Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* 28:622-629, 2007
56. Dantzer F, Schreiber V, Niedergang C, Trucco C, Flatter E, De La Rubia G, Oliver J, Rolli V, Menissier-de Murcia J and de Murcia G. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair. *Biochimie* 81:69-75, 1999
57. Wu J, Yin MB, Hapke G, Toth K and Rustum YM. Induction of biphasic DNA double strand breaks and activation of multiple repair protein complexes by DNA topoisomerase I drug 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin. *Molecular pharmacology* 61:742-748, 2002
58. Arias-Lopez C, Lazaro-Trueba I, Kerr P, Lord CJ, Dexter T, Irvani M, Ashworth A and Silva A. p53 modulates homologous recombination by

- transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO reports* 7:219-224, 2006
59. Ambrosini G, Seelman SL, Qin LX and Schwartz GK. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates the effects of topoisomerase I poisons by suppressing Rad51 expression in a p53-dependent manner. *Cancer research* 68:2312-2320, 2008
60. Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, Johansson F, Fernandez S, McGlynn P and Helleday T: PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO journal* 28:2601-2615, 2009
61. Williams RS, Williams JS and Tainer JA. Mre11-Rad50-Nbs1 is a keystone complex connecting DNA repair machinery, double-strand break signaling, and the chromatin template. *Biochemistry and cell biology* 85:509-520, 2007
62. Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Dery U, Masson JY, Hendzel MJ and Poirier GG. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry* 283:1197-1208, 2008
63. Couto CA, Wang HY, Green JC, Kiely R, Siddaway R, Borer C, Pears CJ and Lakin ND. PARP regulates nonhomologous end joining through retention of Ku at double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 194:367-375, 2011
64. Tagen M, Zhuang Y, Zhang F, Harstead KE, Shen J, Schaiquevich P, Fraga CH, Panetta JC, Waters CM and Stewart CF. P-glycoprotein, but not multidrug resistance protein 4, plays a role in the systemic clearance of irinotecan and SN-38 in mice. *Drug metabolism letters* 4:195-201, 2010

65. Candeil L, Gourdier I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, Orsetti B, Scheffer GL, Ychou M, Khan QA, Pommier Y, Pau B, Martineau P and Del Rio M. ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases. *International journal of cancer Journal international du cancer* 109:848-854, 2004
66. Kelly RJ, Robey RW, Chen CC, Draper D, Luchenko V, Barnett D, Oldham RK, Caluag Z, Frye AR, Steinberg SM, Fojo T and Bates SE. A pharmacodynamic study of the P-glycoprotein antagonist CBT-1(R) in combination with paclitaxel in solid tumors. *The oncologist* 17:512, 2012
67. Lawlor D, Martin P, Busschots S, They J, O'Leary JJ, Hennessy BT and Stordal B. PARP Inhibitors as P-glycoprotein Substrates. *Journal of pharmaceutical sciences* 103:1913-1920, 2014
68. Oplustilova L, Wolanin K, Mistrik M, Korinkova G, Simkova D, Bouchal J, Lenobel R, Bartkova J, Lau A, O'Connor MJ, Lukas J and Bartek J. Evaluation of candidate biomarkers to predict cancer cell sensitivity or resistance to PARP-1 inhibitor treatment. *Cell cycle* 11:3837-3850, 2012

第7章 謝辞

本研究を行うにあたり、研究の場を提供して頂くとともに論文作成の御指導を下さいました栃木県立がんセンター研究所がん遺伝子研究室・がん予防研究室の菅野康吉先生に深く感謝いたします。また、菅野先生のもとで研究する機会を与えて頂きました自治医科大学大学院医学研究科・消化器外科学の安田是和教授、堀江久永准教授、宮倉安幸先生に深く感謝いたします。さらに、栃木県立がんセンター研究所で実験操作への助言に御協力頂いた奈良県立医科大学泌

尿器科の井上剛志先生、また、動物実験に御協力頂いた佐藤太さんに深くお礼申し上げます。