

氏名	たはらまきこ 田原真紀子
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 492 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 仁木 利郎 (委員) 教授 藤村 昭夫 教授 武藤 弘行

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

大腸癌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、topoisomerase I 阻害剤である irinotecan は 5-FU やロイコボリンとの併用あるいは分子標的薬との併用で用いられており、生体内では活性型代謝物である SN-38 に変換される。SN-38 は DNA 複製・翻訳時に形成される DNA - topoisomerase I 複合体を安定化させて DNA 再結合を阻害し、最終的に二本鎖 DNA 損傷 (DSB) を引き起こす。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) 阻害剤は一本鎖 DNA 損傷 (SSB) 修復機構を阻害し、DSB 修復に関わる BRCA1 や BRCA2 に変異をもつ遺伝性乳がん卵巣がん症候群に対して合成致死性による有用性が示され、現在臨床試験が進行中である。PARP の作用機序には DSB 修復機構との関連も報告されているが未だ明らかでない。Topoisomerase I 阻害剤に 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、これら併用治療の有用性もいくつか報告されている。

大腸癌は分子生物学的にミスマッチ修復 (mismatch repair : MMR) 遺伝子の異常によるマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) と言われる特徴をもつ細胞群があり、一般の大腸癌と抗癌剤感受性が異なる可能性がある。Mre11 と Rad50 は Nbs1 とともに複合体を形成する DSB 修復タンパクであるが、MSI 陽性大腸癌においてはこれら Mre11 や Rad50 の遺伝子に MSI が起こり、DSB 修復機能の低下により topoisomerase I 阻害剤に対し高感受性であるとする報告がある。

本研究では大腸癌細胞株を用いて、MMR 異常が SN-38 と PARP 阻害剤の一つである olaparib (AZD2281) 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。

### 2 研究方法

MMR の状態が異なる大腸癌細胞株 9 種を用いて、*MRE11* や *RAD50* の MSI 変異の解析を行った。これら細胞株において SN-38 と olaparib との併用効果を細胞増殖アッセイにて検討した。次に、薬

剤投与後の細胞内応答を調べるため、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 および  $\gamma$ H2AX、あるいは DSB 修復に関わる Rad51 に対する抗体を用いて蛍光抗体二重染色法により蛍光顕微鏡下に観察した。また、細胞周期解析やアポトーシス解析を行った。次に DSB 修復タンパクの Mre11、Rad50、Rad51 に着目し、これらを siRNA にてノックダウンしたうえで薬剤感受性の変化を検討し、感受性と関連する DNA 修復因子の検討を行った。*In vivo* では免疫不全マウスに細胞株を移植し、olaparib と irinotecan の腫瘍増殖抑制効果および有害反応について検討した。最後に *in vitro* で Rad51 阻害剤である B02 の効果を検討した。

### 3 研究成果

本研究にて使用した大腸癌細胞株において SN-38 単剤の感受性は *MRE11* の MSI を伴う *MLH1* 異常株で高かった。olaparib の poly(ADP-ribose) (PAR) 阻害効果を確認したところ、10 nM 以上の濃度で PAR の形成が強く阻害されるとともに、SN-38 の細胞増殖抑制効果をさらに増強した。10 nM の olaparib 単剤では細胞増殖を抑制しなかった。MSI の有無に関わらず SN-38 単剤と比較し olaparib との併用治療は SN-38 の 50%細胞増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) をおよそ半分に低下させるとともに、核内 DSB の増加、G2/M 期細胞周期停止の増加、アポトーシスの増加、Rad51 の DNA 損傷部位への集積増加をそれぞれ認めた。BrdU と 53BP1 の二重染色による解析では、SN-38 単剤あるいは olaparib との併用治療で投与後 12 時間までの早期に DSB が S 期特異的に生じ、24 時間以上経過すると細胞周期停止を引き起こした。Mre11、Rad50、Rad51 をそれぞれノックダウンすると、Rad51 をノックダウンした細胞においてのみ SN-38 単剤、olaparib 単剤、あるいはこれらの併用治療において、ネガティブコントロールと比較し有意に細胞増殖を抑制した。また、*in vivo* では irinotecan 単剤と比較し olaparib との併用治療は腫瘍の増殖を有意に抑制するとともに治療群はコントロール群と比較し体重減少や血液毒性といった有害反応は認めなかった。また、Rad51 阻害剤である B02 は SN-38 および olaparib との併用効果が認められた。

### 4 考察

本研究では大腸癌細胞株において SN-38 あるいは irinotecan と olaparib の併用効果を検討した。SN-38 単剤の感受性は *MRE11* の MSI を伴う *MLH1* 異常株で高く、過去の報告に矛盾しない結果であった。しかし olaparib と SN-38 の併用治療に関しては MSI の有無に関わらず olaparib による SN-38 の作用増強効果が認められ、広く大腸癌に応用できる可能性が示唆された。細胞内応答メカニズムに関する検討では、olaparib 単独ではコントロールと比較し変化はみられず、SN-38 との併用治療において DSB を増加させ、G2/M 期細胞周期停止やアポトーシスを誘導し、Rad51 の DNA 損傷部位への集積を増加させたことから、SN-38 と olaparib の相乗作用が示された。

SN-38 高感受性が *MRE11* 変異による Mre11-Rad50-Nbs1 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、Mre11、Rad50、Rad51 のノックダウンによる検討を行った。Mre11 は DSB の sensor molecule として作用すると報告されているものの、SN-38 と olaparib によって生じる DSB の修復には Mre11 の役割は低く、一方で Rad51 が主要な修復因子であり、新たな癌治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

*In vivo* の検討において olaparib は irinotecan の作用を増強するとともに、マウスに対する有害反応を認めなかったことから、olaparib と irinotecan の併用治療は臨床においても有用性が期待できる治療法であると考えられた。

## 5 結論

本研究では、分子生物学的な特徴の違いに関わらず様々な種類の大腸癌細胞において SN-38 あるいは irinotecan と olaparib の併用治療の有効性が示され、今後の臨床応用が期待された。さらに、DSB 修復タンパクである Rad51 が新たな癌治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文は、大腸癌における topoisomerase I 阻害剤 irinotecan の活性型代謝物である SN-38 と poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害剤 olaparib の併用効果に関して基礎的解析を行ったものである。

本研究では、まずミスマッチ修復遺伝子の異常などの異なる大腸癌細胞株 9 種を用いて SN-38 と olaparib との併用効果を細胞増殖アッセイにて検討し、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) の有無に関わらず、olaparib が SN-38 の細胞増殖抑制効果をさらに増強することを明らかにしている。

次いで、SN-38 と olaparib の併用治療では核内 DSB の増加、G2/M 期細胞周期停止の増加、アポトーシスの増加、Rad51 の DNA 損傷部位への集積増加を認めることを明らかにした。さらに *in vivo* において SN-38 と olaparib との併用効果を示すとともに、併用効果により体重減少や血液毒性などの有害反応を生じないことを示している。

以上、本研究により、大腸癌における SN-38 と olaparib の併用効果が有望である可能性が示唆された。また SN-38 と olaparib 併用による細胞増殖の抑制機構について詳細な解析を行っている点も評価された。論文は丁寧に執筆されており、審査での発表も非常にわかりやすいものであった。審査員からは、学位表題が一般でやや漠然としたものであったためより研究の具体的な内容を反映した表題に変えること、併用効果の分子機構として学位論文で述べられたもの以外の可能性も考慮されるため、その点を考察で加えるべきであることなどが指摘されたが、全般的に学位論文として評価される内容を充分含んでおり、指摘された点を訂正したうえで合格とすることとした。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は学位論文に準拠して発表を行った。発表の内容、審査員から指摘された点は、“論文審査の結果” にまとめたとおりである。発表の内容は明快であり、審査員の質問についてもよく理解し返答していた。申請者自身が問題意識を明確に持って研究を行ってきたことが明確に伝わる内容であった。

以上より、申請者は学位を授与するに値する学識および研究能力を有していると全員一致で判断し合格とした。