

化学療法耐性尿路上皮がんに対する腫瘍合成致死誘導を利用した 革新的新規治療法の確立

大阪医科薬科大学 医学部 泌尿生殖・発達医学講座 泌尿器科学教室

小村 和正

1. 諸言

近年の次世代シーケンス技術革新により、がんにおけるドライバー遺伝子変異やエピジェネティクス制御破綻の詳細解明が進んでいる。従来のがん種ごとの標準治療という概念から、個体ごとのがんのジェネティクス、エピジェネティクスの特徴に基づいた横断的な治療概念（Precision Medicine）が広く知られるようになり、日常臨床の現場に浸透しつつある。また、臨床治療現場においては、近年、化学放射線療法が手術療法と並んで根治を目指すうえで欠かせない治療法となっている。特に手術施行が難しい場合、臓器機能温存を患者様が切望される場合には、本治療が唯一の選択肢となることが多く、代表申請者期間においても本邦有数の化学放射線療法施行実績を誇っている。

申請者ら研究グループは、前立腺がんにおける Y 染色体欠失によるエピジェネティクス制御破綻による DNA 損傷応答変化^{1,2)}、膀胱がん化学放射線療法再発症例における特異的 DNA 修復機構による tumor mutation burden との正相関³⁾を現在までに報告している。その課程で、The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) に代表されるような、欧米を中心とした包括コホートでの臨床検体プロセッシングの責任者達と Discussion する機会もあり、より高度に管理された検体を用いて日本人におけるゲノム、エピゲノム、臨床予後データすべてを包括統合したデータ利用が可能になれば、加速度的に研究が進むようになると強く感じている。特に、代表申請者機関は、膀胱尿路上皮がんにおける機能温存を目指した化学放射線療法において、世界有数の治療実績を誇っている⁴⁾。2017 年より代表申請者機関バイオバンクは AMED（日本医療研究開発機構）指定バイオバンクに登録されており、その検体をもちいた解析により、新たな治療ターゲット創出を目指す。

2. 方法

2.1 本研究の方法・目的

現状世界最大規模の TCGA と一線を画した臨床検体プロセッシングで、より高度に精度管理された日本人固形がん検体を使用し、化学放射線療法耐性症例を含めた世界最大規模の包

括的シーケンスデータ、臨床予後データ、Patient Derived Xenograft (PDX)、Tissue Microarray (TMA) からなる包括データセット (すでに 400 例以上を完了しており、世界最大規模となっている) から、遺伝子発現解析、RNA スプライシング解析、non-coding RNA 解析による多層的な病態解析・Biomarker 解析を用いて網羅的に解析することで、診療科横断的に化学放射線療法の治療効果を規定する molecular feature にさらなるアップデートを加え、がんゲノム医療のさらなる拡充に寄与することとする。

2.2 研究倫理について

本研究実行のために下記の研究プロトコルを、代表申請者機関ゲノム研究倫理委員会本会より承認を得たうえで、研究を進めている。

- ・ 課題番号：2305-10、課題名：大阪医科薬科大学病院受診者を対象とした悪性腫瘍克服のための研究基盤バイオバンクの構築
- ・ 課題番号：2344-8、課題名：大阪医科薬科大学バイオバンク検体を用いた血中新規バイオマーカーの探索と新規治療法の開発
- ・ 課題番号：2523-1、課題名：固形腫瘍病理組織検体からの Tissue Microarray を利用した免疫組織染色でのターゲット発現解析
- ・ 課題番号：2808、課題名：バイオバンク検体を用いた網羅的構造・機能解析による、がん病態の解明と、創薬・診断標的分子探索研究

3.結果

化学放射線療法施行後の再発症例でのオミックス解析により、新規に Mitotic Checkpoint Complex (MCC) の構成蛋白である BUB1B/BUBR1 の過剰発現を明らかにしている (図 1)。

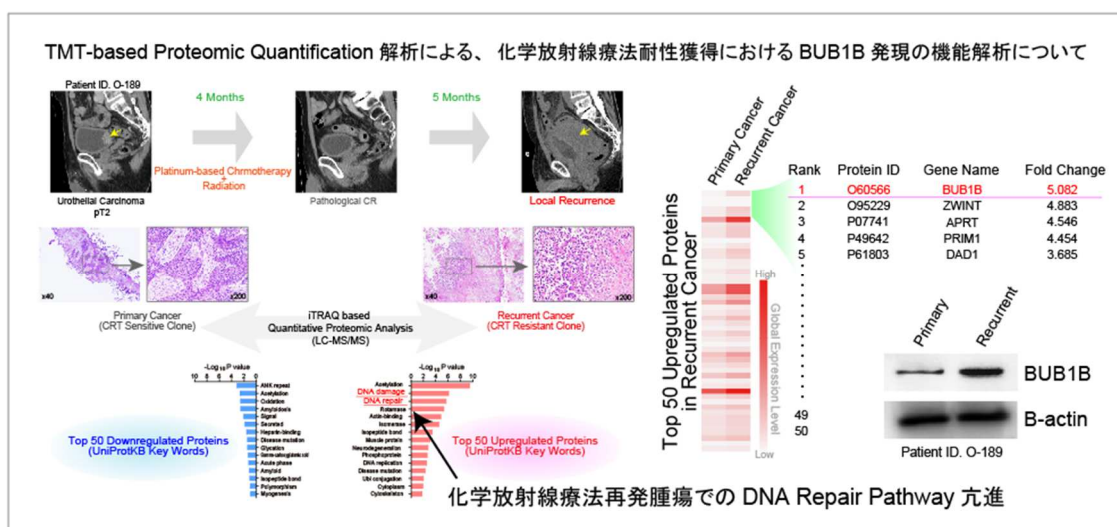


図 1 TMT-based Proteomic Quantification 解析による化学放射線療法耐性獲得における BUB1B 発現変化

ヒト膀胱がん細胞株 T24、JMSU1 を用いて、シスプラチン、放射線に耐性をもつ細胞株を樹立し、それぞれ T24R、JMSU1R とした。これらの耐性株は、BUB1B/BUBR1 の高発現がみられており、それぞれに対して dox-inducible shRNA をレンチウイルスにて導入し、BUB1B/BUBR1 ノックダウンによる耐性消失を確認した (図 2)。

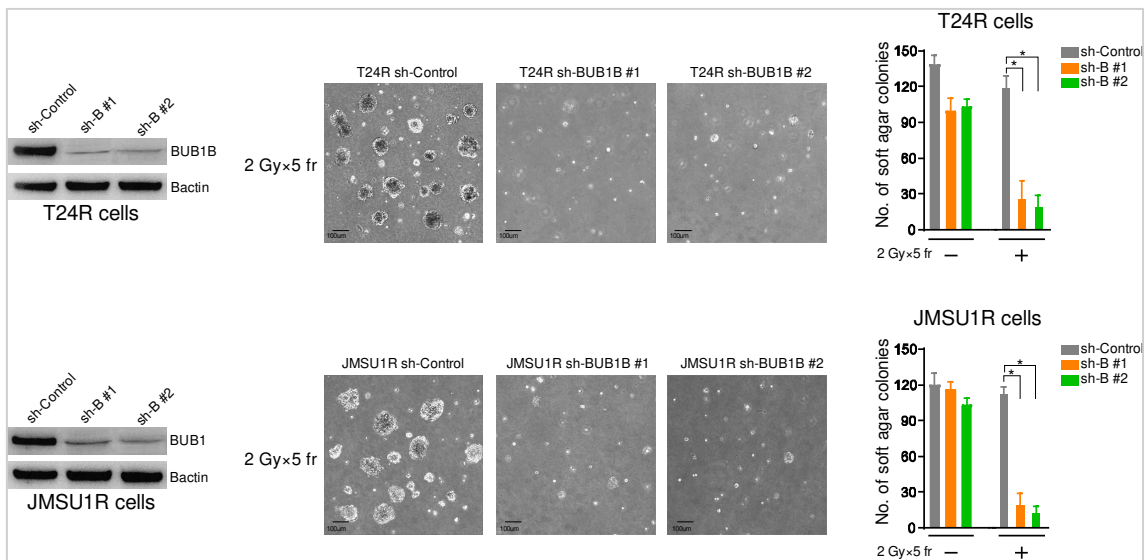


図 2 T24R、JMSU1R ヒト膀胱がん細胞耐性株への BUB1B ノックダウン

In vivo 実験系においても、T24R-shBUB1B#1、JMSU1R-shBUB1B#1 を xenograft として移植し、dox-feeding による shRNA 発現と放射線照射による治療効果を確認した。BUB1B/BUBR1 ノックダウンによる、放射線療法感受性増大を確認した (図 3)。

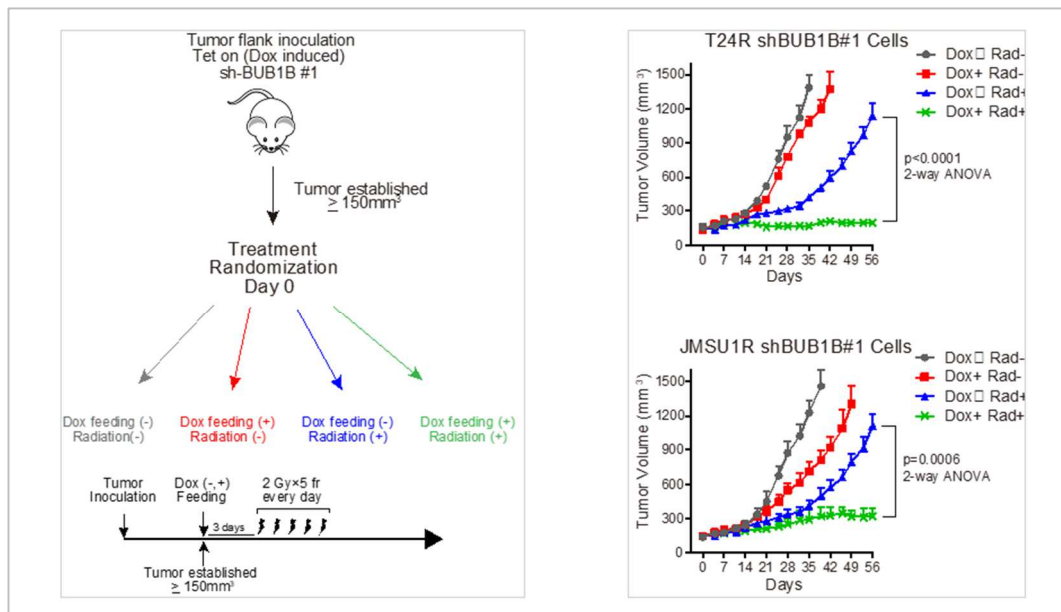


図 3 BUB1B ノックダウンと放射線感受性の in vivo 実験系

DNA 二重鎖切断のマーカーである rH2AX の免疫蛍光染色で、DNA ダメージの修復効率を確認したところ、T24R 耐性株においては、その修復効率が上昇していることが示唆された (図 4)。

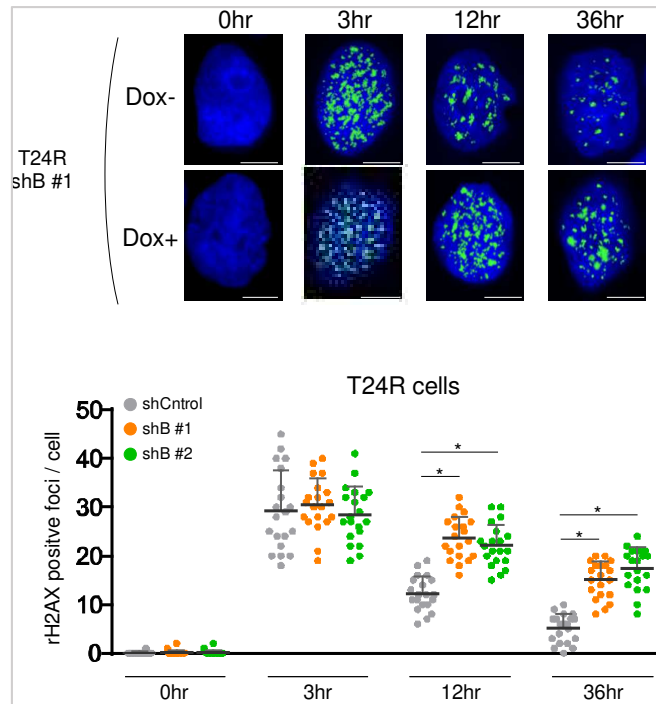


図 4 rH2AX 測定による DNA ダメージ修復効率の変化

BUB1B/BUBR1 の C 末端には kinase domain が存在し、形質発現にこの domain が寄与しているかを確認するために、新たに kinase domain 除去した BUB1B/BUBR1-765x を over expression する細胞株を樹立した。T24R 細胞株において、BUB1B/BUBR1 の 3'UTR への siRNA を導入したうえで、この 765x タンパクを導入したところ、放射線耐性の再獲得はみられなかった。このことから、DNA ダメージ修復効率の上昇に BUB1B/BUBR1 kinase domain が重要な役割を果たしていることが示唆された (図 5)。

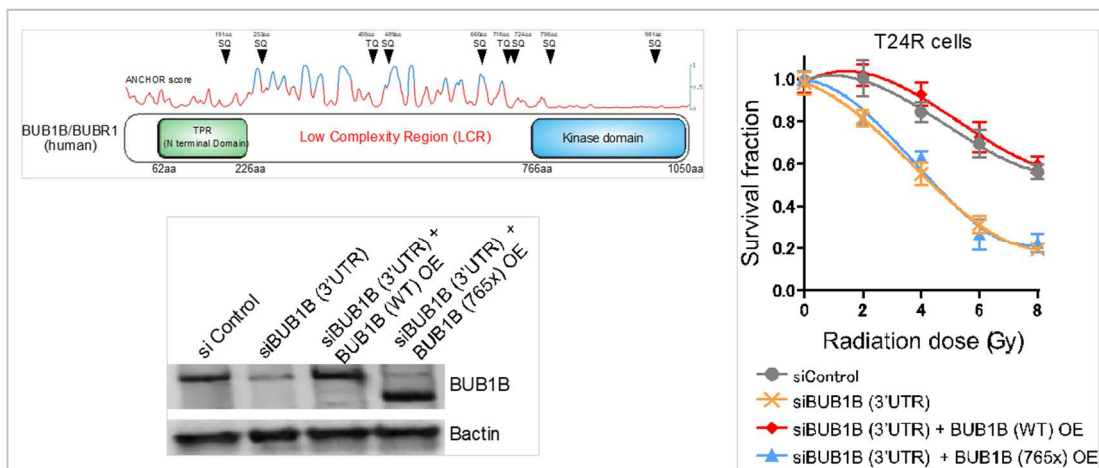


図 5 BUB1B C 末端 kinase domain の phenotype 発現への寄与

DNA ダメージにおいて、リン酸化の initiator である ATM の活性化が重要であり、BUB1B/BUBR1 との physical interaction があることを明らかにした。さらに、ATM 阻害薬により、BUB1B/BUBR1 高発現による DNA damaging agent への耐性を除去できる可能性が示唆された (図 6)。

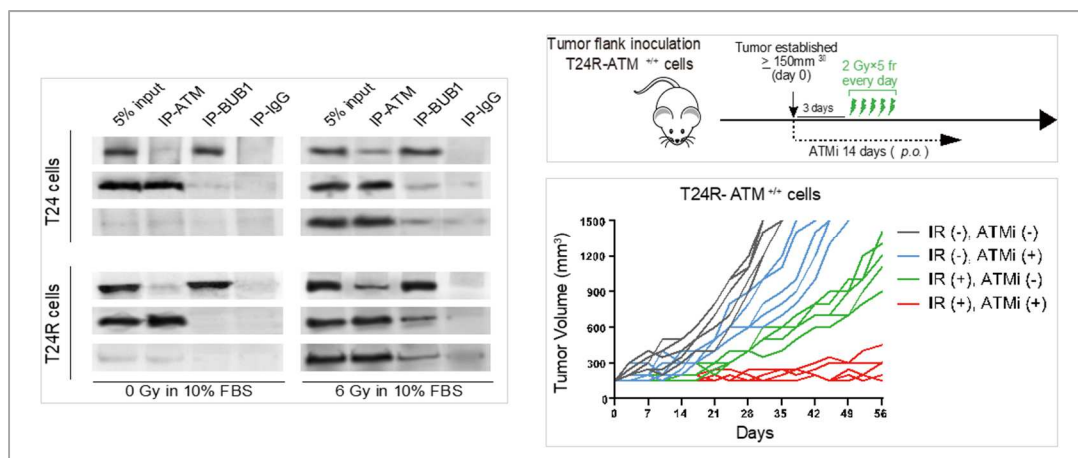


図 6 BUB1B 高発現がん細胞での ATM 阻害薬の放射線への synergistic effect

4. 考察

BUB1B/BUBR1 は Bub3、Mad2、Cdc20 とともに有糸分裂チェックポイント複合体 (MCC) を構成し、APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) を阻害して有糸分裂期を制御する。これらの古典的な機能に加え、本研究の結果は、CRT 再発腫瘍において細胞周期期を通じて BUB1B/BUBR1 が恒常的に発現していることが、DSB 修復効率を上昇させる機能、すなわち正確な NHEJ や HR ではなく変異原性の NHEJ を支配的に利用し、蓄積した変異を有する CRT 耐性クローンをもたらすことを示唆している。

BUB1B/BUBR1 が DNA 修復に関与していることを示唆する研究はいくつかあるが、その生物学的メカニズムはまだ議論のあるところである。例えば、Fang ら⁵⁾は、BUB1B/BUBR1^{+/-}-マウス線維芽細胞 (MEF) が、野生型 BUB1B/BUBR1^{+/+} MEF と比較して、ドキソルビシンを用いた処理による DSB に対して高い生存率を示すことを示している。一方、Thompson⁶⁾らは、BUB1B/BUBR1 が PIDDosome の死ドメインへの RAIDD のリクルートメントを競合させることにより、IR に対するカスパーゼ 2 依存性のアポトーシスを抑制することを示している。この結果は、BUB1B/BUBR1 の発現量の増加が IR に対する抵抗性と関連するという仮説を支持するものであった。特に、DNA 損傷の最初のトランスデューサーキナーゼである ATM は、IR 処理後に BUB1B/BUBR1 と相互作用することが確認され、DNA 修復の生物学的プロセス、特に変異原性 NHEJ において、BUB1B/BUBR1 の形質発現の基となっていることがさらに明らかにされており、本研究においても重要な知見であると考えられる。

5.結語

化学放射線療法耐性獲得において、BUB1B/BUBR1 高発現が一つの機序として明らかにされた。それらの腫瘍では、ATM 阻害薬が有効である可能性が示唆された。

6.文献

- 1) Komura K, Jeong SH, Hinohara K, Qu F, Wang X, Hiraki M, et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. *PNAS: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(22):6259-6264.
- 2) Komura K, Yoshikawa Y, Shimamura T, Chakraborty G, Gerke TA, Hinohara K, et al. ATR inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(7):2979-299.
- 3) Komura K, Inamoto T, Tsujino T, Matsui Y, Konuma T, Nishimura K, et al. Increased BUB1B/BUBR1 expression contributes to aberrant DNA repair activity leading to resistance to DNA-damaging agents. *Oncogene*. 2021;40(43):6210-6222. doi: 10.1038/s41388-021-02021-y. Epub 2021 Sep 20. PMID: 34545188.
- 4) Azuma H, Inamoto T, Takahara K, Nomi H, Hirano H, Ibuki N, et al. Novel bladder preservation therapy with Osaka Medical College regimen. *The Journal of Urology*. 2015;193(2):443-450.
- 5) Fang Y, Liu T, Wang X, Yang YM, Deng H, Kunicki J et al. BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *Oncogene*. 2006;25:3598-3605.
- 6) Thompson R, Shah RB, Liu PH, Gupta YK, Ando K, Aggarwal AK et al. An Inhibitor of PIDDosome Formation. *Mol Cell*. 2015;58:767-779.

7.成果発表

本研究成果は、2021 年日本癌学会にて Therapeutic Utility of ATM Inhibitor to Chemoradiation-Resistant Urothelial Carcinoma with Aberrant BUBR1 Expression の題目で発表している。