

トラベクテジンの **Schlafen11** を介した新規作用機序の探索

徳島大学大学院 先端技術科学教育部
物質生命システム工学専攻 生命テクノサイエンスコース
学籍番号：5016440053 岩崎 純也

目次

1. 概要.....	4
2. 序論.....	6
3. 実験方法.....	9
3.1 細胞株.....	9
3.2 被験物質.....	9
3.3 抗体.....	9
3.4 細胞生存アッセイ.....	9
3.5 定量 RT-PCR.....	10
3.6 siRNA トランスフェクション.....	10
3.7 ウエスタンブロット.....	10
3.8 <i>SLFN11</i> ノックアウト細胞の作製.....	11
3.9 <i>In vivo</i> 実験.....	11
3.10 統計解析.....	12
4. 結果.....	13
4.1 Sarcoma 細胞 30 株におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性の評価.....	13
4.2 <i>SLFN11</i> の発現量とトラベクテジンの抗腫瘍活性との相関解析.....	14
4.3 <i>SLFN11</i> 高発現細胞と低発現細胞におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性の違い.....	15
4.4 <i>SLFN11</i> ノックダウン細胞における ATR 阻害剤 (VE-821) 併用によるトラベクテジンの抗腫瘍活性の増強.....	19
4.5 <i>SLFN11</i> ノックアウト SW872 細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおけるトラベクテジンと VE-822 の併用効果.....	20
5. 考察.....	22
6. 参考文献.....	26

図表目次

図 1 :	トラベクテジンの作用機序.....	8
図 2 :	Sarcoma 細胞株におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性.....	13
図 3 :	トラベクテジンの抗腫瘍活性と SLFN11 の発現量における相関が認められた.....	14
図 4 :	SLFN11 ノックダウン細胞においてトラベクテジンの抗腫瘍活性が減弱した.....	16
図 5 :	SLFN11 の発現量の違いによりトラベクテジンが細胞に与える影響	17
図 6 :	SLFN11 の脱メチル化がトラベクテジンの抗腫瘍活性に与える影響.....	18
図 7 :	SLFN11 の発現量の違いによる ATR 阻害剤とトラベクテジンの併用効果 (in vitro)	19
図 8 :	SLFN11 の発現量の違いによる ATR 阻害剤とトラベクテジンの併用効果.....	21
図 9 :	SLFN11 低発現細胞における ATR 阻害剤であるベルゾセルチブ及び DNA メチル化阻害剤であるデシタビンとトラベクテジン併用による推測メカニズム....	25

1. 概要

トラベクテジンは、海洋生物由来の抗悪性腫瘍剤であり悪性軟部腫瘍やプラチナ感受性の再発卵巣癌において使用されている。トラベクテジンの抗腫瘍メカニズムには、nucleotide excision repair (NER) や homologous recombination repair (HRR) と呼ばれる DNA 修復機構がその抗腫瘍効果と関わりがあることが報告されている。また、近年の報告において、DNA 傷害性の抗悪性腫瘍剤の効果規定因子として *Schlafen11* (*SLFN11*) という遺伝子が注目をされている。以上のことから、本研究では Sarcoma 細胞株におけるトラベクテジンの抗腫瘍メカニズムにおける *SLFN11* の発現量の重要性を検討した。

我々はまず、*SLFN11* の発現量の異なる細胞株を用いてトラベクテジンの抗腫瘍効果を評価し、*SLFN11* の発現量とトラベクテジンの抗腫瘍効果の間に正相関が認められることが明らかにした。そのため、*SLFN11* の発現量の高い Sarcoma 細胞株に対して、siRNA により *SLFN11* をノックダウンした時の抗腫瘍効果の違いを検討したところ、*SLFN11* をノックダウンすることにより抗腫瘍効果が減弱することが明らかとなった。

SLFN11 が低発現の細胞において、DNA 傷害性の抗悪性腫瘍剤の効果が Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein (ATR) 阻害剤との併用により増強されることが報告されていることから、トラベクテジンと ATR 阻害剤の併用効果を評価した。*SLFN11* を siRNA によりノックダウンした細胞で抗腫瘍効果の上乗せが認められたことから、CRISPR-Cas9 システムを用いて *SLFN11* ノックアウト細胞を作製し、*In vivo* においても ATR 阻害剤とトラベクテジンの併用効果を評価した結果、*SLFN11* ノックアウト細胞において抗腫瘍効果が有意に増強された。

また、*SLFN11* が高メチル化されていることにより *SLFN11* の発現が低下している細胞株において、DNA メチル化阻害剤を用いることで *SLFN11* の発現量が増加しトラベクテジンの抗腫瘍効果も増強されることが明らかとなった。

以上のことから、トラベクテジンの効果と *SLFN11* の発現量との関係は、トラベクテジン抗腫瘍メカニズムの一部に過ぎないが、トラベクテジンの抗腫瘍効果メカニズムにおける *SLFN11* の重要性を明らかにでき、*SLFN11* 低発現の腫瘍に対しては ATR 阻

害剤や DNA メチル化阻害剤との併用の有用性が示された.

2. 序論

トラベクテジン (Yondelis®, ecteinascidin-743, ET-743) は、スペインのPharmaMar社が創製した抗悪性腫瘍剤であり、カリブ海産のホヤの一種である*Ecteinascidia turbinata*の成分に着目して合成された。トラベクテジンは本邦と米国において、悪性軟部腫瘍を対象に承認されており、欧州ではプラチナ感受性の再発卵巣癌においても使用されている(1, 2)。また、乳がんを含む他の固形がんにおける有効性も進行中の臨床試験において示唆されている(3)。

トラベクテジンの作用機序の特徴として、DNAの副溝部分へ結合することで、DNAを主溝側へ湾曲させる作用により、DNA一本鎖切断の誘導及びDNA二本鎖切断の誘導することが報告されている(図1)。その他の作用機序としてトラベクテジンは、ヌクレオチド除去修復(NER)が機能している細胞と比較して、NER欠損細胞において抗腫瘍活性が2~10倍減少することが報告されている(4, 5)。また、DNAに結合したトラベクテジンは、XPGなどのNER機構におけるDNA結合タンパク質と細胞傷害性の複合体を形成することにより、転写共役ヌクレオチド除去修復(TC-NER)によるDNA損傷の修復を妨げると考えられている。一方で、NER欠損細胞はシスプラチンのようなプラチナ系の薬剤に対して高い感受性を示すことが知られている(4-6)。

相同組換え修復(HRR)欠損細胞において、トラベクテジンに対する感受性が50倍以上高くなることから、トラベクテジンの抗腫瘍メカニズムにおいてHRRが重要であることが示されている(7, 8)。HRRの欠如は、細胞周期のS期においてDNA二本鎖切断(DSB)が修復されない状態の持続やアポトーシスとの関連が報告されている(7)。さらに、トラベクテジンに応答して活性化される細胞周期チェックポイントの阻害もまた、抗腫瘍効果を高めるのに有用である可能性がある(9, 10)。DNA複製の損傷に応答して、ataxia telangiectasia and Rad3-related protein kinase(ATR)は、細胞周期の進行およびDNA修復を調節する機構として主要な役割を果たしている(11, 12)。ATR阻害剤によるS期チェックポイントの抑制は、S期における複製起点の予定外の発火およびDSBの誘発を引き起こす(13, 14)。The loss of the S-phase checkpoint by ATR inhibitors causes

the unscheduled firing of replication origins in S-phase and the induction of DSBs (13, 14).現在、15種類の腫瘍で合計39種類の遺伝子融合が確認されており、これは全軟部肉腫の約20%を占めている(15)。さらに、トラベクテジンは融合遺伝子と相互作用することで、EWS-FLI1やFUS-CHOPなどの遺伝子融合によって発現量が増幅された癌遺伝子の発現を阻害する(16, 17)ことが報告されている。

Schlafen11 (*SLFN11*) が癌細胞データベースのバイオインフォマティクス分析において発見され、トポイソメラーゼ (Top) 1阻害剤, Top2阻害剤, アルキル化剤, 及びDNA合成阻害剤を含むいくつかの広く用いられている抗癌剤の細胞応答への効果を規定する因子として同定された(18, 19)。この薬剤の感受性におけるSLFN11の重要性は、Ewing肉腫などでも報告されてきている(20)。SLFN11の存在は、卵巣癌、非小細胞肺癌、結腸直腸癌の患者さんへの効果に影響を及ぼし(18, 19)、一本鎖DNAから replication protein A (RPA) を除去することによりチェックポイントの維持及び相同組換えを抑制することが示されている(21)。最近では、SLFN11はDNAの複製異常に応答しRPAが結合した複製フォークに集積され、HRRとは無関係に複製をブロックすることが報告されている(22)。

本研究では、Sarcoma細胞株におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性と*SLFN11*の発現量を比較した相関解析により、トラベクテジンの抗腫瘍活性にSLFN11の発現量が寄与している可能性が認められたことから、*in vitro*及び*in vivo*において*SLFN11*の発現量の違いがトラベクテジンの抗腫瘍活性に与える影響について評価し、トラベクテジンの効果を規定する因子の一つとして*SLFN11*の発現量の重要性を検討した。さらに、*SLFN11*低発現の細胞において、トラベクテジンの効果を増強させるために有効な併用療法についても評価し、*SLFN11*低発現の腫瘍に対してATR阻害剤やDNAメチル化阻害剤との併用が有用であることを示した。

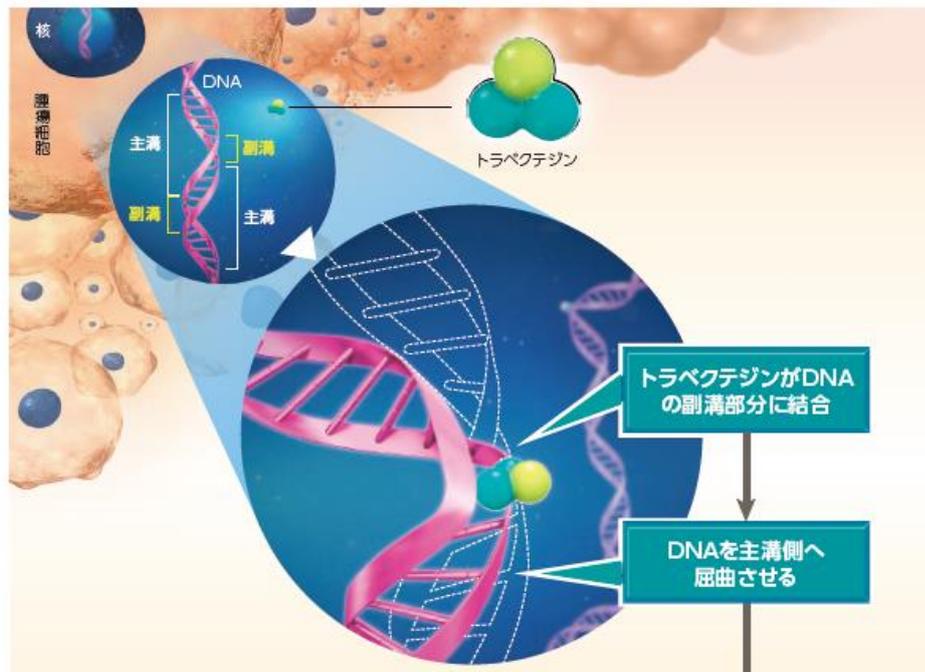


図 1： トラベクテジンの作用機序

トラベクテジンは DNA の副溝部分へ結合することで、DNA を主溝側へ湾曲させるという特徴がある。この作用により DNA 一本鎖切断の誘導、DNA 二本鎖切断の誘導する。（引用元：ヨンデリス総合情報製品概要）

3. 実験方法

3.1 細胞株

ヒトSarcoma細胞株である，Yamato-SS及びAska-SSは中紀文先生（大阪国際がんセンター）及び伊藤和幸先生（徳州会野崎病院）から譲渡いただいた．SYO-1は，川井章先生（国立がんセンター中央病院）から譲渡いただいた．HT-1080，KYM-1，NY，RD，SCCH-196，RKN，SKN及びHuO9N2は，JCRB細胞バンクから購入した．Hs 925.T，KHOS/NP，KHOS-240S，SK-LMS-1，KHOS-312H，SW 872，SW 982，MES-SA，U-2 OS，SK-ES-1，SJSA-1，SJCRH30及びRD-ESは，ATCCから購入した．ESS-1はDSMZから購入した．A673，HOS，MG-63，G-292 clone A141B1及びSaos-2は，株式会社ケー・エー・シーから購入した．すべての細胞は，入手元のプロトコールに従い維持した．

3.2 被験物質

トラベクテジンは，PharmaMar社から譲渡された．VE-821 (<http://www.selleckchem.com/products/ve-821.html>) は，Selleck Chemicalsから購入した．ベルゾセルチブ（VE-822; <https://www.medchemexpress.com/VE-822.html>) はMedChemExpressから購入した．5-Aza-2'-deoxycytidine（デシタビン）は，Sigma-Aldrich Co., LLCから購入した．

3.3 抗体

1次抗体である，SLFN11抗体（sc-374339）及びCHK1抗体（sc-8408）は，Santa Cruz Biotechnologyから購入した．phospho-Ser317-CHK1抗体（#2344），phospho-Ser345-CHK1抗体（#2348），phospho-Ser139-H2AX抗体（#9718）及びGAPDH抗体（#2118）は，Cell Signaling Technologyから購入した．2次抗体として，マウスIgG及びラットIgGのhorseradish peroxidase-conjugated抗体をCell Signaling Technologyから購入した．

3.4 細胞生存アッセイ

細胞の生存数の測定には，クリスタルバイオレット染色法及びCellTiter-Glo 2.0アッセイ（Promega）を使用した． $2\sim 5 \times 10^3$ の細胞を各96-wellプレートに播種し，一定の範囲の濃度で薬剤を72時間処理した．測定にはVersaMax Absorbance Microplate Reader

(Molecular Devices) 及びFlexStation3 (Molecular Devices) を使用した。50%及び75%抑制濃度(IC₅₀及びIC₇₅)は、XLfit (Fit model 205, ITOCHU Techno-Solutions Co) を用いて算出した。

3.5 定量 RT-PCR

TaqMan array cards及びTaqMan gene expression assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて、遺伝子発現量を測定した。RNAは、Sarcoma細胞30株からRNeasy kit (Qiagen) を用いて抽出し、Complementary DNA (cDNA) は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いて作製した。定量PCRには、TaqMan Universal Master Mix II (2x) (Thermo Fisher Scientific) を使用し、*ACTB*と*GAPDH*をリファレンス遺伝子として用いた。

3.6 siRNA トランスフェクション

各細胞を6-wellプレートに播種し (1~3 ×10⁵ cells/well), ヒト*SLFN11*標的siRNA及びネガティブコントロールsiRNA (Stealth RNAi siRNA, Invitrogen, HSS132188及び12935300) をLipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen) を用いて、取扱説明書に従い各siRNAの最終濃度が5 nmol/Lとなるように各wellに添加し、細胞にトランスフェクションした。

3.7 ウェスタンブロット

タンパク質は、プロテアーゼ阻害剤及びフォスファターゼ阻害を加えたタンパク質抽出液を使用して、各細胞から抽出した。タンパク質抽出液の濃度は、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad) により測定した。各タンパク質抽出液は、ウェスタンブロットによりポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、PVDFメンブレン (Bio-Rad) にブロッティングした。メンブレンはBlocking One及びBlocking One P (ナカライテスク) によりブロッキングした。1次抗体は、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) で次のように希釈した。SLFN11, phospho-Ser317-CHK1, phospho-Ser345-CHK1, CHK1及びphospho-Ser139-H2A.Xは1:1000, GAPDHの割合で1:5000に希釈。2次抗体 (Cell Signaling Technology) は、Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 2により1:2000の割合で希釈した。シグナル

は、ChemiDoc Touch (Bio-Rad) により検出した。

3.8 *SLFN11* ノックアウト細胞の作製

SLFN11 遺伝子を欠失させるために、ヒト *SLFN11* 遺伝子を標的とするようにデザインされた Edit-R CRISPR RNA (crRNA) (Dharmacon, CM-01674-01-0002 and CM-01674-02-0002) を使用した。crRNA, Edit-R trans-activating CRISPR RNA 及び SMARTCas9 (Puro[®]) Expression Plasmid を SW 872 細胞へ取扱説明書に従いトランスフェクションした。トランスフェクションの約1週間後から、各細胞をピューロマイシン (1.5-2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加培地で培養した。その3~4週間後に、ピューロマイシン耐性のクローンを選別し、*SLFN11* タンパク質の発現の有無をウエスタンブロットにより確認することで、*SLFN11* ノックアウト細胞を得た。

3.9 *In vivo* 実験

5週齢のBALB/cヌードマウスを日本クレア株式会社から購入し、1週間の検疫期間の後使用した。ヌードマウスの皮下にて移植継代している腫瘍を摘出し、約2 mm角のフラグメントを作製した。フラグメント1個を移植針 (KN-391, $\phi 3.5 \times L 85$ mm, 株式会社夏目製作所) に詰め、ヌードマウスのマウス右側胸部に移植した。群分けは、腫瘍移植後、腫瘍体積 (Tumor Volume, 以下TV) を次の式: $\text{TV} (\text{mm}^3) = (\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2$ より算出し、TVが100~300 mm^3 になったマウスを選別し、各群の平均TVが均等になるように、層別化割付により各群6匹ずつに割り付けた。トラベクテジン (0.01 mg/mL in a solution of 0.05 mol/L KH_2PO_4 [pH4.0]) は、ヌードマウスにおける最大耐量の0.1 mg/kgをDay 1, 5, 9に静脈内投与した。VE-822 (10% vitamin E tocopheryl polyethylene glycol succinate [VitE TPGS]溶液) は、30 mg/kgをDay 1から3日間投薬1日休薬を3回繰り返す投与スケジュールで経口投与した。コントロール群は、トラベクテジンの溶媒 (0.05 mol/L KH_2PO_4 , pH4.0) をDay 1, 5, 9に静脈内投与した。

腫瘍径は、Day 15 までの間に1週間2回の頻度で測定した。Day 15 において、Tumor Growth Inhibition (% , 以下 TGI) を次の式: $\text{TGI} = [1 - (\text{被験物質投与群の平均 TV}) / (\text{Control 群の平均 TV})] \times 100$ より算出した。体重変化 (Body Weight

Change, %, 以下 BWC) を次の式 : $BWC = [(測定日の体重) - (群分け日の体重)] / (群分け日の体重) \times 100$ より算出した.

動物の飼育及び取り扱い等動物を使用する際には、「大鵬薬品工業株式会社における動物実験等の実施に関する規程」に従い動物を適正に使用した.

3.10 統計解析

トラベクテジンの抗腫瘍活性と *SLFN11* の発現量の相関係数は, JMP (ver9) software (SAS Institute Inc) を使用した. TRS細胞と non-TRS細胞間の *SLFN11* の発現量の違いの有意差検定には, Aspin-Welch の *t* 検定で解析した. 有意水準はすべて両側5%とした. 解析には JMP (ver9) software を使用した.

デシタビン処理による各ポイントの *SLFN11* の発現量の違いの有意差検定は, Dunnett 検定で解析した. Day 15 における, 各2群間の TV の平均値の差の有意性を Aspin-Welch の *t* 検定で解析した. 有意水準はすべて両側5%とした. 統計解析には, EXSUS Version 8 (株式会社 CAC クロア) 環境下の Windows 版 SAS システム リリース 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いた.

4. 結果

4.1 Sarcoma 細胞 30 株におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性の評価

融合遺伝子を保有するtranslocation related sarcoma (TRS) 細胞株と融合遺伝子を保有しないnon-TRS細胞株を用いてトラベクテジンを72時間作用させた際のIC₅₀を評価した。全体的な傾向としてはTRS株で効果が高いことが明らかとなったが、non-TRSの株に対してもnmol/Lレベルで効果が認められた。30細胞株のIC₅₀値の範囲も狭いことから、トラベクテジンはTRSとnon-TRSのいずれの細胞株に対しても強い細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。(図 2)

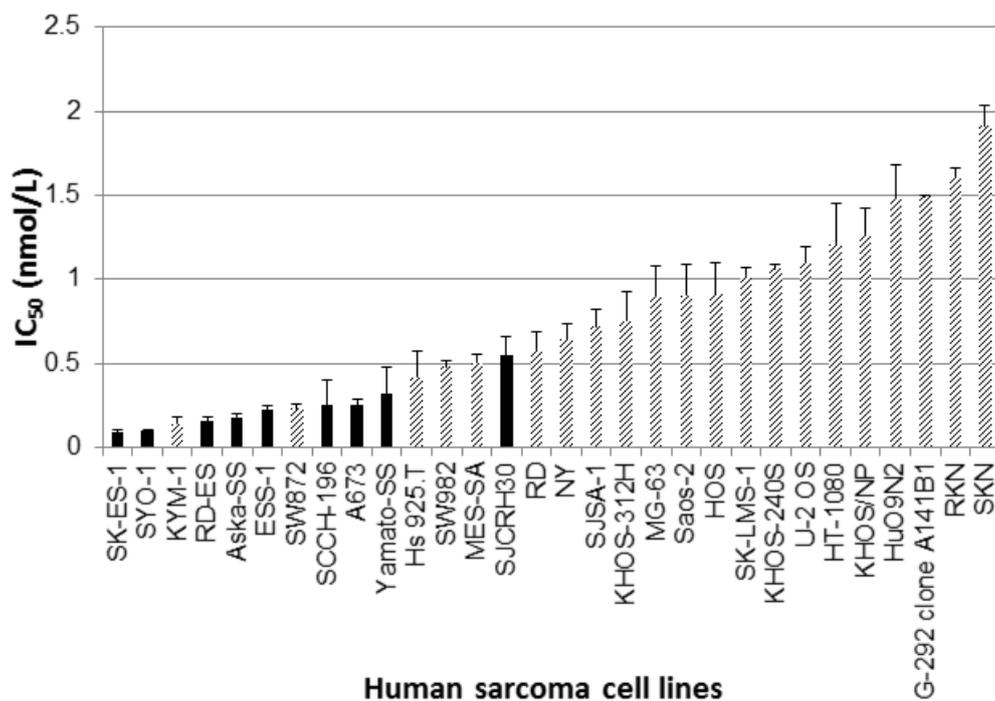


図 2： Sarcoma 細胞株におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性

30 株の Sarcoma 細胞にトラベクテジンを 72 時間処理した。9 株の TRS 細胞（黒グラフ）及び 21 株の non-TRS 細胞（斜線グラフ）を使用した。エラーバーは標準偏差を示している (SD, n ≥ 3)。

4.2 SLFN11 の発現量とトラベクテジンの抗腫瘍活性との相関解析

SLFN11 の発現量とトラベクテジンの抗腫瘍活性に関係があるかを明らかにするために、トラベクテジンの感受性評価で使用した Sarcoma 細胞 30 株の IC_{50} 値と定量 PCR により算出した各細胞株における *SLFN11* の発現量の間に関係が見られるかを評価した。トラベクテジンの抗腫瘍活性と *SLFN11* の発現量は正の相関関係が認められ、*SLFN11* が高発現の細胞ほどトラベクテジンの抗腫瘍活性が高いことが分かった (図 3 a)。また、*SLFN11* の発現量は TRS, non-TRS 間では有意な差が認められなかった (図 3 b)。

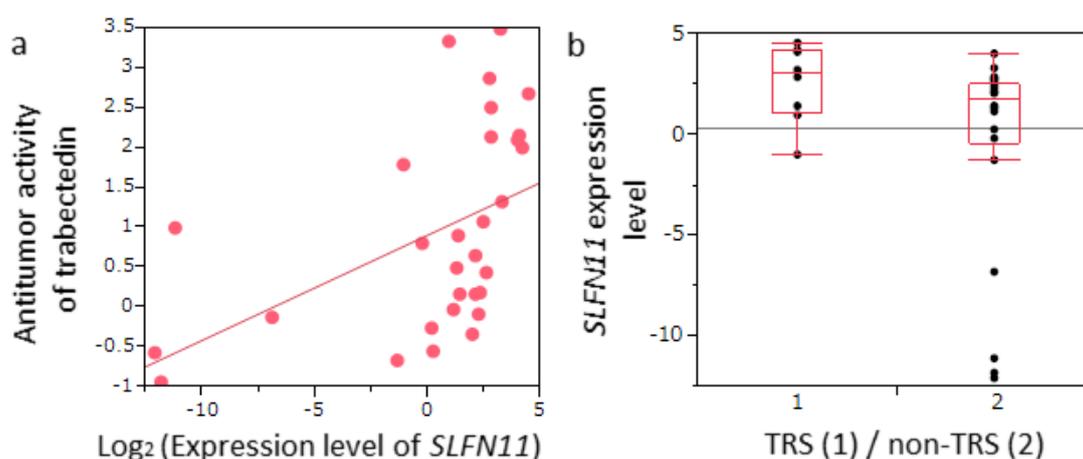


図 3 : トラベクテジンの抗腫瘍活性と *SLFN11* の発現量における相関が認められた

(a) *SLFN11* の発現量 ($\text{mRNA expression level of } SLFN11 = [2^{-\Delta Ct}] \times 1000, \Delta Ct = [\text{Ct of } SLFN11] - [\text{mean of Cts of } ACTB \text{ and } GAPDH])$ とトラベクテジンの Sarcoma 細胞株における $-\log_2 IC_{50}$ との間に相関が認められた。相関係数 : $r = 0.479, P < 0.01$. (b) TRS と non-TRS の細胞の *SLFN11* の発現量に有意な差は認められなかった $P = 0.1203$.

4.3 SLFN11 高発現細胞と低発現細胞におけるトラベクテジンの抗腫瘍活性の違い

トラベクテジンの効力と *SLFN11* の発現量に相関関係があることが明らかとなったため、*SLFN11* 高発現の Sarcoma 細胞 3 株（脂肪肉腫：SW 872, Ewing 肉腫：A673 及び SK-ES-1）を用いて siRNA により *SLFN11* 発現量を低下させた細胞に対するトラベクテジンの抗腫瘍活性をネガティブコントロールの siRNA (siControl) 処理細胞と比較した。トラベクテジンを siControl 及び *SLFN11* の siRNA (siSLFN11) 処理細胞に 72 時間作用させた後の IC₅₀ 及び IC₇₅ 値を算出した。*SLFN11* ノックダウン細胞の IC₅₀ 及び IC₇₅ 値はコントロール細胞と比較して、SW872 で 3.4 及び 2.8 倍、A673 で 1.8 及び 2.2 倍、SK-ES-1 で 2.6 及び 3.6 倍高くなった（図 4 a, b, c）。

SW872 及び A673 細胞株においてトラベクテジンを 20 nmol/L で 1 時間作用させた際に、細胞周期の制御に関与する CHK1 の Ser317 及び Ser345 のリン酸化が *SLFN11* の発現量に関係なく亢進することが示された。一方で、*SLFN11* ノックダウン細胞においては CHK1 の発現量低下が認められた。また、DNA 傷害のマーカである Histone H2A.X のリン酸化は *SLFN11* が高発現しているコントロール細胞で顕著に亢進していた（図 5）。

Sarcoma 細胞 30 株の中には *SLFN11* 低発現細胞株の株が存在する。骨肉腫細胞株の U-2 OS は *SLFN11* が低発現であることが、30 株を用いた定量 PCR で明らかとなったが、CellMiner データベース (<https://discover.nci.nih.gov/cellminercdb/>) により *SLFN11* が高メチル化されていることが明らかとなった（図 6 a）。U-2 OS 細胞株において、デシタビンを 1 μmol/L を作用させた結果、*SLFN11* の発現量が増加することが示されたことから（図 6 b）、U-2 OS 細胞株において、デシタビンとトラベクテジンの併用を検討した。播種した U-2 OS 細胞株にデシタビン 1 μmol/L を 24 時間接触させた後、トラベクテジンを 72 時間作用させた結果、デシタビンと併用することでトラベクテジンの効果が 2 倍程度増強することが示された（図 6 c）。

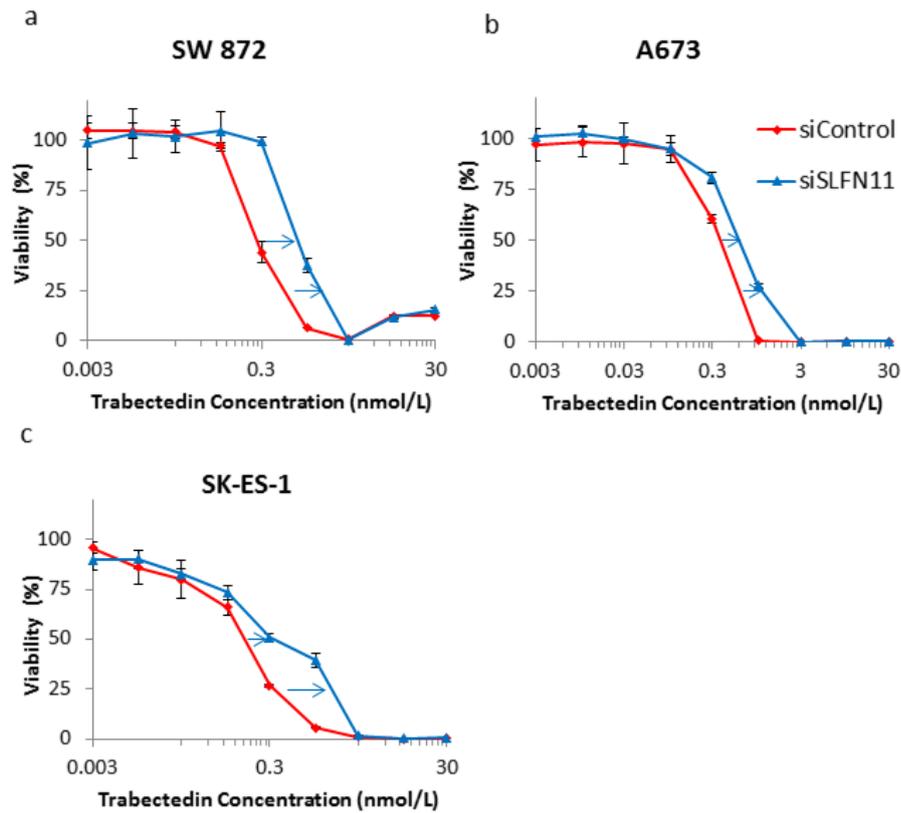


図4： SLFN11 ノックダウン細胞においてトラベクテジンの抗腫瘍活性が減弱したネガティブコントロール siRNA (siControl) 及び *SLFN11* siRNA (siSLFN11) を 3 株に対してトランスフェクションし、トラベクテジンを 72 時間処理した時の生存曲線を示した。未処理細胞の生存率を 100% とし、エラーバーは標準誤差(SD, $n \geq 3$)を示した。

(a) SW 872：脂肪肉腫細胞 (non-TRS)。 (b) A673：Ewing 肉腫細胞 (TRS)。 (c) SK-ES-1 Ewing 肉腫細胞 (TRS)。

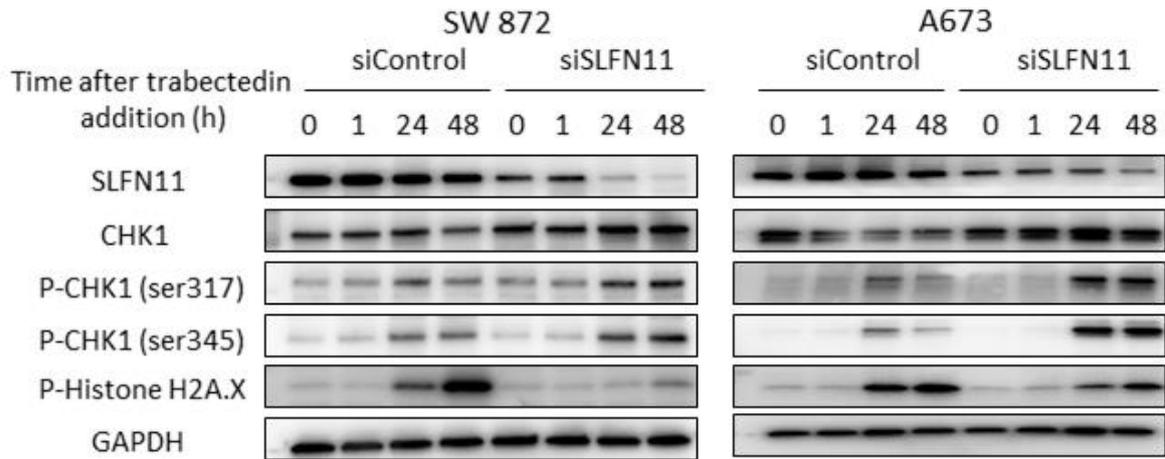


図 5 : *SLFN11* の発現量の違いによりトラベクテジンが細胞に与える影響

SW 872 及び A673 細胞に siControl 及び siSLFN11 をトランスフェクションし，トラベクテジンを 1 時間処理後に 24 時間及び 48 時間未処理培地で培養した．CHK1 のリン酸化がすべての細胞で認められたが，コントロール細胞では CHK1 の発現量が減少した．

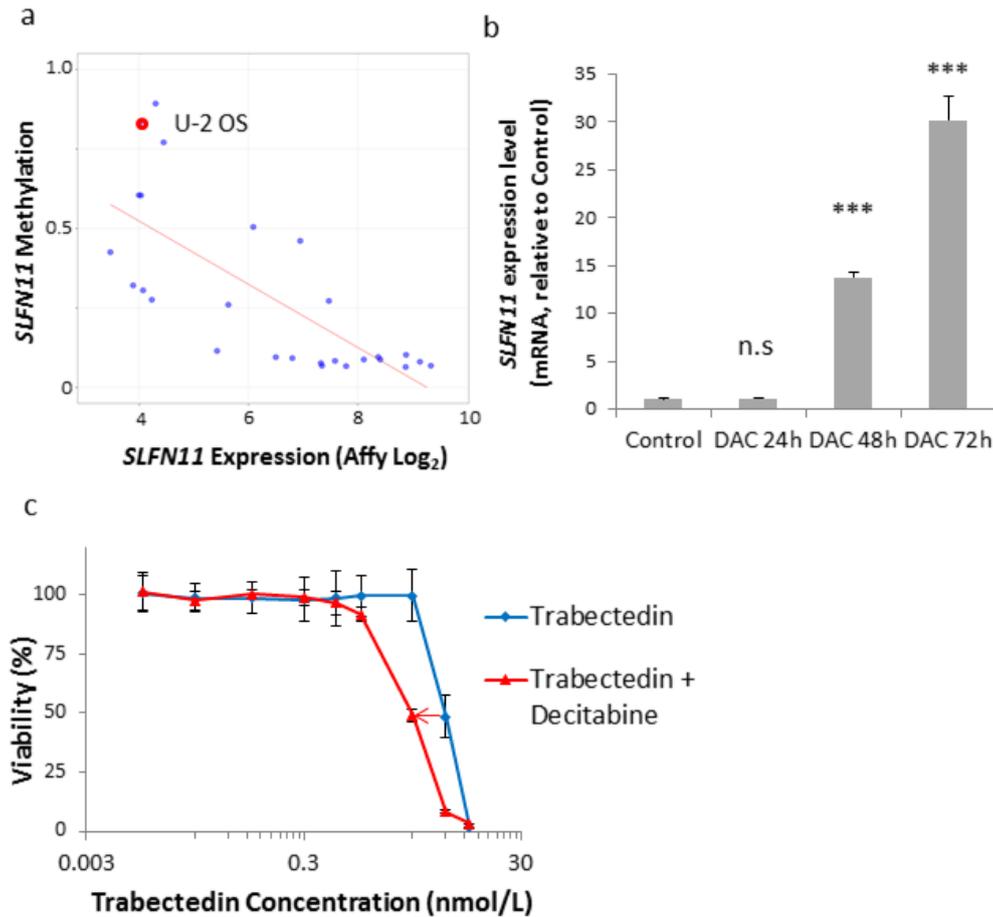


図 6： SLFN11 の脱メチル化がトラベクテジンの抗腫瘍活性に与える影響

(a) CCLEデータベースにおける*SLFN11*の各がん細胞における発現量とGDCSデータベースにおける*SLFN11*のプロモーター領域のメチル化の割合を各データベースで共通して存在する細胞情報をCellMiner (<http://discover.nci.nih.gov/cellmineradb/>) を使用して抽出した。U-2 OS細胞は*SLFN11*が低発現であり、プロモーター領域がメチル化されていることを示している (赤丸)。 (b) *SLFN11*のmRNA発現量は、メチル化阻害剤の5-aza-2'-deoxycytidine (DAC, decitabine) により上昇することが確認された。n.s: not significant, *** $P < 0.001$ 。 (c) トラベクテジンを単独で72時間処理した細胞 (青グラフ) とデシタビンをトラベクテジン処理の24時間前に処理した細胞 (赤グラフ) の生存曲線を示した。未処理細胞の生存率を100%とし、エラーバーは標準誤差(SD, $n \geq 3$)を示した。

4.4 SLFN11 ノックダウン細胞における ATR 阻害剤 (VE-821) 併用によるトラベクテジンの抗腫瘍活性の増強

SLFN11 が ATR-CHK1 経路とは関係なく複製を阻害するため(22), *SLFN11* 低発現の細胞における DNA 損傷への応答は ATR に依存する可能性があることから, ATR 阻害剤 (VE-821) とトラベクテジンの併用による抗腫瘍活性を評価した. VE-821 1 $\mu\text{mol/L}$ とトラベクテジンを 72 時間作用させた結果, SW872 及び A673 の両細胞においてコントロール細胞では併用効果が認められなかったが, SLFN11 ノックダウン細胞ではした場合に ATR 阻害剤によりトラベクテジンの効果が 2 倍に増強されることが示された (図 7 a, b)

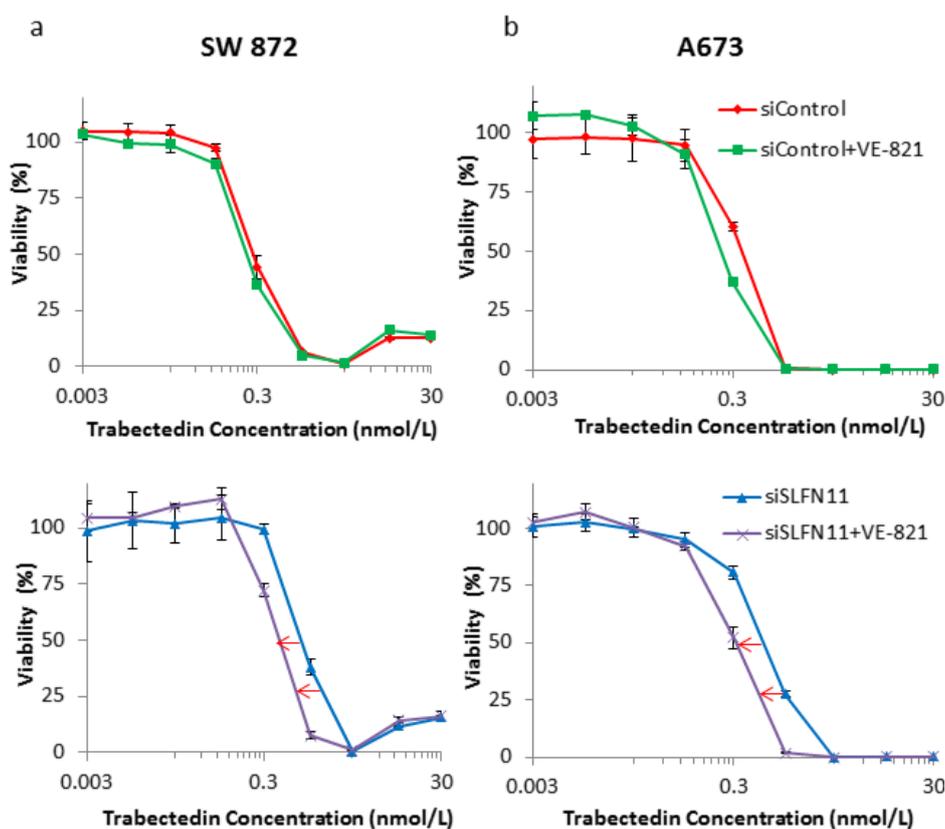


図 7 : *SLFN11* の発現量の違いによる ATR 阻害剤とトラベクテジンの併用効果 (*in vitro*)

SLFN11 高発現株の(a) SW 872 及び(b) A673 細胞に, siControl (上図) 及び siSLFN11 (下図) をトランスフェクションし, トラベクテジンを単独で 72 時間処理した細胞と VE-821 とトラベクテジンを併用した細胞の生存曲線を示した. 未処理細胞の生存率を 100%とし, エラーバーは標準誤差 (SD, $n \geq 3$) を示した.

4.5 *SLFN11* ノックアウト SW872 細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおけるトラベクテジンと VE-822 の併用効果

SW 872 細胞と SW 872 の *SLFN11* ノックアウト細胞のヌードマウス皮下移植モデルにおいて、ATR 阻害剤 (VE-822) とトラベクテジンの併用による抗腫瘍効果を評価した (図 8 a, b). 試験に使用した各々の SW 872 腫瘍の *SLFN11* のタンパク質発現量については、ウエスタンブロット法により確認した (図 8 c). 評価日を Day 15 に設定し、トラベクテジンは 0.1 mg/kg/day を Day 1, 5 及び 9 に静脈投与し、VE-822 は 30 mg/kg/day を Day 1-3, 5-7 及び 9-11 に経口投与した. *SLFN11* 高発現の親株については、トラベクテジン単独投与で顕著な抗腫瘍活性を示した (83% TGI). *SLFN11* ノックアウト株においては、トラベクテジン単独投与の抗腫瘍活性が弱くなっていたが (37% TGI), VE-822 と併用することでトラベクテジンの抗腫瘍効果が増強された. 併用投与による忍容性は良好であり、単独投与と比較して顕著な体重減少の増加は認められなかった.

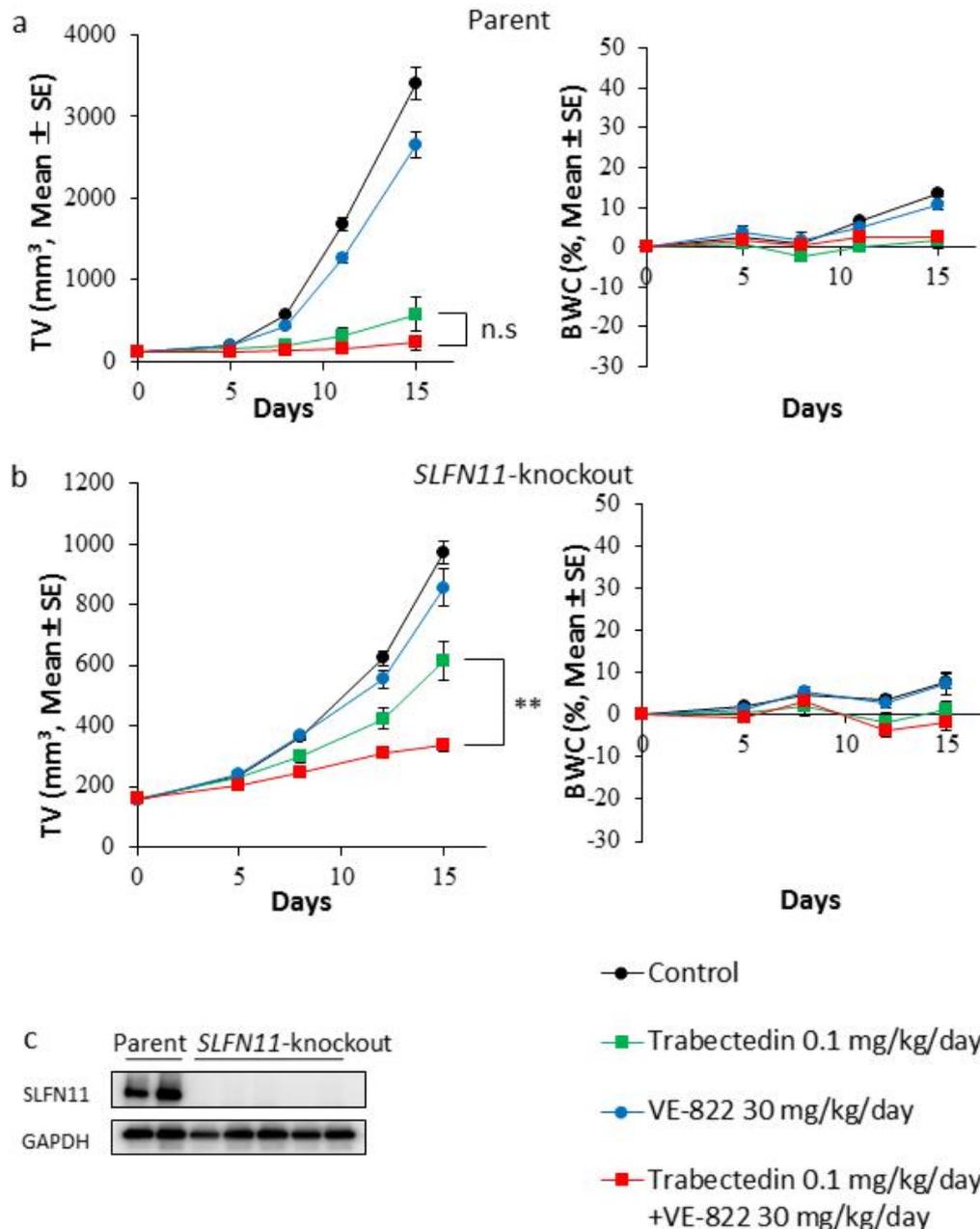


図 8 : *SLFN11* の発現量の違いによる ATR 阻害剤とトラベクテジンの併用効果 (*in vivo*)

(a) SW 872 細胞 (*SLFN11* 高発現) 及び (b) *SLFN11* をノックアウトした SW 872 細胞のヌードマウス皮下移植モデルを用いた。コントロール群は溶媒を Day 1, 5, 9 に投与した。トラベクテジンは Day 1, 5, 9 に, VE-822 は 3 日間投薬 1 日休薬を 3 回繰り返すスケジュールで投与した。腫瘍体積 (TV, 左図) 及び体重変化 (BWC, 右図) を示した。エラーバーは, 標準誤差 (SE, $n \geq 6$) を示した。n.s: not significant, $**P < 0.01$. (c) 実験で使用した *SLFN11* ノックアウト SW 872 腫瘍フラグメントの *SLFN11* タンパク質の欠失はウエスタンブロットにより確認した。

5. 考察

トラベクテジンの抗腫瘍メカニズムにおける SLFN11 の役割を明らかにすることを目的として、*SLFN11* の発現量とトラベクテジンの抗腫瘍効果の関連について検討した。この研究はトラベクテジンに対する細胞応答における SLFN11 の役割について明らかにした最初の報告となる。本研究において、トラベクテジンが TRS と non-TRS の両細胞株に対して nmol/L レベルで抗腫瘍活性を示し、トラベクテジンの抗腫瘍活性と *SLFN11* の発現量に相関があることを示した。SLFN11 の機能を介したトラベクテジンの抗腫瘍メカニズムは、融合遺伝子と独立している可能性が示唆されたことから、我々はトラベクテジンの抗腫瘍メカニズムにおける SLFN11 の働きに着目した。

SLFN11 ノックダウン細胞を用いた *in vitro* での評価及び *SLFN11* ノックアウト細胞のゼノグラフトモデルを用いた *in vivo* での評価において、*SLFN11* 高発現の親株と比較してトラベクテジンの抗腫瘍活性が低くなることが明らかとなった。トポテカン、イリノテカン、シスプラチンなどの DNA 傷害性の抗悪性腫瘍剤においても、*SLFN11* の発現量はその抗腫瘍活性と関与していることが報告されている(19)。一方で、パクリタキセルのような異なる作用機序をもつ薬剤に関しては、*SLFN11* の発現量は抗腫瘍活性とは無関係であった。そのため、*SLFN11* の発現量の違いにより抗腫瘍活性が規定される薬剤は DNA 傷害性の抗悪性腫瘍剤特有のものである可能性があることから(19)、SLFN11 が DNA 修復に関与している可能性を考えた。トラベクテジンと ATR 阻害剤の併用の有用性については、卵巣癌株を用いた検討により報告されている(23)が、本研究では *SLFN11* ノックダウン細胞を用いた *in vitro* モデル及び *SLFN11* ノックアウト細胞を用いた *in vivo* モデルにおいて、ATR 阻害剤によりトラベクテジンの抗腫瘍活性が増強されることが確認された。上記の研究では、トラベクテジンにより CHK1 及び CHK2 のリン酸化が亢進してくることから、ATR 及び ATM 阻害剤を併用することで高い効果が期待できることを示している(23)。このような現象は、PARP 阻害剤においても報告されており、SLFN11 の発現量が DNA の修復に関与していることから SLFN11 が高発現の細胞株では PARP 阻害剤単独で効果が認められるが、低発現の株では効果が弱いこと

が示されており、低発現の株で ATR 阻害剤を併用することで高い効果が期待できることを明らかにしている(24). 一方で、トラベクテジンの抗腫瘍メカニズムは、DNA 傷害による抗腫瘍活性のみではなく転写因子の抑制、細胞周期の制御、腫瘍微小環境の制御することが報告されている(10, 16, 25). 以上のことから、他の DNA 傷害性の抗悪性腫瘍剤とは異なり、SLFN11 の発現を減少させた場合でもトラベクテジンに対して耐性となるのではなく、トラベクテジンの抗腫瘍活性が減弱する結果となったと考えられた.

また、NCI-60細胞株パネルを用いたDNAのメチル化解析によりSLFN11のCpGプロモーター領域が高メチル化されており、このことがプラチナ製剤を含むDNAを標的とした抗腫瘍薬剤による治療に対する耐性化のバイオマーカーとなる可能性が報告されている(18, 26). 最近では、DNAメチル化阻害剤やEZH2阻害剤がSLFN11の発現を誘導することが確認されている(18, 27). デシタビンによるSLFN11の発現誘導は我々の研究でも認められ、デシタビンとトラベクテジンを併用することで抗腫瘍活性が増強されることが示された. これらの結果から、SLFN11が高メチル化している細胞において、トラベクテジンを含むDNA傷害性の抗悪性腫瘍剤とDNAメチル化阻害剤の併用療法は有望であることが示唆された (図 9) .

最近の研究で、SLFN11はDNAの複製異常に応答しRPAが結合した複製フォークに集積され、複製箇所のクロマチン構造を変化させることでHRRとは独立して複製を阻害することが報告されており(22), トラベクテジンがSLFN11低発現の細胞と比較して高発現の細胞において高い抗腫瘍活性を示す理由である可能性が考えられた. 以上のことから、SLFN11低発現細胞においては、DNA損傷に応答したDNA修復機構がATRに依存していると考えられることから、このようなSLFN11欠失細胞においてトラベクテジンを含むDNA傷害性の抗悪性腫瘍剤とATR阻害剤との併用が有望である可能性が示された (図 9).

このように、SLFN11のDNA傷害性薬剤の感受性に関わるメカニズムは完全に同定されていないが、様々な研究が行われており臨床における治療法の選択にSLFN11が利用されることになる可能性が考えられる. SLFN11のmRNA発現が約45%の癌細胞株

で欠損していることがNCI-60及びCCLEパネルのデータから明らかになっている。このようなSLFN11欠損細胞においてはDNA傷害に対する応答機構としてATRに依存していると考えられることから、このような腫瘍に対してトラベクテジンとATR阻害剤との併用が有用である可能性が示唆された。

我々は本研究を通して、トラベクテジンの抗腫瘍活性を規定する因子の一つとしてSLFN11の発現量が重要であることを明らかにした。また、トラベクテジンの抗腫瘍活性が低いSLFN11欠失の細胞においてATR阻害剤及びDNAメチル化阻害剤との併用の有用性を示すことができた。

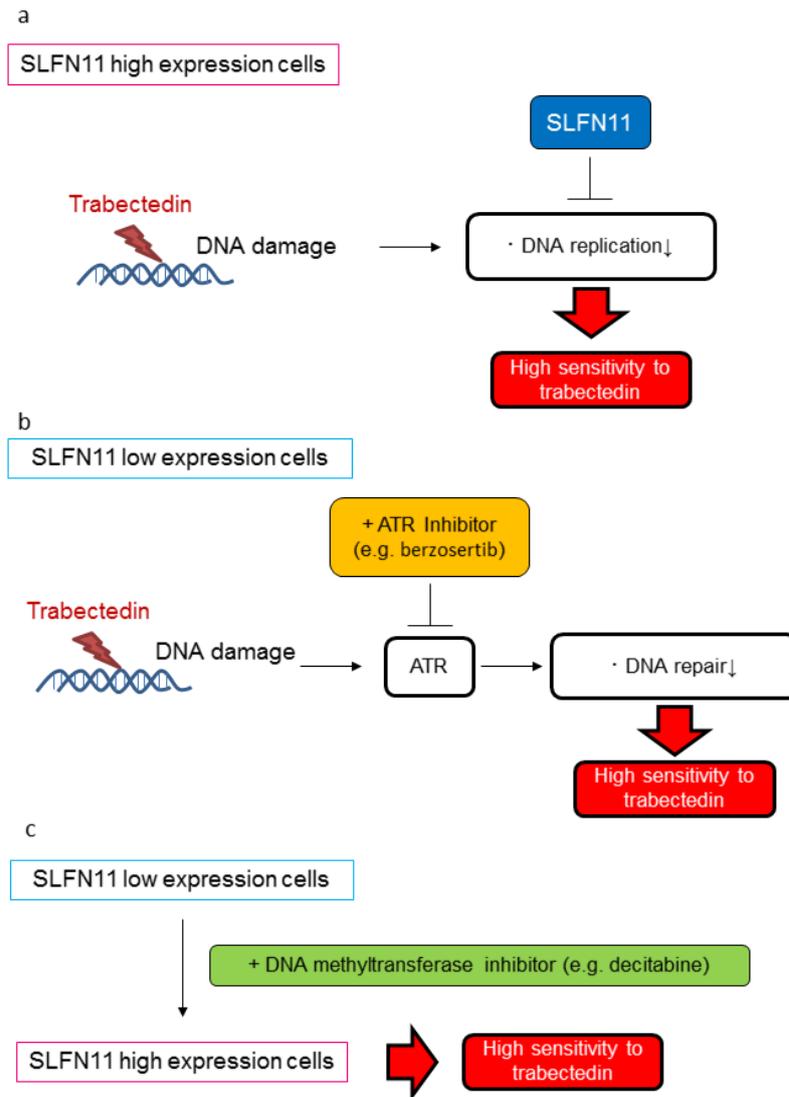


図 9 : *SLFN11* 低発現細胞における ATR 阻害剤であるベルゾセルチブ及び DNA メチル化阻害剤であるデシタビンとトラベクテジン併用による推測メカニズム

(a) *SLFN11* 高発現細胞においてトラベクテジンを処理すると *SLFN11* は複製をブロックするため(22), トラベクテジンは高い抗腫瘍活性を示す. (b) 一方で, *SLFN11* 高発現細胞における DNA 修復機構は ATR に依存している可能性があるため, ATR 阻害により DNA 修復を阻害することでトラベクテジンの抗腫瘍活性を増強させる. (c) DNA メチル化阻害剤による *SLFN11* の発現量の回復もまた, トラベクテジンの抗腫瘍活性を増強させる. 以上のことから, *SLFN11* 低発現腫瘍におけるトラベクテジンとベルゾセルチブ又はデシタビンとの併用の有用性が示唆させる.

6. 参考文献

- 1 Demetri GD, von Mehren M, Jones RL, Hensley ML, Schuetze SM, Staddon A, Milhem M, Elias A, Ganjoo K, Tawbi H, Van Tine BA, Spira A, Dean A, Khokhar NZ, Park YC, Knoblauch RE, Parekh TV, Maki RG and Patel SR: Efficacy and safety of trabectedin or dacarbazine for metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of conventional chemotherapy: Results of a phase iii randomized multicenter clinical trial. *J Clin Oncol* 34(8): 786-793, 2016. PMID: 26371143. DOI: 10.1200/JCO.2015.62.4734.
- 2 Runnebaum IB, Reichert D, Ringsdorf U, Kuther M, Hesse T, Sehouli J and Wimberger P: Trabectedin plus pegylated liposomal doxorubicin (pld) for patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: A prospective, observational, multicenter study. *J Cancer Res Clin Oncol* 144(6): 1185-1195, 2018. PMID: 29623421. DOI: 10.1007/s00432-018-2637-1.
- 3 Blum JL, Goncalves A, Efrat N, Debled M, Conte P, Richards PD, Richards D, Lardelli P, Nieto A, Cullell-Young M and Delaloge S: A phase ii trial of trabectedin in triple-negative and her2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 155(2): 295-302, 2016. PMID: 26749361. DOI: 10.1007/s10549-015-3675-x.
- 4 Colmegna B, Uboldi S, Frapolli R, Licandro SA, Panini N, Galmarini CM, Badri N, Spanswick VJ, Bingham JP, Kiakos K, Erba E, Hartley JA and D'Incalci M: Increased sensitivity to platinum drugs of cancer cells with acquired resistance to trabectedin. *Br J Cancer* 113(12): 1687-1693, 2015. PMID: 26633559. DOI: 10.1038/bjc.2015.407.
- 5 Takebayashi Y, Pourquier P, Zimonjic DB, Nakayama K, Emmert S, Ueda T, Urasaki Y, Kanzaki A, Akiyama SI, Popescu N, Kraemer KH and Pommier Y: Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 7(8): 961-966, 2001. PMID: 11479630. DOI: 10.1038/91008.
- 6 Herrero AB, Martin-Castellanos C, Marco E, Gago F and Moreno S: Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the

- mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res* 66(16): 8155-8162, 2006. PMID: 16912194. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0179.
- 7 Soares DG, Escargueil AE, Poindessous V, Sarasin A, de Gramont A, Bonatto D, Henriques JA and Larsen AK: Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(32): 13062-13067, 2007. PMID: 17656556. DOI: 10.1073/pnas.0609877104.
- 8 Tavecchio M, Simone M, Erba E, Chiolo I, Liberi G, Foiani M, D'Incalci M and Damia G: Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer* 44(4): 609-618, 2008. PMID: 18243687. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.01.003.
- 9 Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT and D'Incalci M: Ecteinascidin-743 (et-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 37(1): 97-105, 2001. PMID: 11165136.
- 10 Simoens C, Korst AE, De Pooter CM, Lambrechts HA, Pattyn GG, Faircloth GT, Lardon F and Vermorken JB: In vitro interaction between ecteinascidin 743 (et-743) and radiation, in relation to its cell cycle effects. *Br J Cancer* 89(12): 2305-2311, 2003. PMID: 14676811. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601431.
- 11 Nam EA and Cortez D: Atr signalling: More than meeting at the fork. *Biochem J* 436(3): 527-536, 2011. PMID: 21615334. DOI: 10.1042/BJ20102162.
- 12 Zeman MK and Cimprich KA: Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 16(1): 2-9, 2014. PMID: 24366029. DOI: 10.1038/ncb2897.
- 13 Josse R, Martin SE, Guha R, Ormanoglu P, Pfister TD, Reaper PM, Barnes CS, Jones J, Charlton P, Pollard JR, Morris J, Doroshow JH and Pommier Y: Atr inhibitors ve-821 and vx-970 sensitize cancer cells to topoisomerase i inhibitors by disabling DNA replication initiation and fork elongation responses. *Cancer Res* 74(23): 6968-6979, 2014. PMID: 25269479. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3369.
- 14 Karnitz LM and Zou L: Molecular pathways: Targeting atr in cancer therapy. *Clin Cancer*

- Res *21(21)*: 4780-4785, 2015. PMID: 26362996. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0479.
- 15 Mertens F, Antonescu CR, Hohenberger P, Ladanyi M, Modena P, D'Incalci M, Casali PG, Aglietta M and Alvegard T: Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol* *36(4)*: 312-323, 2009. PMID: 19664492. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2009.06.004.
- 16 Friedman D, Hu Z, Kolb EA, Gorfajn B and Scotto KW: Ecteinascidin-743 inhibits activated but not constitutive transcription. *Cancer Res* *62(12)*: 3377-3381, 2002. PMID: 12067978.
- 17 Grohar PJ, Griffin LB, Yeung C, Chen QR, Pommier Y, Khanna C, Khan J and Helman LJ: Ecteinascidin 743 interferes with the activity of *ews-fli1* in ewing sarcoma cells. *Neoplasia* *13(2)*: 145-153, 2011. PMID: 21403840.
- 18 Nogales V, Reinhold WC, Varma S, Martinez-Cardus A, Moutinho C, Moran S, Heyn H, Sebio A, Barnadas A, Pommier Y and Esteller M: Epigenetic inactivation of the putative DNA/rna helicase *slfn11* in human cancer confers resistance to platinum drugs. *Oncotarget* *7(3)*: 3084-3097, 2016. PMID: 26625211. DOI: 10.18632/oncotarget.6413.
- 19 Zoppoli G, Regairaz M, Leo E, Reinhold WC, Varma S, Ballestrero A, Doroshow JH and Pommier Y: Putative DNA/rna helicase *schlafen-11* (*slfn11*) sensitizes cancer cells to DNA-damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109(37)*: 15030-15035, 2012. PMID: 22927417. DOI: 10.1073/pnas.1205943109.
- 20 Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Jr., de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R and

- Garraway LA: The cancer cell line encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483(7391): 603-607, 2012. PMID: 22460905. DOI: 10.1038/nature11003.
- 21 Mu Y, Lou J, Srivastava M, Zhao B, Feng XH, Liu T, Chen J and Huang J: Slfn11 inhibits checkpoint maintenance and homologous recombination repair. *EMBO Rep* 17(1): 94-109, 2016. PMID: 26658330. DOI: 10.15252/embr.201540964.
- 22 Murai J, Tang SW, Leo E, Baechler SA, Redon CE, Zhang H, Al Abo M, Rajapakse VN, Nakamura E, Jenkins LMM, Aladjem MI and Pommier Y: Slfn11 blocks stressed replication forks independently of atr. *Mol Cell* 69(3): 371-384 e376, 2018. PMID: 29395061. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.01.012.
- 23 Lima M, Bouzid H, Soares DG, Selle F, Morel C, Galmarini CM, Henriques JA, Larsen AK and Escargueil AE: Dual inhibition of atr and atm potentiates the activity of trabectedin and lurbinectedin by perturbing the DNA damage response and homologous recombination repair. *Oncotarget* 7(18): 25885-25901, 2016. PMID: 27029031. DOI: 10.18632/oncotarget.8292.
- 24 Murai J, Feng Y, Yu GK, Ru Y, Tang SW, Shen Y and Pommier Y: Resistance to parp inhibitors by slfn11 inactivation can be overcome by atr inhibition. *Oncotarget* 7(47): 76534-76550, 2016. PMID: 27708213. DOI: 10.18632/oncotarget.12266.
- 25 Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, Erba E, Uboldi S, Zucchetti M, Pasqualini F, Nebuloni M, van Rooijen N, Mortarini R, Beltrame L, Marchini S, Fuso Nerini I, Sanfilippo R, Casali PG, Pilotti S, Galmarini CM, Anichini A, Mantovani A, D'Incalci M and Allavena P: Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 23(2): 249-262, 2013. PMID: 23410977. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.01.008.
- 26 Reinhold WC, Varma S, Sunshine M, Rajapakse V, Luna A, Kohn KW, Stevenson H, Wang Y, Heyn H, Nogales V, Moran S, Goldstein DJ, Doroshow JH, Meltzer PS, Esteller M and Pommier Y: The nci-60 methylome and its integration into cellminer. *Cancer Res*

77(3): 601-612, 2017. PMID: 27923837. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0655.

27 Gardner EE, Lok BH, Schneeberger VE, Desmeules P, Miles LA, Arnold PK, Ni A, Khodos I, de Stanchina E, Nguyen T, Sage J, Campbell JE, Ribich S, Rekhman N, Dowlati A, Massion PP, Rudin CM and Poirier JT: Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an ezh2-slf11 axis. *Cancer Cell* 31(2): 286-299, 2017. PMID: 28196596. DOI: 10.1016/j.ccell.2017.01.006.

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、多大なる御支援のもと、懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました、徳島大学大学院 先端技術科学教育部 物質生命システム工学専攻 宇都 義浩 教授に心より感謝の意を表します。主査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を賜りました、徳島大学大学院 先端技術科学教育部 物質生命システム工学専攻 中村 嘉利 教授、並びに、副査としてご助言を戴くとともにご指導を賜りました、同専攻 松木 均 教授に心より感謝致します。

本研究の遂行に際し多大なる御助言と御協力を頂きました、大鵬薬品工業株式会社 長瀬 英貴 管理職、中川 文雄 管理職、小森 敏治 研究員、並びに、開発薬理研究室の皆様に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂き、御指導と御鞭撻を賜りました、大鵬薬品工業株式会社 岩沢 善一 前研究本部長、箱井 加津男 前研究副本部長、岡崎 真治 徳島エリア担当、松尾 憲一 薬理研究所長、内田 淳二 開発薬理研究室長、坂本 一樹 管理職に、厚く御礼申し上げますとともに心から感謝致します。

最後に、これまでの人生を暖かく見守ってくれた両親、家族に心より感謝致します。

2019 年7 月

岩崎 純也