

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名： 裴 俣嬉

専攻分野： 最新医学研究コース

指導教授： 遊道 和雄

主論文の題目：

PLK1 Overexpression Suppresses Homologous Recombination and Confers Cellular Sensitivity to PARP Inhibition

(PLK1 の過剰発現は相同組換えを抑制し、PARP 阻害に対する細胞感受性を付与する)

共著者：

Anna S. Sedukhina, Runa Sugiyama, Sarah J. Atanacio, Tatsuru Ohara, Masato Ishii, Kimino Minagawa, Romaan Akichjev, Fumie Go, Zayan Chandankeri, Zoran M. M. Janjetic, Eri Sato, Ayako Yamaura, Rei Meguro, Kishore Palanisamy, Ichiro Maeda, Osamu Takeuchi, Nao Suzuki, Kazuo Yudo, Juan A. Bernal, Ko Sato

緒言

Polo-like kinase 1 (PLK1)は細胞周期の調節および発癌に関与するキナーゼで、多くの種類の悪性腫瘍で過剰に発現しており、予後不良との関連が報告されている。このことから PLK1 過剰発現癌に対する効果的治療方法の確立が重要である。いくつかの PLK1 阻害剤が開発されたが臨床試験で好ましい結果が得られておらず、PLK1 を過剰発現する癌に対する新しい効果的治療の確立が重要である。本研究では、バイオインフォマティクスを用いて、相同組換え修復 [homologous recombination repair (HRR)] およびPARP阻害薬に対する感受性に PLK1 過剰発現がどのような影響を与えるかを、細胞株と臨床検体を用いて検討した。

方法・対象

2012年9月から2014年8月の間に聖マリアンナ医科大学病院で手術

を受け、病理組織学的に卵巣がんと診断された患者 18 例を対象とした。新鮮生検サンプルはコラーゲナーゼ処理により単細胞に分離し、96 ウェルプレートに 3,000 細胞/ウェルで播種した。Poly ADP-ribose polymerase (PAPR) 阻害薬オラパリブを各種濃度添加し、37°C で 1 週間培養後、CellTiter-Blue 試薬を用いて細胞生存率を測定して薬剤感受性を評価した。生検サンプルからは 3 μ m 厚のパラフィン切片も作成し、抗原賦活化を pH9.0 溶液中 95°C で 40 分間行った後に抗 PLK1 抗体と 60 分間反応させ免疫組織化学解析を行った。免疫染色は Histofine Simple Stain MULTI を用いて検出し、5 視野約 500 細胞を計数し H スコアにより PLK1 発現を定量した。

これらの得られた結果から (1) PLK1 発現が相同組換え修復 (homologous recombination ; HR) に及ぼす影響を検討するため、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データセットを用いて卵巣がん検体における PLK1 発現パターンを解析した。次に、(2) 上記の PLK1 発現レベルと HR deficiency (HRD) スコアとの相関を評価した。(3) 再現性検証として Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データセットを用い、当該研究検体の PLK1 発現と HRD スコアの相関を解析した。さらに、(4) PLK1 発現および PARP 阻害剤オラパリブに対する感受性データが利用可能な細胞株を対象に、PLK1 発現とオラパリブ IC50 値との関連を評価した。本研究では、T47D 細胞を用いて、親細胞、ベクターコントロール細胞、PLK1 過剰発現細胞を作製し、各細胞における DNA 二本鎖切断は γ H2AX フォーカス形成で、HR 活性は Rad51 フォーカス形成および CRISPR/Cas9 を用いた ASHRA アッセイにより評価した。(5) PLK1 キナーゼ活性の関与を検討するため、PLK1 野生型、キナーゼ不活性変異体 (T210A)、PLK1 阻害剤 BI2536、Aurora A 過剰発現条件下で解析を行った。本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得て実施された (承認 : 2623 号)。相関関係は Pearson 相関係数、二群間比較は Mann-Whitney U 検定で検討した。

結果

TCGA 解析において、PLK1 過剰発現が予後不良と関連することが報告されている卵巣がんでは、PLK1 発現と HRD スコアの間に統計学的に有意な正の相関が認められた ($r = 0.1951$, $p = 0.0012$)。この関連は CCLE 解析でも再現され、PLK1 発現と HRD スコアと正の相関 ($r = 0.07436$,

p = 0.0233) を示し、さらに PLK1 発現とオラパリブ IC50 値との間には有意な負の相関を示した ($r = 0.2180$, $p < 0.0001$)。また、T47D 細胞では、PLK1 過剰発現は γ H2AX フォーカス形成には影響を与えなかったが、Rad51 フォーカス形成および ASHRA で評価される HR 活性を著しく抑制した。

また、PLK1 過剰発現細胞は PARP 阻害剤に対する感受性の増加を示した。これらの効果は PLK1 野生型および Aurora A 過剰発現で認められたが、T210A 変異体や BI2536 処理では認められなかった。卵巢癌患者検体由来細胞を用いた実験においても、PLK1 高発現例では PARP 阻害剤に高感受性を示した ($p = 0.018$)。

考察

本研究は、PLK1 の過剰発現が HR を抑制し、PARP 阻害剤に対する高感受性に関連することを示した。これらの結果は、PLK1 過剰発現を伴う予後不良腫瘍において、PARP 阻害剤治療の適応拡大につながる可能性を示唆している。一方で、PLK1 発現低下が治療過程における獲得抵抗性に寄与する可能性や、PLK1 阻害剤が PARP 阻害効果を減弱させる可能性も示唆された。PLK1 過剰発現が HR 抑制を介して腫瘍の悪性化に寄与しているかについては、今後さらなる機構解析および臨床的検証が必要である。