

## 146. Chk2 による温熱誘発細胞死調節機構の解明

古澤 之裕

富山県立大学 工学部 教養教育 生物学教室

Key words : Hyperthermia, DNA damage response, Chk2, p53, Cell cycle

### 緒言

温熱療法は、ハイパーサーミアとも呼ばれ、古くから癌治療に用いられている。温熱による癌細胞の分子応答を理解することは、臨床におけるハイパーサーミアの治療成績を向上すると期待され、数10年の間研究が進められている<sup>1)</sup>。熱によるタンパクの変性が温熱の主要な生物作用を示す機序として知られており、それに伴う活性酸素の産生やDNA修復タンパクの阻害が、塩基損傷、DNA一本差切断を引き起こし、またまだ議論の段階ではあるがDNA二本鎖切断を引き起こすのではないかとされている。細胞はDNA損傷に対し、DNA損傷応答経路と呼ばれる分子機構を以て、細胞を生存させるようなシグナル伝達経路を活性化する<sup>2)</sup>。仮にDNA損傷が重篤な場合、細胞はアポトーシスと呼ばれる細胞の自己死を起こす。がん抑制遺伝子であるp53は、DNA損傷により活性化される上流のキナーゼであるAtaxia telangiectasia mutated (ATM)、ATM and Rad3 related (ATR) やチェックポイントキナーゼ2 (Chk2) により翻訳後修飾を受け、この経路の主要な部分を担っている<sup>3)</sup>。これまで、放射線によるDNA損傷に対して、ATMやChk2はp53を介した細胞死の誘導に関わることが示されている。p53は、温熱による細胞周期の停止や細胞死の誘導に関与することが知られているが、p53上流のキナーゼがこの応答にどのように寄与しているかは不明である。本研究では、野生型p53を有するMolt-4細胞(Molt-4/V)と、p53をノックダウンしたMolt-4/shp53細胞を用いて、温熱により活性化するChk2が細胞周期停止や細胞生存に関与しているか検討した。

### 方法

ATM阻害剤としてKU55933、ATR阻害剤としてVE-821、Chk2阻害剤としてChk2 inhibitor IIを用いた。これらの阻害剤はCalbiochem社およびSigma社から入手した。

Molt-4/V細胞およびMolt-4/shp53細胞は、徳島大学の森田明典教授より分与頂いた<sup>4)</sup>。Molt-4細胞は、10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地で培養した。温熱処理は、恒温槽を用いて、44℃30分間行った。

ウェスタンブロット法は、既報の論文に記載の方法に基づき行った<sup>5)</sup>。本研究に使用した一次抗体は以下の通りである。

Anti-ATM pS1981 monoclonal antibody (mAb; Epitomics, Burlingame, CA, USA), anti-ATM polyclonal antibody (pAb; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ATR pS428 pAb (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-ATR mAb (Genetex, Irvine, CA, USA), anti-Chk1 S345 pAb (Cell Signaling Technology), anti-Chk1 mAb (MBL, Nagoya, Japan), anti-Chk2 T68 pAb (Cell Signaling Technology), anti-Chk2 mAb (MBL), anti-caspase-3 pAb (Cell Signaling Technology), anti-p53 pAb (Cell Signaling Technology), anti-p53 AcK382 (Cell Signaling Technology), anti-p53 S15 pAb (Cell Signaling Technology), anti-p53 S20 mAb (MBL), anti-PUMA pAb (Cell Signaling Technology), anti-p21 (MBL), anti-CDC25A mAb (MBL), anti-CDC25C pAb (Cell Signaling Technology), and anti-GAPDH mAb (as a loading reference; Organon Teknika, Durham, NC).

細胞周期は、Propidium Iodide (PI) もしくは SYTOX AAdvanced (ThermoScientific 社) を用いて、フローサイトメトリーにて解析した。また細胞死は、Annexin V-FITC (Nacalai Tesque 社) を用いて、フローサイトメトリーにて解析した。

統計解析は、二群間の比較については、Fischer 検定の後、Student の t 検定もしくは Welch の t 検定を選択して行った。三群間以上の比較については、分散分析の後、テューキー法にて検定を行った。

## 結果

### 1. 両細胞の温熱による DNA 損傷応答タンパクの発現

まず、両細胞において、温熱処理 (Heat stress) 下での DNA 損傷応答タンパクの発現や活性化を調べた。

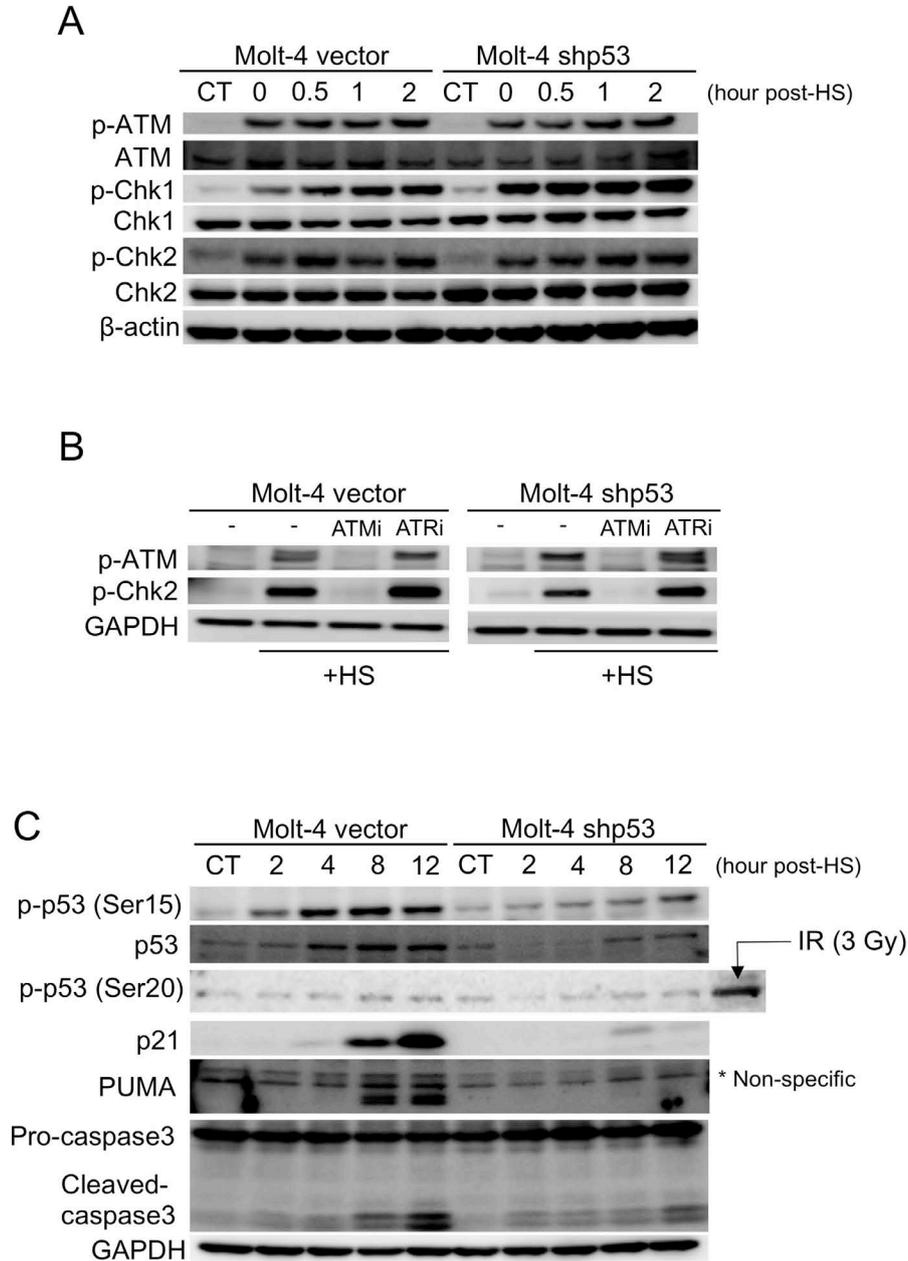


Fig. 1. Western blotting of DDR proteins in Molt-4/V and Molt-4/shp53 cells after heat stress at 44°C for 30 min (A) Phosphorylation of ATR, Chk1, ATM, and Chk2 0–2 h after heat stress (HS). (B) Effects of ATM or ATR inhibitors on ATM and Chk2 phosphorylation induced by HS. Cells were pretreated with 10 μM Ku55933 (ATMi) or VE-821 (ATRi) 30 min before HS exposure. Cells were harvested 30 min after HS. (C) HS-induced p53 response and caspase-3 cleavage 2–12 h after HS. Cells 6 h after IR exposure were used as positive control for phospho-p53 at serine 20.

DNA 損傷応答経路の分子である ATM、ATR、Chk1 および Chk2 について、両細胞における発現の差はみられなかった。また温熱によるリン酸化の誘導についても、顕著な差を認めなかったことから、両細胞においてはこれら p53 の上流因子について差はないことが確認できた。ATM 阻害剤は Chk2 のリン酸化をほぼ消失させた一方、ATR 阻害剤は Chk2 のリン酸化をむしろ増強していた。このことから、温熱により活性化する Chk2 は、ATM 依存的であると考えられた。p53 の抑制は、p21 の発現を抑制し、G2/M 期で停止する細胞の割合を増加させていた。

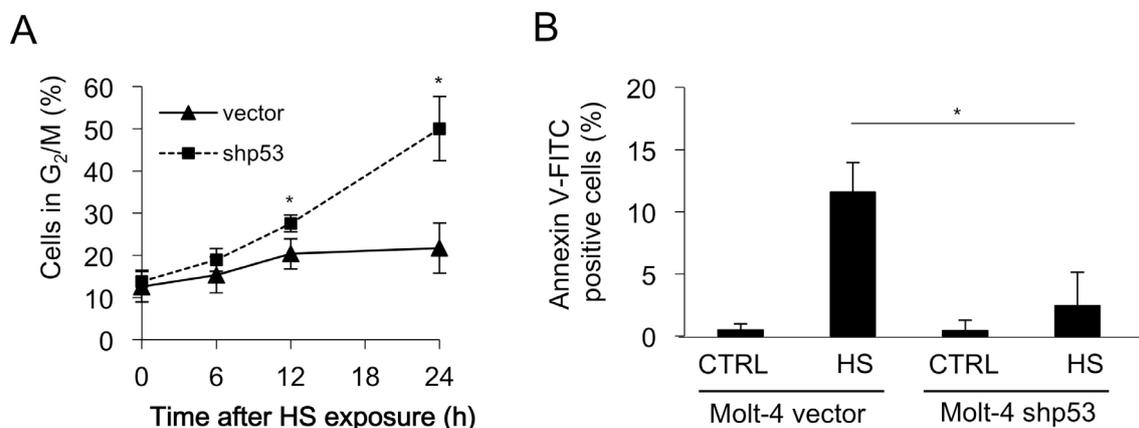


Fig. 2. Induction of cell cycle arrest and cell death in Molt-4/V and Molt-4/shp53 cells after HS (A) Percentage of cells in the G2/M phase, as detected by PI-based DNA staining 6 - 24 h after HS (means  $\pm$  SDs, n = 3). (B) HS-induced cell death detected by Annexin V (AnV)-FITC staining after HS exposure (means  $\pm$  SDs, n = 3). Recovery duration after HS was 12 h. \*P < 0.05

加えて、p53 抑制により温熱誘発細胞死の割合が低下しており、両細胞の比較は温熱による p53 応答の検討に適していると考えられた。

## 2. Chk2 阻害による p53 応答への影響

Chk2 は p53 の Ser20 のリン酸化や、Lys382 のアセチル化に寄与することがこれまで報告されている<sup>6)</sup>。温熱による p53 Ser20 のリン酸化は放射線によるものと比べて非常に弱かったものの、Lys382 のアセチル化は顕著に認められた。

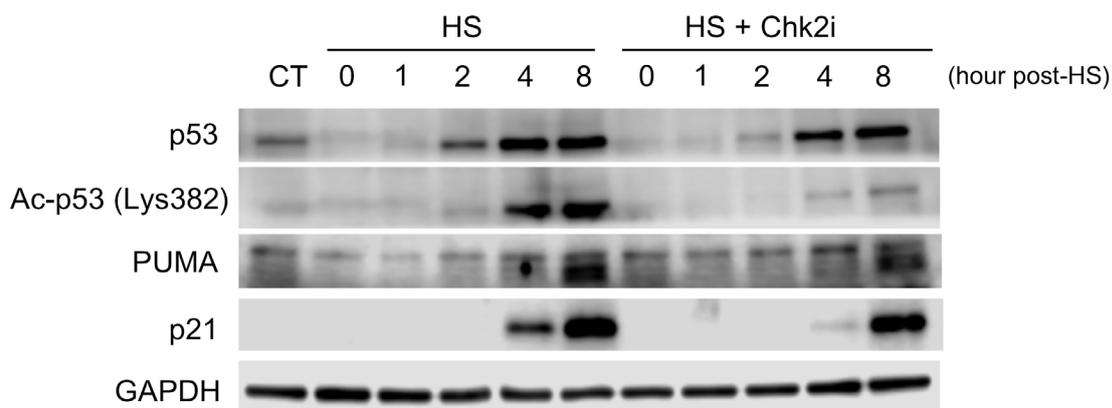


Fig. 3. The role of Chk2 in the p53 response after HS Effects of Chk2 inhibitors on HS-induced p53 acetylation, accumulation, and p53 target molecules in Molt-4/V cells. Cells were pretreated with 10  $\mu$ M Chk2 inhibitor II (Chk2i) 30 min before HS exposure.

Chk2 阻害剤により、p53 Lys382 のアセチル化は抑制され、下流の p21 や PUMA の発現が遅延した。しかしながら、Chk2 阻害は、温熱処理した Molt-4/V 細胞における細胞周期の分布や、死細胞の割合に影響を及ぼさなかった。一方、Chk2 阻害は Molt-4/shp53 細胞における温熱誘発細胞死を増強し、G2/M 期の停止を解除していた。

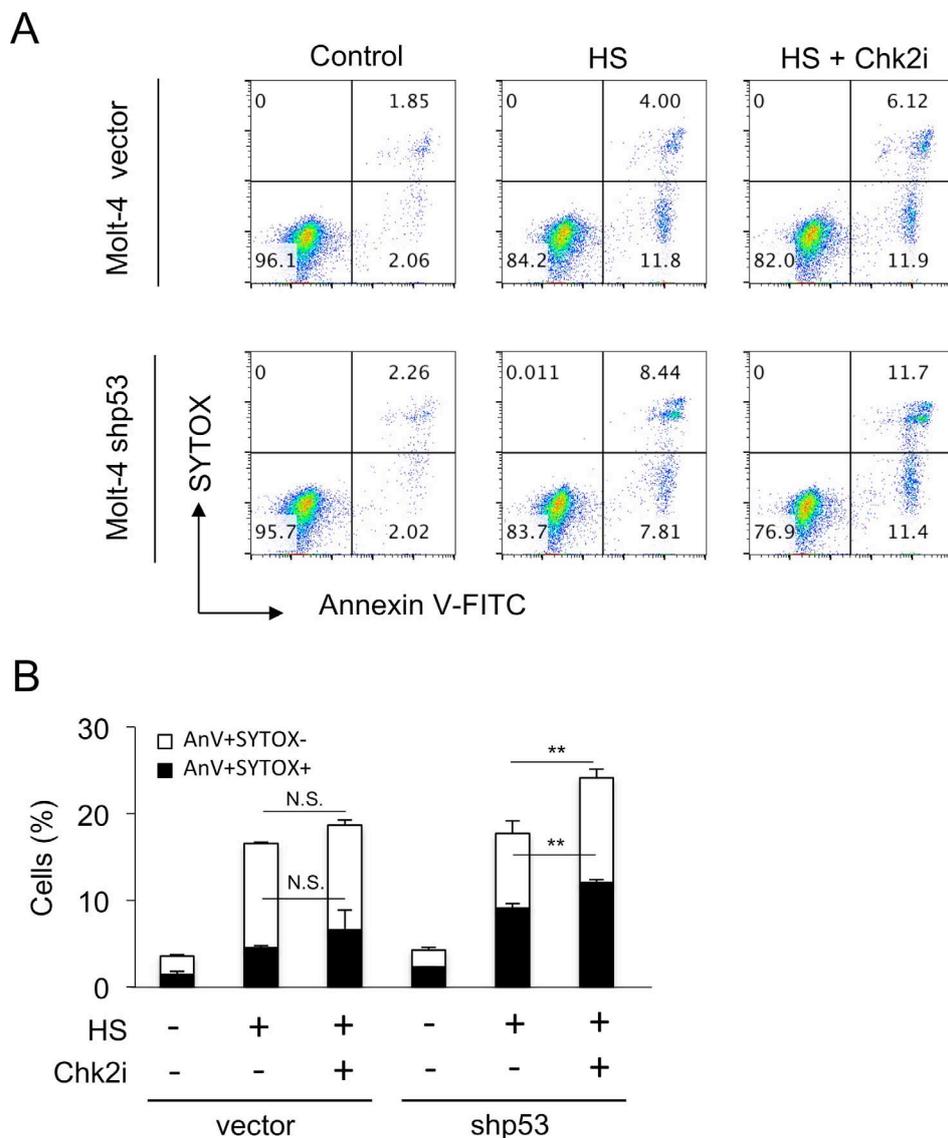


Fig. 4. The role of Chk2 in p53-dependent and -independent cell death  
 (A) Typical histograms and (B) profiles of HS-induced cell death detected by AnV-FITC/SYTOX AADvanced (SYTOX) staining after HS exposure (means  $\pm$  SDs, n = 3). \*\*P < 0.01; N.S.: not significant. Molt-4/V and Molt-4/shp53 cells were pretreated with Chk2i 30 min before HS and were then allowed to recover for 16 h, followed by cell death analysis.

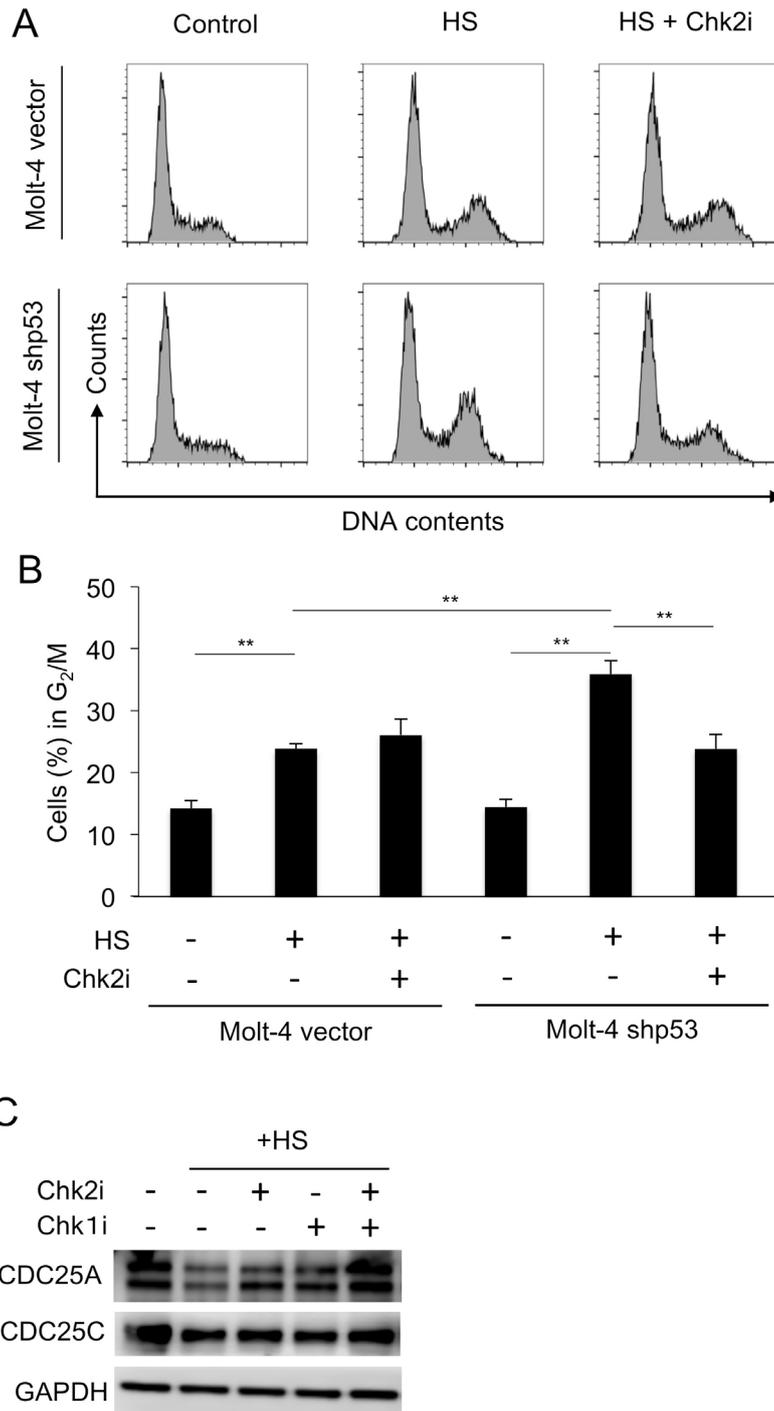


Fig. 5. Effects of the Chk2 inhibitor on HS-induced G<sub>2</sub>/M arrest

(A) Typical cell cycle histograms and (B) percentage of cells in the G<sub>2</sub>/M phase in Molt-4/V and Molt-4/shp53 cells. Cells were pretreated with Chk2i and then exposed to HS followed by cell cycle analysis. The duration of recovery time after HS exposure was 16 h (means  $\pm$  SDs, n = 3). \*\*P < 0.01. (C) Western blotting of CDC25A and CDC25C in Molt-4/shp53 cells pretreated for 30 min with Chk1i and Chk2i. Cell extracts were prepared 1 h after HS exposure.

このことから、Chk2の阻害はp53の機能に異常をきたしている癌細胞において、温熱の効果を増強する作用があるのではないかと考えられた。

### 3. Chk2 阻害による CDC25A の分解抑制

p53 変異・欠損細胞では、G1 期停止に関わる p21 の発現が減弱しており、Chk1/2 による G2/M 期での細胞周期停止に依存していることが知られている<sup>7)</sup>。ここでは、Chk2 の標的として報告のある Cell division cycle 25 A (CDC25A) および CDC25C に着目し、Chk2 阻害がこれらの発現を回復させるか検討した。温熱により、CDC25A および CDC25C の分解がみられたが、Chk1 や Chk2 の阻害剤は CDC25A の発現を回復させた。一方、CDC25C については影響が見られず、温熱処理した細胞では Chk1/2 が CDC25A を介して細胞周期の調節をしていると考えられた。さらに、Chk1 および Chk2 阻害剤の組み合わせは、単独で処理した際より CDC25A の発現をより回復させたことから、Chk1 と Chk2 が協調的に CDC25A を介した G2/M 期の停止に関わっていると考えられた。

## 考 察

本研究より、温熱により活性化する Chk2 は p53 の N 末端側のアセチル化に関与し、p53 標的分子の発現誘導に関わるものの、細胞周期の停止や細胞死には影響を及ぼさないことがわかった<sup>8)</sup>。p53 は Chk2 以外にも MAP キナーゼなど様々な酵素により活性調節を受けることがわかっており<sup>9)</sup>、温熱処理下では Chk2 以外の分子の関与が大きいものと思われる。一方、Chk2 は p53 ノックダウン細胞において、CDC25A の発現調節を介した細胞周期停止に関与していることがわかった。p53 は半数以上の癌において変異もしくは欠失がみられることから、Chk2 はこれらのがんにおける温熱療法の選択的な分子標的となる可能性が考えられる。一方、なぜ温熱による p53 の Ser20 のリン酸化が、放射線によるものと比べて非常に弱いか、また CDC25C の発現調節をいずれの分子が担っているのかは不明のままであり、今後の研究が必要である。

## 文 献

- 1) Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 2015 Nov;20(11):1411-9. doi:10.1007/s10495-015-1168-3. Review. PubMed PMID: 26354715.
- 2) Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007 Dec 14;28(5):739-45. Review. PubMed PMID: 18082599.
- 3) Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct; 9(10):714-23. doi: 10.1038/nrc2716. Epub 2009 Sep 4. Review. PubMed PMID: 19730431.
- 4) Morita A, Yamamoto S, Wang B, Tanaka K, Suzuki N, Aoki S, Ito A, Nanao T, Ohya S, Yoshino M, Zhu J, Enomoto A, Matsumoto Y, Funatsu O, Hosoi Y, Ikekita M. Sodium orthovanadate inhibits p53-mediated apoptosis. *Cancer Res*. 2010 Jan 1;70(1):257-65. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3771. PubMed PMID: 20048077.
- 5) Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Zhao QL, Tabuchi Y, Nomura T, Kondo T. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and promotes apoptosis under heat stress. *Apoptosis*. 2012 Jan;17(1):102-12. doi:10.1007/s10495-011-0660-7. PubMed PMID: 22080164.
- 6) Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*. 2014 Dec;6(6):442-57. doi: 10.1093/jmcb/mju045. Epub 2014 Nov 17. Review. PubMed PMID: 25404613; PubMed Central PMCID: PMC4296918.
- 7) Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*. 2003 May;3(5): 421-9. Review. PubMed PMID: 12781359.
- 8) Furusawa Y, Yamanouchi Y, Iizumi T, Zhao QL, Mitsunashi Y, Morita A, Enomoto A, Tabuchi Y, Kondo T. Checkpoint kinase 2 is dispensable for regulation of the p53 response but is required for G2/M arrest and cell survival in cells with p53 defects under heat stress. *Apoptosis (in press)*
- 9) Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 Oct;9(10): 749-58. doi: 10.1038/nrc2723. Review. PubMed PMID: 19776744; PubMed Central PMCID: PMC2771725.