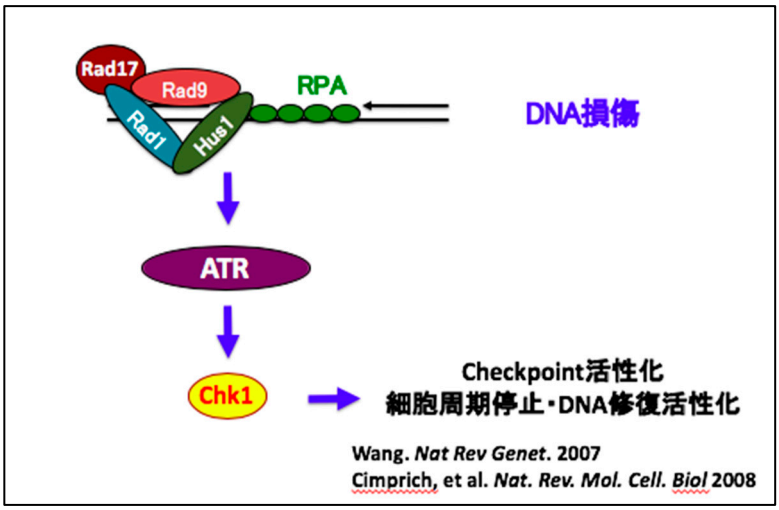
204　ATR-Chk1経路阻害による5-FU効果増強に基づく画期的治療	藤中　良彦

【目的】5-フルオロウラシル（5-FU）は、長年にわたり固形癌、特に消化器癌の治療において抗がん剤の第一選択として重要な位置を占めてきた。5-FU は AtaxiatelangiectasiaｰmutatedandRad3-relatedkinase（ATR）を介して、DNA 損傷応答において細胞周期チェックポイントと DNA 修復における主要な仲介役を果たす Chk1 を活性化することが報告されている。ATR は、主に replicationproteinA（RPA）におおわれた 1 本鎖 DNA において、ATR interacting protein（ATRIP）を介した安定な結合を通じて活性化される。Rad9 と Rad17 は、一本鎖 DNA を覆っている RPA による ATR と Chk1 の活性化の重要因子である。5-FU 感受性における Chk1 の役割については、ヒト細胞株 HeLa で siRNA を用いて Chk1 を阻害すると 5-FU による S 期チェックポイントが機能せず、DNA 合成がそのまま継続することで DNA 二重鎖切断の蓄積につながり、その結果 5-FU による細胞殺傷効果を亢進することが観察されている。本研究の目的は、ATR-Chk1 シグナル経路をターゲットとした癌細胞特異的な治療の開発とそのための 5-FU 系抗癌剤の効果を高める癌細胞特異的な経路を解明することである。
【方法】1．ニワトリ B 細胞株 DT40 野生型を 5-FU 刺激し、その細胞内応答ウェスタンブロッティング、コロニーサバイバルアッセイ、γH2AX 蛍光免疫染色で評価する。2．Chk1 キナーゼ阻害薬である UCN-01 投与下での 5-FU 感受性、細胞応答を同様に評価する。3．ニワトリ B 細胞株 DT40 野生型に加えて *Rad9* 欠損細胞株、*Rad17* 欠損細胞株を 5-FU 刺激し、その感受性、細胞応答について上記と同様の評価を行う。
【結果】ATR-Chk1 経路を阻害することで 5-FU 感受性の増強を認めた。また、Rad9／Rad17 非依存的な Chk1 キナーゼ活性経路が存在し、それが 5-FU 感受性を規定する可能性が示唆された。

DNA 損傷と ATR-Chk1 経路の活性化



204. ATR-Chk1 経路阻害による 5-FU 効果増強に基づく画期的治療

藤中　良彦

*国立病院機構 九州医療センター 消化管外科・がん臨床研究部

Key words：5-FU，感受性増強，ATR-Chk1 経路

緒　言

胃癌・大腸癌などの消化器癌治療における抗癌剤治療の進歩は著しく、生存期間の延長や縮小効果によって切除不能例が切除可能となる症例も報告されている。それらには抗 VEGF 抗体や抗 EGFR 抗体などの分子標的薬の出現が寄与する部分も多いと考えられるが、依然として 5-FU は抗癌剤治療のキートドラッグであり［1］、その抗腫瘍効果を高めることは消化器癌の予後改善に大きく貢献すると考えられる。ATM-p53 経路に変異や欠損を認める癌細胞は、ATR 阻害剤単独ないしは抗癌剤と併用することで感受性を示すことが報告されている［2］。臨床においては多くの癌が p53 異常を認めることから、その臨床応用が期待されている。実際に ATR 阻害剤は、肺癌においては cisplatin、gemcitabine、etoposide との併用か、乳癌においては cisplatin との併用が Phase Ⅰ／Ⅱ試験が行われており、その結果が注目されている。また、慢性リンパ性白血病患者から採取した *ATM* 欠損細胞が ATR シグナル経路阻害によって合成致死が得られたという報告もある。5-FU は ATR-Chk1 路を刺激することが報告されており［3，4］、同経路をターゲットとした癌細胞特異的な抗癌剤の感受性増強は、その治療効果の向上や正常細胞への副作用軽減などで臨床応用されれば非常に重要な位置付けとなり、臨床的意義が高い。また、ATM-p53 経路に関わる因子の変異はバイオマーカーとなるため precision medicine の観点からも発展性が高いと考えている。本研究の目的は、ATR-Chk1 シグナル経路をターゲットとした癌細胞特異的な治療の開発とそのための 5-FU 系抗癌剤の効果を高める癌細胞特異的な経路を解明することである。

方　法

1. 細胞株：ニワトリ B 細胞株 DT40 野生型と各種変異型（rad9、rad17）を使用した［5］。
2. ウェスタンブロッティングと抗体：抗体は Chk1、リン酸化セリン 345 Chk1、β-actin、チミジル酸合成酵素（TS）を使用した。
3. コロニーサバイバルアッセイ：各種濃度・時間の 5-FU を加えた培養液で細胞を培養し、薬剤を含まない培養液で 2 回洗浄した。適切な数の細胞をメチルセルロース含有の培養液で培養した。1～2 週間培養器で培養し、形成されたコロニー数をカウントした。実験は各々3 回ずつ行った［5］。
4. 蛍光免疫染色：5-FU 刺激後に培養細胞をサイトスピンしてスライドを作製した。その後各種抗体で免疫染色を行ったのちに二次抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。核内フォーカスを 5 個以上形成したものを陽性とし、各々500 個以上の細胞をカウントした。
5. Annexin V-FITC を用いたアポトーシス検出：アポトーシスは annexin V-FITC apoptosis detection kit を用いた。annexin V-FITC 陽性で PI 陰性の細胞をアポトーシス細胞とした。実験は各々3 回ずつ行った。
6. 中性コメットアッセイ：Comet Assay kit を用いて行った［6］。コメット長は CometScore software を用いて計測した。

*現在の所属：飯塚病院

結果と考察

DT40 細胞を 16 時間 5-FU 刺激すると、濃度依存的に γH2AX 核内フォーカス形成が誘導され、その最大は 160μM であった（図 1）。また、Chk1 の 345 番目のセリンも濃度依存的にリン酸化された（図 2）。TS が阻害されている指標である三元複合体は 5-FU 濃度が 20μM（16 時間刺激）で十分に形成されていることから、低い 5-FU 濃度でも TS が三元複合体を形成するのには十分であることがわかり、それ以上の 5-FU 濃度での DNA 損傷は FdUTP の DNA への誤挿入によるものであることが示唆された。つまり、低い 5-FU 濃度で TS が完全に阻害されているとすれば、5-FU 濃度が上昇するほど、細胞内の dUTP ではなく、FdUTP 濃度が上昇すると考えられるからである。

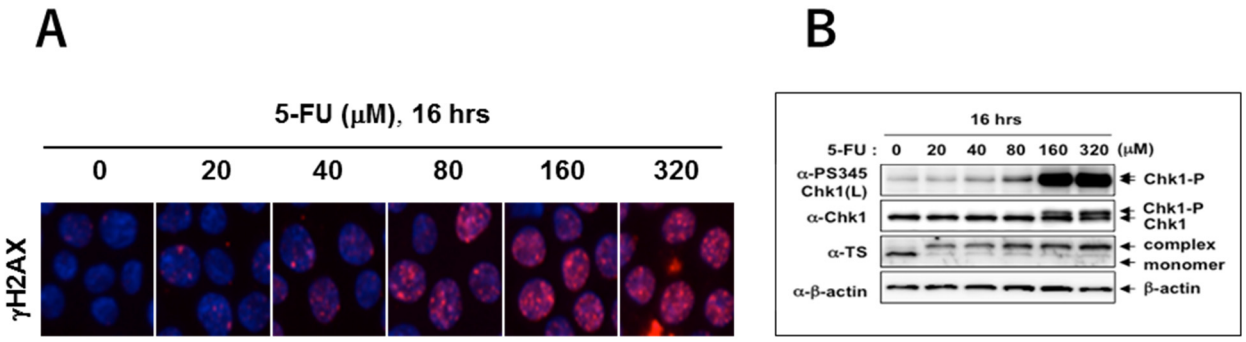


図 1. 5-FU に対する DT40 細胞内応答

A） 濃度依存的に γH2AX 核内フォーカス形成が誘導された。

B） 濃度依存的に Chk1 のリン酸化が誘導された。

Chk1キナーゼ阻害剤であるUCN-01の存在下で、コロニーサバイバルアッセイを行った。UCN-01を加えることで5-FU感受性が増強した（図2A）。野生型細胞を5-FU濃度20μMで刺激した条件下では、UCN-01を加えることでγH2AXのフォーカス形成が増強され（図2B）、コメット長が伸長した（図2C）。このことは、Chk1キナーゼを阻害した状況では5-FUによりDNA二重鎖切断が誘導されることを示唆した。

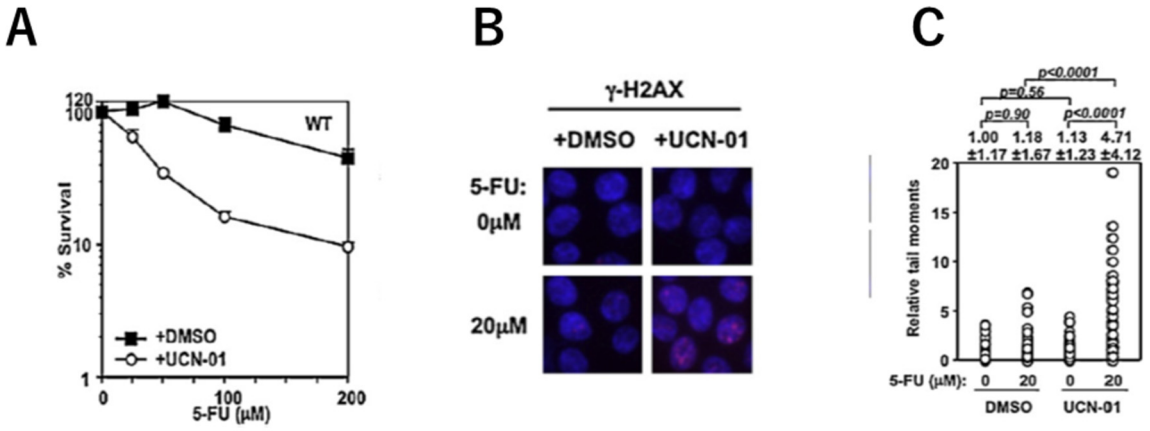


図 2. Chk1 阻害による 5-FU 感受性の増強

A） UCN-01 により 5-FU 感受性が増強された。

B） UCN-01 投与下では 5-FU による γH2AX のフォーカス形成が増強された。

C） UCN-01 投与下では 5-FU によるコメット長が伸長した。統計処理はマン・ホイットニーの U 検定。

Rad9 と Rad17 は、RPA におおわれた一本鎖 DNA によって活性化される ATR-Chk1 経路において重要な役割を担っている。Rad9 と Rad17 が 5-FU による DNA 損傷応答および感受性にどのように関与しているかを明らかにするため、*Rad9*、*Rad17* 欠損 DT40 を用いて 5-FU に対する細胞応答を調べた。コロニーサバイバルアッセイでは、*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株で野生型と比較して、5-FU に対する感受性の増強が見られた.（図 3A）。さらに野生型と比較して、γH2AX 核内フォーカス形成も増強された（図 3B）。5-FU による Chk1 の 345 番のセリンのリン酸化が、特に高濃度域（80～200 μM）で阻害されていた（図 3C）。5-FU 濃度 40 μM で刺激すると、20%弱がアポトーシスに至り、γH2AX 陽性細胞数も野生型と比較して増加していた（図 3D）。コメットアッセイでは、5-FU 濃度 40 μM 刺激により野生型で観察されなかったコメット長の伸長を認めた（図 3E）。このことから、Rad9 および Rad17 に変異がある状況で、DNA 二重鎖切断を含めた重篤な DNA 損傷にさらされると、よりアポトーシスが誘導されやすくなると考えられた。

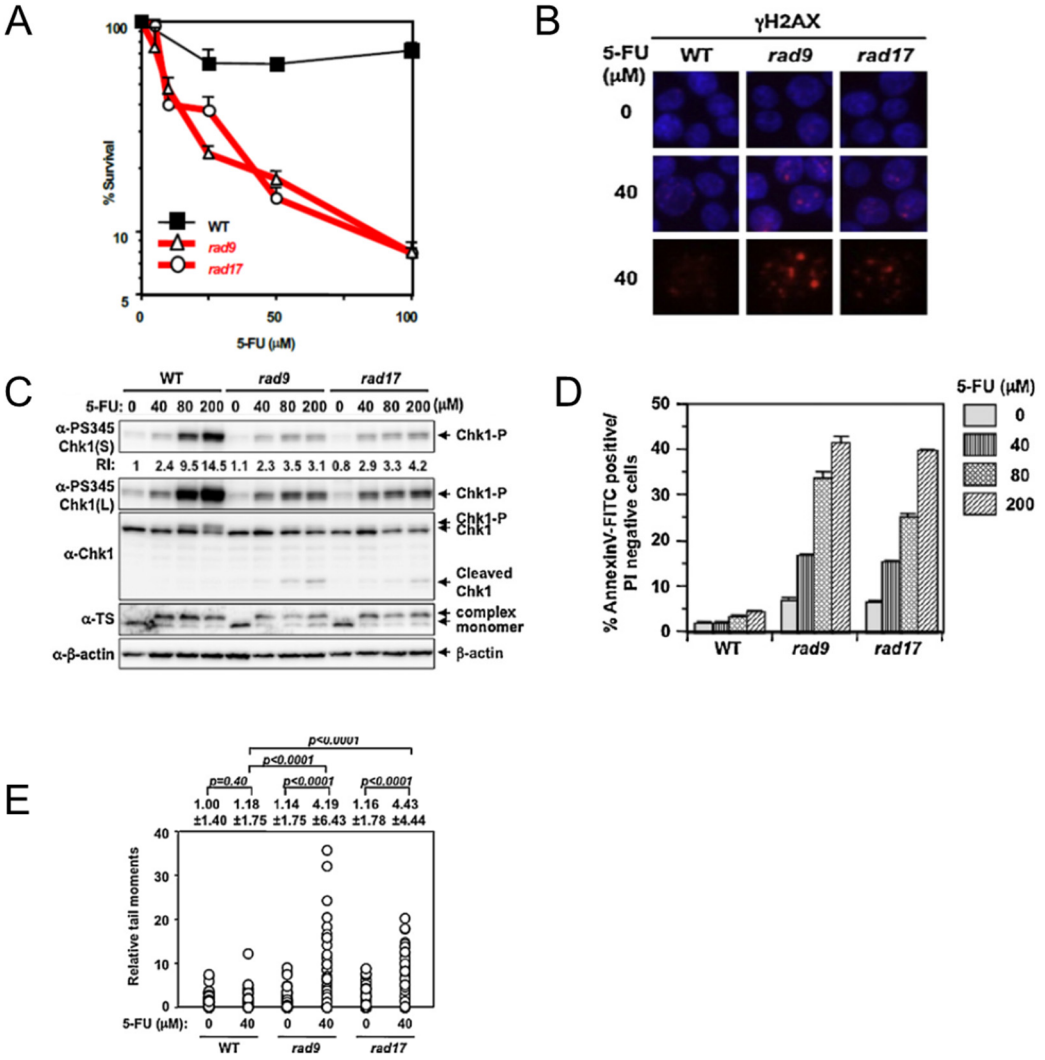


図 3. *Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞における 5-FU 感受性の増強。

A）*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株で野生型と比較して、5-FU に対する感受性の増強が見られた。

B）*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株で野生型と比較して、γH2AX 陽性細胞数は増加した。

C）*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株では 5-FU による Chk1 の 345 番のセリンのリン酸化が阻害されていた。

D）*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株で野生型と比較して、濃度依存的にアポトーシスする細胞数が増加した。

E）*Rad9* 欠損、*Rad17* 欠損細胞株で野生型と比較して、5-FU 濃度 40 μM 刺激によりコメット長の伸長を認めた。統計処理はマン・ホイットニーの U 検定。

*Rad9*欠損、*Rad17*欠損細胞で 5-FU による DNA 損傷が増強されることは、Chk1 活性化が阻害されているためであるように思われる。しかしながらこれらの細胞でも Chk1 は弱いながらもリン酸化されており、機能していると考えられる（図 3C）。そこで、この残存している Chk1 キナーゼ活性を阻害することで 5-FU 感受性にどのような影響を与えるか、UCN-01 を用いてコロニーサバイバルアッセイを行った。UCN-01 を追加することで*Rad9*欠損、*Rad17*欠損細胞株において 5-FU 感受性とγH2AX 核内フォーカス形成が増強された（図 4A、B）。Rad9／Rad17 非依存的な Chk1 キナーゼ活性経路が存在し、それが 5-FU 感受性を規定する可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科の沖英次と、国立病院機構九州医療センターがん臨床研究部長の楠本哲也である。

文　献

1） Wyatt MD, Wilson DM 3rd. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. Cell Mol Life Sci. 2009 Mar;66(5):788-99. PMID: 18979208 doi: 10.1007/s00018-008-8557-5.

2） PM Reaper, et al. Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR. Nat Chem Biol. 2011 Apr 13;7(7):428-30.　PMID: 21490603　doi: 10.1038/nchembio.573

3） Dai Y, Grant S.　New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):376-83.. Epub 2010 Jan 12. PMID: 20068082　doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1029

4） Cimprich KA[1], Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Aug;9(8):616-27 Epub 2008 Jul 2. PMID: 18594563　doi: 10.1038/nrm2450

5） Robinson HM, Jones R, Walker M, Zachos G, Brown R, Cassidy J, Gillespie DA. Chk1-dependent slowing of S-phase progression protects DT40 B-lymphoma cells against killing by the nucleoside analogue 5-fluorouracil. Oncogene. 2006 Aug 31;25(39):5359-69. Epub 2006 Apr 17. PMID: 16619043 doi: 10.1038/sj.onc.1209532

6） Sakasai R, Teraoka H, Takagi M, Tibbetts RS. Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. J Biol Chem. 2010 May 14;285(20):15201-8. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20304914 doi: 10.1074/jbc.M110.101808.