

がん病態形成に関与する Chk1 標的因子の解析

山口大学 共同獣医学部 生体機能学講座 獣医生化学
島田 緑

1. はじめに

緒言

乳癌は日本人女性が罹患する悪性腫瘍の第1位であり、その罹患数ならびに死亡数は増加の一途を辿っている。近年、ホルモン療法ならびに抗HER2療法といった分子標的治療の飛躍的進歩により乳癌患者の生存率は大きく向上した。しかしトリプルネガティブ乳癌に対しては、薬物療法は化学療法に限定され、その予後は極めて不良であることから、有効な分子標的治療の開発が緊急課題となっている。

DNA損傷応答機構は乳癌などの癌治療で注目されている化学療法の標的である。申請者はこれまで Chk1(checkpoint kinase 1)を中心としたDNA損傷応答の研究に携わってきた (ref 1, 2)。Chk1はDNA複製、DNA損傷チェックポイント、転写調節など多くの生命現象に関わる必須な機能を持ち、Chk1の変異により発がんの原因となる染色体不安定化を引き起こす。しかしながら一方でChk1はがん細胞の恒常性維持に寄与する。実際にトリプルネガティブ乳癌では高活性化しており、Chk1の活性化状態と乳癌の悪性度には正の相関がある。Chk1のキナーゼ活性を抑制する様々な抗がん剤が開発されてきたが、正常細胞の生存にも影響を与えてしまうため、有効な治療法とはいえない。したがってがん細胞特異的なChk1の機能に着目した新たな阻害薬開発が必要である。本研究では新たな抗がん剤を創出することを目指し、Chk1のがん細胞特異的な機能制御に関わる因子 ICP1(Interaction partner of Chk1 Protein 1)を取得し、機能解明を行った。

目的

私はがん細胞特異的なChk1の機能解明を通して、がんで高活性化されているChk1の下流因子を標的とした、新たな分子標的薬の創出を目指し、Chk1と相互作用する因子やリン酸化標的因子を網羅的スクリーニングにより取得した。そのスクリーニングで見出したヒストンバリエントH2AXの新規リン酸化Ser121は、活性化型AuroraBのセントロメアへの効率よいリクルートに関わり、AuroraBの時空間的な活性化に重要であることを発見した (ref 3)。さらに、Chk1と相互作用する因子として取得した分子について解析を行った。ICP1はプロリン異性化酵素であり、正常細胞の増殖には必要なく、悪性度の高い乳癌細胞の増殖に必須であるという重要な結果を得た。ICP1の機能や異性化ターゲット分子はこれまでほとんど解明されておらず、臨床において阻害薬の研究開発は実施されていない。本研究は、ICP1の機能解明の成果からがん細胞の増殖制御機構を解明し、新規阻害薬を創出することで新たな抗がん治療法を確立することを目指す。

2. 方法

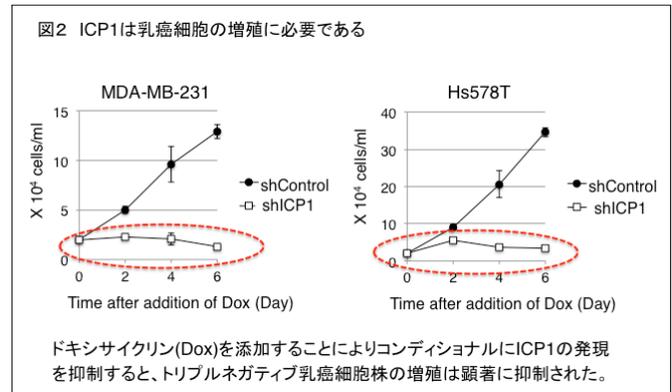
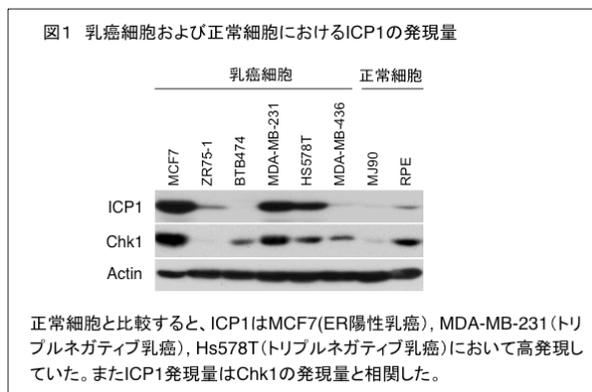
正常細胞および複数の乳がん細胞株を入手し、Chk1標的因子の発現を比較した。さら各細胞においてレンチウイルスを用いてコンディショナルに発現を抑制し、増殖における標的因子の重要性を検討した。G2/M期チェックポイントについては、G2/M期マーカーであるヒストンH3-Ser10のリン酸化陽性細胞をFACSによって測定した。ICP1の酵素活性を阻害する阻害剤を名古屋市立大学薬学研究科川口充康助教、中川秀彦教授との共同研究

で合成した。

3. 研究成果

(1) 複数の乳がん細胞株で標的因子の発現や阻害による効果

MCF7 (Luminal A; p53 wild type)、MDA-MB-231 (トリプルネガティブ; p53 mutation)、Hs578T (トリプルネガティブ; p53 mutation)、MDA-MB-436 (トリプルネガティブ; p53 mutation, BRCA1 mutation)、ZR75-1 (Luminal B; HER2-; p53 mutation)、BT474 (Luminal B; HER2+; p53 wild type)を用いて、ICP1の発現を正常細胞と比較した。その結果、ICP1はMCF7, MDA-MB-231, Hs578Tで高発現していることが分かった(図1)。乳癌のサブタイプによってICP1の発現量が異なることから、ICP1を標的とした治療法の効果が異なる可能性が示唆される。またレンチウイルスを用いた発現抑制実験により、ICP1は全ての乳癌細胞の増殖に必要であることが分かった。その結果の一部を図2に示す。さらにICP1の発現を抑制すると、Chk1の発現量が減少すること、分裂期の細胞が減少することを見出した。正常細胞株でICP1の阻害による効果を検証するために、乳癌細胞と同様にレンチウイルスを用いた発現抑制を行った結果、ICP1は正常細胞(MJ90およびRPE-1)の増殖には必要ないという重要な結果を得た。この結果は本研究で創出する阻害薬は、副作用が少ない治療に繋がる可能性を示唆するものである。



(2) ICP1阻害薬の増殖およびG2/M期チェックポイントに対する影響

合成したICP1の酵素活性阻害剤を用いて増殖抑制作用を検討した結果、阻害剤はトリプルネガティブ乳癌細胞株に細胞死を誘導し、増殖を顕著に阻害することが分かった(図3)。さらに細胞周期制御因子の活性化および発現が減少することが分かった。ICP1を阻害する阻害薬存在下におけるDNA損傷応答を検討した結果、阻害剤によりG2/M期細胞およびDNA損傷応答における重要な因子のリン酸化が減少することが分かった(図4)。現在、IR照射と阻害剤処理の併用効果について検証している。

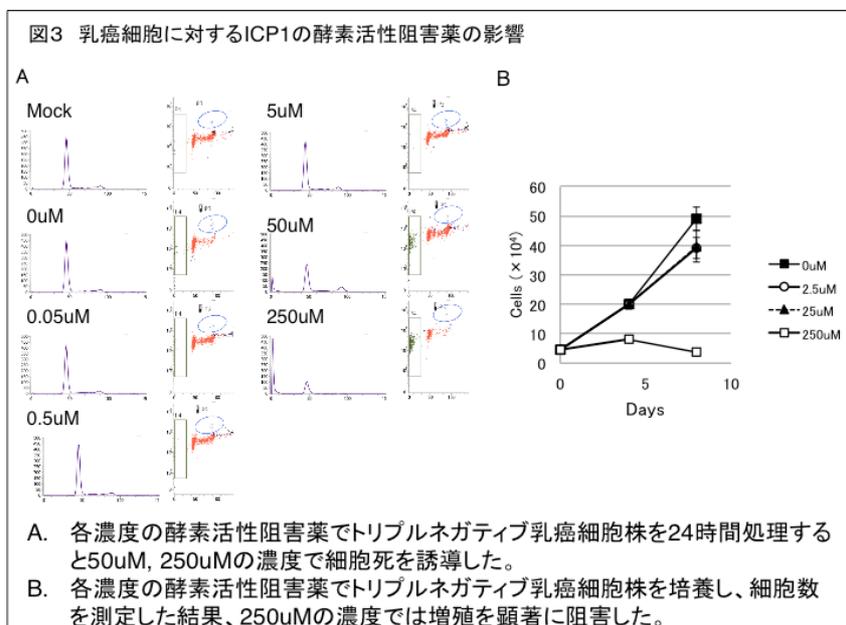
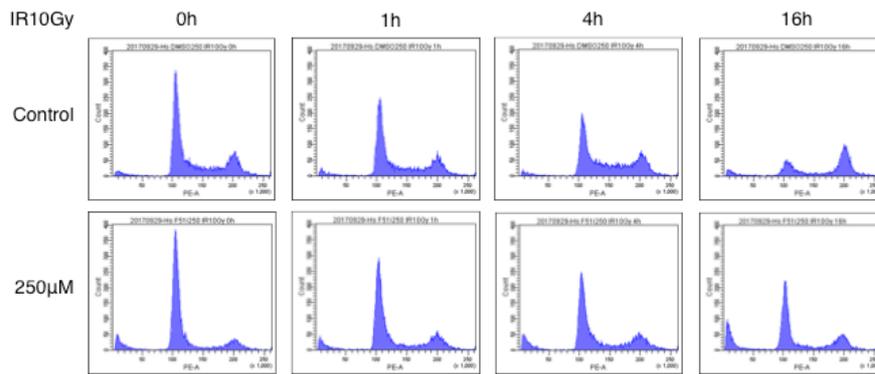


図4 DNA損傷応答に対するICP1の酵素活性阻害薬の影響



トリプルネガティブ乳癌細胞株を酵素活性阻害薬(250uM)で8時間処理後にIRを照射し細胞周期に与える影響を調べた結果、G1/Sへの進行、Sの進行が遅延していることがわかった。

4. 考察

Chk1の標的因子ICP1はがん細胞特異的な増殖に必要であることが明らかとなった。ICP1は増殖因子受容体や、転写因子、細胞周期促進因子と相互作用することから、今後はがん細胞増殖における標的因子の作用機序を明らかにし、阻害薬を創出する予定である。本研究で得られた成果をもとに、乳癌全体の約15%を占めるトリプルネガティブ乳癌に対する新規分子標的治療薬が創出されれば、増加の一途を辿っている乳癌死を減少させ、国家的な利益を享受できると期待される。さらに乳癌だけでなく高悪性度がんの大部分をしめるp53変異がんに対しても効果が期待でき、波及効果は極めて高いと考えられる。

5. 参考文献

- 1) Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression
Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H, Nakanishi M. Cell, 査読有, 132: 221-232, 2008
- 2) Protein phosphatase 1 γ is responsible for dephosphorylation of histone H3 at Thr 11 after DNA damage
Shimada M, Haruta M, Niida H, Sawamoto K, Nakanishi M. EMBO Rep., 査読有, 11: 883-889, 2010
- 3) Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis
***Shimada M**, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K, Nakanishi M. (* corresponding author) Nature Commun., 査読有, 7: 12059, 2016