

論文の内容の要旨

論文題目 白血病細胞における ATR 阻害剤の作用機序の解析

氏名 森元 梓

DNA 損傷には大別すると塩基損傷と DNA 鎖切断があり、その中でも最も重篤な結果をもたらすのは後者に分類される DNA 二本鎖切断 (DNA double-stranded break : DSB) である。その情報伝達に応答するのは、Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) を介する経路と Ataxia-telangiectasia mutated and Rad3-related (ATR) を介する経路がある。これらの経路の主要な分子に対する阻害剤は DNA 損傷応答を阻害することによって、細胞機能を低下させるため、癌に対する治療効果が期待されている。ATR 阻害剤は ATP が ATR に結合することを阻害することにより ATR の機能を抑制し、DNA 修復ができないようにすると DNA 損傷応答に影響を与える。固形がんにおいて、これまでの知見ではがん抑制遺伝子産物 p53 に変異のあることが ATR 阻害剤の感受性の大きさにつながり、治療効果が期待されると考えられ臨床試験も盛んに行われている。本研究は、急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) と慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia: CML) における ATR 阻害剤の治療効果および作用機序を明らかにすることを目的とした。

白血病細胞における ATR 阻害剤、ATM 阻害剤の感受性は細胞株で異なる

AML と CML の細胞株に ATR 阻害剤と ATM 阻害剤をそれぞれ投与すると、どちらの場合も単剤で細胞増殖能を抑制した。またそれらの濃度は細胞株により異なり、感受性は細胞株によって差があることがわかった。

ATR 阻害剤と抗癌剤との併用は細胞増殖をさらに抑制しうる

固形がんでは、細胞障害性の抗がん剤と ATR 阻害剤でより細胞の増殖抑制ができるとの報告があるため、白血病細胞でもこれを検証した。シタラビンと ATR 阻害剤の併用で、阻害剤単剤の場合よりさらに細胞増殖を抑える場合があることがわかった。

p53 の変異の有無と ATR 阻害剤の感受性は相関しない

文献的に調べた p53 の変異の有無と算出した白血病細胞株ごとの ATR 阻害剤の IC50 に相関はみられなかった。これは固形がんにおける既報と異なる結果であった。

p53 の RNA レベルでの発現と ATR 阻害剤の感受性は相関しない

p53 について RT-PCR で発現を調べた。細胞株ごとの p53 の mRNA の発現レベルと感受性との

相関は見られなかった。

ATR-CHK1 経路や ATM-CHK2 経路の活性と ATR 阻害剤の感受性は相関しない

ATR-CHK1 経路の活性化の指標として pCHK1、ATM-CHK2 経路の活性化の指標として pCHK2 が放射線照射で発現が増強するか検証した。ATR 阻害剤高感受性の細胞株では放射線照射後の pCHK1 の発現の増加が認められたのに対し、他の細胞株ではその増加は明らかではなかった。それに対し、pCHK2 の発現は ATR 阻害剤感受性との相関は明らかではなかった。

ATR 阻害剤の投与でアポトーシスの変化は一定ではない

DNA に障害が加わり細胞死に至る場合は、細胞のアポトーシスの増加か、細胞分裂の頻度の低下が起こっていることが予想されたため、ATR 阻害剤を投与した際に、AML と CML の細胞株でそれぞれどのような変化が起きているかを調べた。アポトーシスの割合の変化をみたところ、一定の傾向は見られず、細胞株によって差が見られた。ATR 阻害剤の感受性との相関も見られなかった。

ATR 阻害剤投与で細胞分裂の頻度は変化しうる

ATR 阻害剤投与による細胞分裂への影響を CSFE 細胞分裂アッセイで検証した。ATR 阻害剤高感受性群である OCI-AML3 と HEL では阻害剤投与で細胞分裂の頻度が低下し、非高感受性群である THP1、K562、NCO2 では頻度が亢進するという結果となった。

p53 以外の RNA レベルでの発現と ATR 阻害剤の感受性との相関

p53 以外の DNA 損傷応答に関与する分子について RT-PCR で発現を調べた。CHK1 あるいは CDC25A の発現の高い細胞株と ATR 阻害剤低感受性群の関連がみられ、阻害剤の感受性のマーカーとして使用できる可能性が示唆された。

本研究では、最初に ATR 阻害剤の感受性に p53 の変異が影響を及ぼすとの報告が既があり、仮説として、p53 の変異が有ることで、主に ATM を介する DNA 二本鎖切断に対する情報伝達経路の機能が低下しており、そこに ATR 阻害剤を加えることで DNA 修復不全を起し、血液腫瘍細胞を減少させることができると考え、実験を行った。

まず、白血病細胞における ATR 阻害剤の IC50 と、文献的に調べた p53 変異の有無に有意な相関は見られなかった。p53 の発現の程度とも感受性に相関は見られなかった。以上から ATR 阻害剤の感受性と p53 機能は相関しないことが示唆された。

次に、p53 以外の DNA 損傷応答に関わる分子の発現と感受性の相関を調べたところ、CHK1 mRNA と CDC25A mRNA の高発現が ATR 阻害剤の非高感受性に相関する可能性があることが示唆されている。CHK1 は CDC25A をリン酸化することで分解し、結果として細胞周期が止まる。ATR 阻害剤の感受性が低いということは、定常状態で CHK1 の発現が高く、DNA 損傷応

答のシグナル伝達がスムーズに進み、CDC25Aを分解したとしても、CDC25Aの発現が高ければ、分解されていないCDC25Aの機能が維持されることになり、結果的に細胞周期の停止には至りにくいと考ええる。しかし、低感受性群のうちKG1のみこの機序に該当せず、CHK1のmRNAが高発現であり、CDC25AのmRNAは低発現であった。この場合、ATRからCHK1に至る過程でリン酸化に関与する分子の機能異常があることによって、CDC25Aのリン酸化効率が悪くなり、その結果CDC25Aの量が保持され細胞周期の停止には至らず、ATR阻害剤の感受性は低くなることが示唆される。以上より、CHK1とCDC25A mRNAはATR阻害剤の感受性を予測するマーカーとして利用できる可能性があるが、CHK1については単独で利用することは難しいと考える。

また、ウェスタンブロットの結果では、ATR阻害剤高感受性群で放射線照射によりpCHK1の増加が認められた。これは、DNA損傷が発生し、ATR経路でのシグナル伝達が起こる際にCHK1のリン酸化が効率よく行われ、より下流への信号が伝わりやすいことが予想される。

ATR阻害剤を投与した際に起こる細胞機能の変化について、アポトーシスと細胞分裂の頻度について検討した。アポトーシスとATR阻害剤感受性には相関がみられなかったが、CFSE細胞分裂アッセイにおいては、ATR阻害剤高感受性群のOCI-AML3、HELで有意差をもって細胞分裂頻度の低下が見られ、非高感受性群のTHP1、K562、NCO2の頻度の亢進が見られた。これは、高感受性群ではATR経路のシグナル伝達が行われやすいためATR阻害剤投与下でも細胞周期停止が起こり、分裂頻度が低下したことが示唆された。これらから、アポトーシスの増加がみられなかったことは、それ以前の細胞分裂の過程で細胞の状態が停止していることが考えられる。

今回は既報のようにp53とATR阻害剤との関連は確認されなかった。しかし、定常状態におけるCHK1と放射線照射後のpCHK1活性、CDC25AがATR阻害剤の感受性を規定するマーカーとして利用できる可能性が示唆された。但し、本研究では10種類の細胞株を使った結果であり、今後はさらに臨床検体など使用し検討することが課題である。