

論文の内容の要旨

論文題目 神経膠腫幹細胞に対するグアニン四重鎖リガンドの制がん作用機序
(Anti-tumor mechanism of a G-quadruplex ligand on glioma stem cells)

氏名 長谷川 大記

[序論]

神経膠芽腫は予後不良の悪性脳腫瘍であり、手術による全摘出は困難なため、優れた治療薬の開発が急務となっている。神経膠芽腫の不均一な細胞集団の中にはがん幹細胞 (glioma stem cells: GSC) が存在すると考えられており、スフェア培養した神経膠芽腫細胞は CD133 をはじめとするがん幹細胞・神経幹細胞マーカーを発現し、造腫瘍性を保持している。一方、この細胞は 10%ウシ胎児血清含有培地では接着性を示し、幹細胞性を消失した non stem glioma cells (NSGC) となる。

所属する研究室ではこれまでに、天然由来化合物であるテロメスタチン (Telomestatin: TMS) が GSC に対し、同細胞が分化して生じた NSGC と比べてより強力な細胞増殖抑制効果および DNA 損傷誘発作用を示すことを明らかにしてきた (図 1A)。TMS は、グアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) と呼ばれる特殊な核酸高次構造を安定化する「G4 リガンド」として知られている。G4 はグアニン残基の豊富な塩基配列において形成される (図 1B)。G4 を形成する配列は、テロメア領域をはじめとして、がん関連遺伝子のプロモーター領域にも存在していることが知られており、がん治療における新たな分子標的として期待されている。本研究は、G4 リガンドである TMS が GSC 選択的な制がん効果を示す原因を明らかにすることを目的とした。

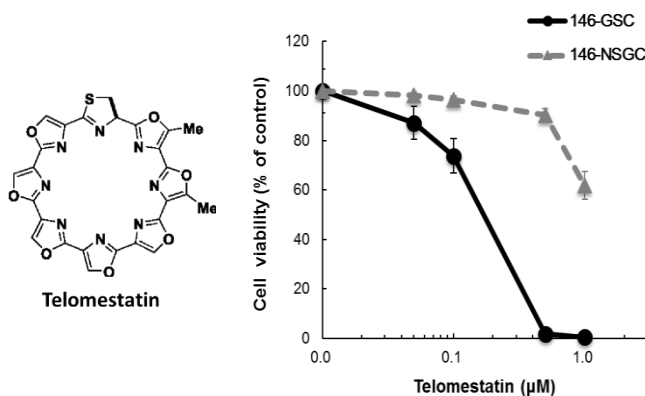


図 1A: Telomestatin の GSC 選択性

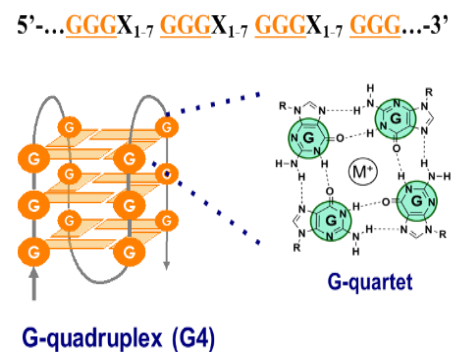


図 1B: G4 の構造

[結果]

1. TMS は GSC においてテロメア機能障害を誘発する

テロメア DNA のグアニンリッチな 1 本鎖領域は G4 構造を形成することが知られている。そこで、TMS がテロメア領域に DNA 損傷を誘導しているのかを明らかにするため、免疫 FISH 法を用いてテロメアと DNA 損傷マーカー-53BP1 との共局在性を検討した。その結果、TMS による DNA 損傷は、非選択的なアルキル化剤である Temozolomide の場合と比べ、テロメアで生じる頻度が有意に高いことが確認された。さらに、TMS がテロメア結合タンパク質である TRF2 foci を GSC 選択的に消失さ

せることが明らかとなり、この活性が GSC におけるテロメア領域 DNA 損傷を誘導している原因である可能性が示唆される。しかしながら、TMS によるテロメア領域 DNA 損傷は、全損傷部位の約 3 割であり、残りの約 7 割はテロメア以外で生じていた。

2. 複製を阻害すると TMS 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下する

G4 の形成には DNA 二重らせんの解消が必要であり、テロメア DNA の一本鎖領域だけでなく複製フォークの形成時にも G4 が形成されると予想される。そこで、TMS の DNA 損傷誘発作用が複製に依存しているかどうかを明らかにするため、複製阻害剤アフィジコリンを処理した GSC の免疫蛍光染色を行った。その結果、アフィジコリンの前処理により TMS 誘導性の DNA 損傷が顕著に低下することが確認された。この結果から、TMS はテロメアだけではなく複製にも依存して DNA 損傷を誘導することが明らかとなった。

3. G4 は GSC と NSGC で同程度に存在する

近年、G4 特異的抗体 (BG4 抗体) の開発により細胞内 G4 の可視化が可能となった。そこで、TMS の標的である G4 の数が GSC と NSGC で異なるのかを検討するために、BG4 抗体のプラスミド (英国・S. Balasubramanian 博士より供与) から抗体を調製し、免疫蛍光染色を行った。その結果、BG4 foci の数は GSC と NSGC で同程度であることが明らかとなった (図 2)。

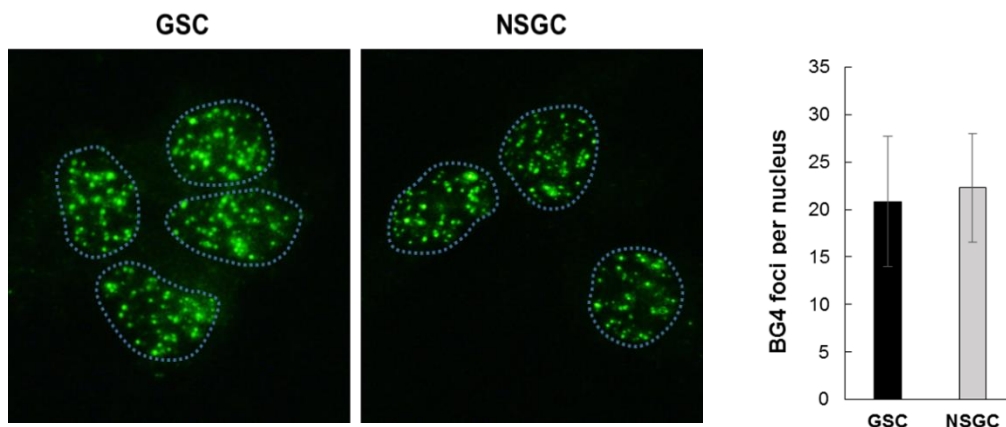


図 2: 抗 G4 抗体を用いた免疫蛍光染色 (IF)

4. TMS は GSC と NSGC 共に複製ストレスを誘導する

複製時に形成される G4 を G4 リガンドが安定化することで、複製の進行が妨げられ、複製ストレスが生じると推論した。そこで、TMS が GSC や NSGC において複製ストレスを引き起こすか検討した。Replication protein A (RPA) は一本鎖 DNA 結合タンパク質である。複製ストレスが生じ RPA にコートされた一本鎖 DNA が蓄積すると、チェックポイントプロテインキナーゼである ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) が活性化され、RPA2 のリン酸化が引き起こされる。RPA2 のリン酸化抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、複製ストレスの有無を検討した結果、TMS を処理した GSC と NSGC 共に RPA2 のリン酸化が引き起こされていることを見出した (図 3)。しかしながら興味深いことに、この時の TMS 誘導性 DNA 損傷は GSC でのみ生じていた (図 4)。

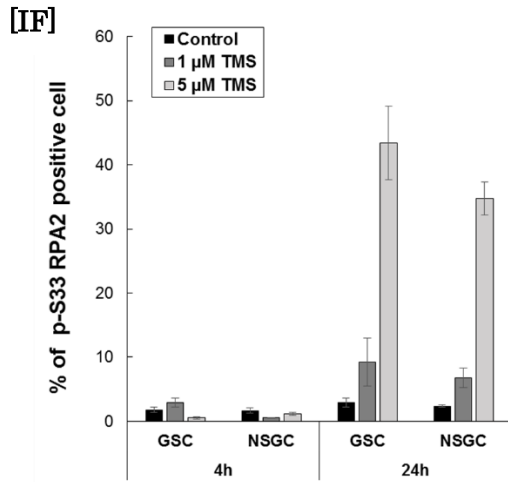


図 3 : TMS による RPA2 リン酸化の誘導

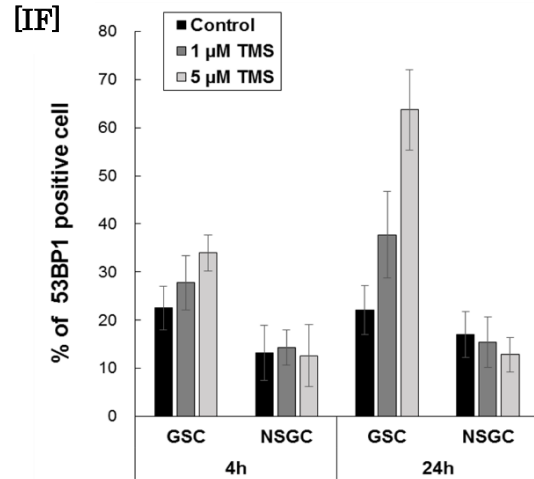


図 4 : TMS による 53BP1 foci の誘導

5. TMS は GSC 選択的に Chk1 のリン酸化を誘発する

TMS 誘導性の複製ストレスは GSC と NSGC で同程度に生じるにも関わらず、DNA 損傷応答は GSC のみで生じたことから、複製ストレス応答経路に TMS の GSC 選択性を説明しうる分子作用点があると考えた。複製ストレスが生じると、ATR の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化（活性化）が生じる。TMS が GSC において ATR-Chk1 経路に影響を与えている可能性を考え、TMS を処理した際の GSC と NSGC の Chk1 のリン酸化（活性化）状態を Western blotting で検討した。その結果、TMS を処理すると GSC では NSGC と比較して強力な Chk1 のリン酸化が誘導されることが見出された（図 5）。

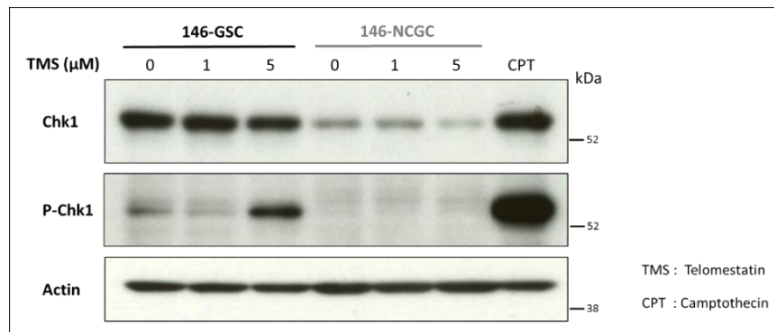


図 5 : TMS による Chk1 リン酸化の誘導

6. ATR 阻害剤は GSC 選択的な細胞増殖抑制効果と DNA 損傷誘発作用を示す

TMS が GSC 選択的に Chk1 のリン酸化を引き起こしたことから、ATR-Chk1 経路が TMS の GSC 選択性を説明しうる作用点である可能性が示唆される。この経路が GSC の生存に重要な役割を果たしていると予想し、続いてはこの経路を阻害した場合の細胞への影響を検討した。その結果、ATR キナーゼの阻害剤（VE-821）は GSC 選択的な細胞増殖抑制効果を示した。これと一致し、VE-821 による DNA 損傷も GSC 選択的に生じることが明らかとなった（図 6）。ATR-Chk1 経路を活性化すると考えられる TMS だけではなく、ATR キナーゼの阻害剤も GSC 選択性を示したことから、GSC は ATR-Chk1 経路の不均衡状態に対する脆弱性が高い可能性が示唆される。すなわち、この経路は GSC に対する新たな治療標的となり得ることが予想される。

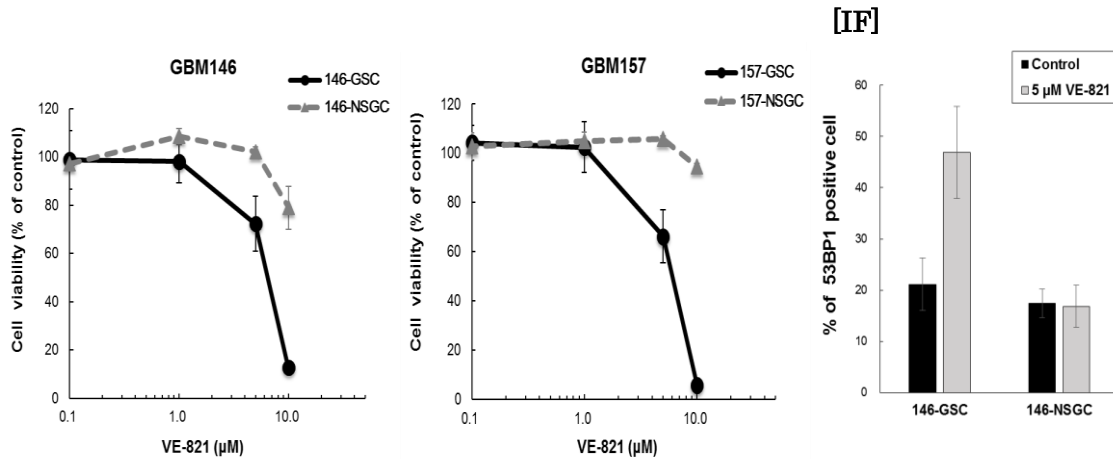


図 6：VE-821 の細胞増殖抑制効果と 53BP1 foci の誘導

[まとめ]

以上のように、G4 リガンドである TMS 誘導性の DNA 損傷はテロメアだけではなく、非テロメア領域でも生じることが明らかとなった。TMS はテロメラゼ阻害活性を有することで知られている。しかしながら、我々は G4 安定化能を持たないテロメラゼ阻害剤 (BIBR1532) が GSC 選択性を示さないことを見出しており、テロメア短縮によるキャップ構造の崩壊は TMS の GSC 選択性を決定づける要因ではないと考えられる。興味深いことに、TMS がテロメア結合タンパク質である TRF2 foci を GSC 選択的に消失させることが明らかとなった。TRF2 はテロメアを DNA 損傷から保護する役割を果たしており、TMS が TRF2 をテロメアから遊離することで、GSC におけるテロメア領域 DNA 損傷を誘導する可能性が示唆される。

本検討から、TMS はテロメアだけでなく複製にも依存して DNA 損傷を誘導することが明らかとなった。さらに、TMS は GSC と NSGC において複製ストレスを誘導したことから、複製時に形成される G4 を TMS が安定化することで、複製の進行が妨げられ、複製ストレスが誘導される可能性が示唆される。複製ストレスが生じると、ATR の活性化に伴い、細胞周期の進行を抑制する Chk1 のリン酸化 (活性化) が生じる。本検討から、TMS は Chk1 のリン酸化を GSC 選択的に誘導することが見出された。GSC においては ATR や Chk1 といった DNA 損傷応答に関わるタンパク質の発現が高いことが知られており、複製ストレスが生じた際に GSC では ATR-Chk1 経路の活性化が引き起こされやすい状態にあると予想される。DNA 損傷応答反応の上流に位置する H2AX のリン酸化も Chk1 と同様に ATR キナーゼに依存しており、ATR キナーゼによってリン酸化されることで DNA 損傷応答反応が引き起こされる。すなわち、TMS が GSC 選択的に ATR キナーゼを活性化することで、GSC 選択的な DNA 損傷応答が引き起こされると予想される。

GSC で発現が高い ATR や Chk1 といった DNA 損傷応答に関わるタンパク質が活性化すると、細胞周期停止による DNA の修復を促し、放射線等の治療抵抗性に寄与していると考えられている。しかしながら、強力な ATR-Chk1 経路の活性化は、持続的な細胞周期の停止を引き起こし、細胞死を誘導することが予想される。本検討から、TMS は GSC において、TRF2 をテロメアから遊離することでテロメア障害を引き起こすだけではなく、複製ストレスの誘導に伴う ATR-Chk1 経路の活性化を引き起こすことで、GSC 選択的な細胞増殖抑制効果および DNA 損傷誘発作用を示す可能性が示唆された。