

博士論文（要約）

子宮体癌における DNA 修復系タンパクを標的とした

新規分子標的治療法の探索

竹内 真

[序文]

子宮体癌は近年、先進国の女性の生殖器癌の中で最も罹患率が高い疾患であり、年間約 17 万人が診断され、死亡数は 3 万 6000 人と推定されている。全症例の 80%にはエストロゲンの持続刺激が関与しているとされ、本邦においても晩婚化や少子化、生活習慣病の増加に伴い、罹患率が増加中である。また、進行および再発子宮体癌は限られた治療選択と治療抵抗性のために予後不良であり、分子標的治療は新たな治療戦略として期待されている。

多くの化学療法や放射線療法の抗腫瘍効果は、癌細胞に対する DNA 損傷の誘導による事が知られている。DNA 修復系は、様々な癌種において化学療法や放射線療法に対する耐性の主要な因子の一つであることが報告されており、分子標的療法の有望な候補であると考えられている。また、癌細胞において DNA 修復系の一部が不活化されている場合には、その他の修復経路により強く依存している状態にあると考えられ、他の経路を阻害することで癌特異的な合成致死を誘導することが報告されている。

ATR (ATM and Rad-3-related)-Chk1 経路および ATM (Ataxia telangiectasia mutated)-Chk2 経路は互いにクロストークのある DNA 損傷応答経路であり、DNA 損傷の修復、細胞周期の調節やアポトーシスの誘導において主要な役割を担っている。これらの経路に対するいくつかの阻害剤は、一部の癌腫において臨床試験が進行中であるが、子宮体癌における抗腫瘍効果に関しては、未だ一定の見解が得られていない。

また、遺伝性腫瘍に限らず、様々な癌腫において ATM-Chk2 経路には高頻度に変異や発現量低下が存在することが知られている。そのため、ATM-Chk2 経路よりも ATR-Chk1 経路を阻害する方が、癌特異的な合成致死を誘導する可能性があると考えられる。近年、一部の癌種において、ATR 阻害剤と Chk1 阻害剤の併用がそのような細胞死を誘導することが報告されたが、子宮体癌における抗腫瘍効果に関しては報告がない。

本研究では、ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2 経路に対する阻害剤の子宮体癌細胞株における抗腫瘍効果を検討した。

[方法]

(1) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤および ATM 阻害剤の既存抗癌剤との併用効果

子宮体癌の 2 種類の細胞株(HEC-6, HEC-1B)を用いて検討を行った。DNA 障害性薬剤としてドキソルビシン (DXR)およびシスプラチン (CDDP)を用いた。ATR 阻害剤として VE822 を、ATM 阻害剤として KU60019 を用いた。MTT アッセイにより、VE822 および KU60019 の IC50 を測定した。ウェスタンブロッティングにより、DNA 障害性薬剤による ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2 経路の活性化と、阻害剤によるそれらの活性低下について検討した。ATR-Chk1 経路の活性化は p-Chk1 の増加により評価した。ATM-Chk2 経路の活性化は p-ATM および p-Chk2 の増加により評価した。コロニーフォーメーションアッセイにより、これらの DNA 障害性薬剤と阻害剤の組み合わせによる抗腫瘍効果を検討した。フローサイトメトリーにより、これらの DNA 障害性薬剤および阻害剤への曝露下における、細胞周期の分布について検討した。

(2) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤および ATM 阻害剤の放射線照射との併用効果

ウェスタンブロッティングにより、放射線照射による ATR -Chk1 経路および ATM -Chk2 経路の活性化と、阻害剤によるそれらの活性低下について検討した。コロニーフォーメーションアッセイにより、放射線照射と阻害剤の併用による抗腫瘍効果を検討した。

(3) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤と Chk1 阻害剤の併用効果

子宮体癌の 2 種類の細胞株(HEC-6, HEC-1B)を用いて検討を行った。Chk1 阻害剤として AZD7762 を用いた。MTT アッセイにより、ATR 阻害剤と Chk1 阻害剤の併用効果について検討した。相乗効果の有無を Talalay-Chou 法により評価した。ウェスタンブロッティングおよび蛍光免疫染色により、ATR 阻害剤と Chk1 阻害剤併用時の DNA 障害について検討した。

[結果]

(1) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤および ATM 阻害剤の既存抗癌剤との併用効果

HEC-6 を用いて MTT アッセイを行ったところ IC50 の値は VE822 (ATR 阻害剤)が 1.5 μM , KU60019 (ATM 阻害剤)が 20 μM であった。HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったウェスタンブロッティングにおいて DXR (1 μM , 6 h) および CDDP (20 μM , 6 h)への曝露により、p-Chk1, p-ATM, p-Chk2 の発現量の増加を認めた。さらに、VE822(10-1000 nM)の追加により p-Chk1 は減少し、KU60019(1-100 μM)の追加により p-ATM および p-Chk2 は減少した。HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったコロニーフォーメーションアッセイでは、DXR (10-50 μM)または CDDP (100-500 nM)と VE822 (10-50 nM)または KU60019 (100-1000 nM)のいずれの組み合わせにおいても著明な効果の増強を認めた。HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったフローサイトメトリーでは VE822 と CDDP の併用および KU60019 と DXR の併用において、sub G1 の割合に著明な増加を認めた。

(2) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤および ATM 阻害剤の放射線照射との併用効果

HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったウェスタンブロッティングにおいて、放射線照射 (10 Gy) により、p-Chk1, p-ATM, p-Chk2 の発現量の増加を認めた。さらに、ATR 阻害剤(1 μM)の追加により p-Chk1 は減少し、ATM 阻害剤 (1 μM)の追加により p-ATM および p-Chk2 は減少した。HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったコロニーフォーメーションアッセイでは、放射線照射 (2-8 Gy)と VE822 (50 nM)または KU60019 (1 μM)のいずれの組み合わせにおいても著明な効果の増強を認めた。

(3) 子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤と Chk1 阻害剤の併用効果

子宮体癌細胞株を用いた MTT アッセイにおいて、VE822 (39-10000 nM)および AZD7762 (10-100 nM)の併用により、相乗的な効果の増強を認めた。HEC-1B, HEC-6 を用いて行ったウェスタンブロッティングにおいて、VE822 (1 μM)および AZD7762 (30-60 nM)の併用により、 γ H2AX の発現量の増加を認めた。HEC-1B, HEC-6 を用いて行った蛍光免疫染色において、VE822 (1 μM)および AZD7762 (60 nM)の併用により、 γ H2AX および BRCA1 の核内における集積を認めた。

[考察]

本研究では、ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2 経路に対する阻害剤の子宮体癌細胞株における抗腫瘍効果を、現在子宮体癌の標準化学療法として用いられている DXR, CDDP との併用効果を含めて検討した。ATR 阻害剤 VE822 および ATM 阻害剤 KU60019 は、いずれも単剤では細胞の生存に影響を与えない濃度において、DXR および CDDP への曝露により誘導される ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2 経路の活性化を阻害し、子宮体癌細胞株の DXR, CDDP への感受性を増強することが示された。その機序としては、併用群で sub G1 の割合が増加していることから、細胞死が誘導されている可能性が示唆された。

また、子宮体癌細胞株における ATR 阻害剤および ATM 阻害剤の放射線照射との併用効果についても検討を行った。ATR 阻害剤および ATM 阻害剤はいずれも、子宮体癌細胞株における放射線感受性を著明に増強することが示された。

また、本研究においては、ATR 阻害剤 VE822 と Chk1 阻害剤 AZD7762 の併用効果についても検討し、それらが子宮体癌細胞株において相乗的な効果を示すことを示した。また、それらの2種の阻害剤の併用により癌細胞に DNA 損傷が誘導されていることを示唆した。

以上の事から、ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2 経路に対する阻害剤は、子宮体癌における有望な新規分子標的治療になり得ると考えられ、本研究は今後の子宮体癌における分子標的薬の臨床応用に寄与するものと期待される。