

平成 27 年度 HOPE 事業研究助成金(個別研究課題)

研 究 報 告 書

平成 28 年 5 月 13 日

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 高山昭三 殿

研究施設 国立がん研究センター研究所
住 所 東京都中央区築地 5-1-1
研究者氏名 塩谷文章



(研究課題)

がん細胞の DNA 複製ストレスレベルによる DNA 損傷性抗がん剤の奏効性予測

平成 27 年 8 月 21 日付助成金交付のあった標記研究課題について研究が終了致しました
のでご報告いたします。

[研究の背景及び目的]

がんの「化学療法」は近年目覚ましい進歩を遂げ、がん細胞特異的シグナル伝達阻害剤ゲフィニチブ (EGFR-TKI) に代表されるように多くの分子標的薬が開発され、副作用の比較的少ない治療薬として注目を集めている。一方で Cisplatin や Doxorubicin 等の DNA 損傷性 (殺細胞性) 薬剤は今なお必要性が高く多くの癌腫・肉腫の治療において主要な治療薬である。また放射線治療 (DNA 損傷誘発) はほぼすべてのがん治療に適応される。しかし、重篤な副作用の軽減や奏効性を示す患者の選択、治療抵抗性の克服はこれら DNA 損傷性治療法を用いる際の解決すべき喫緊の課題である。Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) は DNA 複製に必須のキナーゼであり、DNA 損傷応答を最上流で制御し、DNA 複製ストレスに応答し活性化する。最近報告された ATR 選択的阻害剤 VE822 (Vertex 社) はがん細胞特異的な細胞死を引き起こし、特に DNA 損傷誘発性薬剤との併用において非常に強い増感効果を示すことから、ゲノムが不安定ながん細胞は内因性の DNA 複製ストレスに対して ATR 経路を活性化することにより生存・増殖することが示唆される。しかし、内因性の DNA 複製ストレス抵抗性を制御する ATR 機能は既知の標的基質では説明が困難であることから、本研究では ATR キナーゼの新規特異的基質リン酸化同定法を開発に取り組んだ。本成果は個々のがん細胞における DNA 複製ストレスによって活性化された ATR による特異的基質のリン酸化プロファイル解析から DNA 複製ストレスレベルを推し量ることを可能とし、DNA 損傷性抗がん剤や、ATR 阻害剤との併用療法の奏効性を効率よく予測することが期待される。

[研究の成果と考察]

これまで、DNA 構造特異的な ATM、ATR の活性化機構を調べるため、合成 DNA とヒト細胞核抽出液を利用した DNA-based In vitro checkpoint assay を開発し、DNA 損傷構造の変化に伴った ATM および ATR 活性化機構を明らかにしてきた。DNA 複製ストレスが複製フォーク崩壊や DNA 二重鎖切断を伴うことから、本アッセイを in vitro ATR 活性化法として用いた。次に ATR 特異的リン酸化を同定するため、自然界には存在しない ATP アナログを利用できるように ATP-binding pocket を改変した Analog-Sensitive ATR (AS-ATR) の作成に取り組んだ。ATR キナーゼの ATP-binding pocket の Gate keeper、H-bond、Salt bridge、DFG motif を構成するアミノ酸を中心に改変し 60 種の候補を作成し、in vitro kinase assay によりスクリーニングから ATP および ATP アナログに感受性を示す AS-ATR を得た。さらに AS-ATR を導入細胞からした核抽出液を調整しアナログ ATP- γ -S (γ 位のリン酸の O を S に置換したもの) 存在下において DNA-based In vitro checkpoint assay を行ったところ、AS-ATR によってチオリン酸化された基質候補を多数検出する事に成功した。今後チオリン酸化された ATR 特異的基質候補を精製し、LC-MS/MS 解析する事により同定する必要がある。次に、大量の DNA 損傷性抗がん剤による化学療法が行われる骨肉腫および Ewing 肉腫 13 種を対象に ATR 阻害剤 (VE-822) の感受性試験を行ったところ、HOS, MG63, A673 は IC50 値として 50nM 以下、一方 NOS10 や SJSA1 では IC50 値が 500 nM 以上を示すなど、感受性に 10 倍以上の差が認められた。今後、in vitro assay によって同定される ATR 特異的基質リン酸化プロファイルを VE822 感受性試験結果と相関解析を行うことで、化学療法剤大量投与によって重篤な副作用・2 次発がんが問題となっている骨肉腫の DNA 損傷性抗がん剤や、ATR 阻害剤との併用療法の奏効性予測バイオマーカーの開発が期待される。

なお本研究成果の一部は BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) において発表した。