

平成 28 年度 HOPE 事業研究助成金（個別研究課題）

研 究 報 告 書

(年 間)

平成 29 年 8 月 25 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 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 28 年 8 月 5 日付助成金交付のあった標記研究課題について、平成 29 年 7 月 31 日までの年間報告を提出致します。

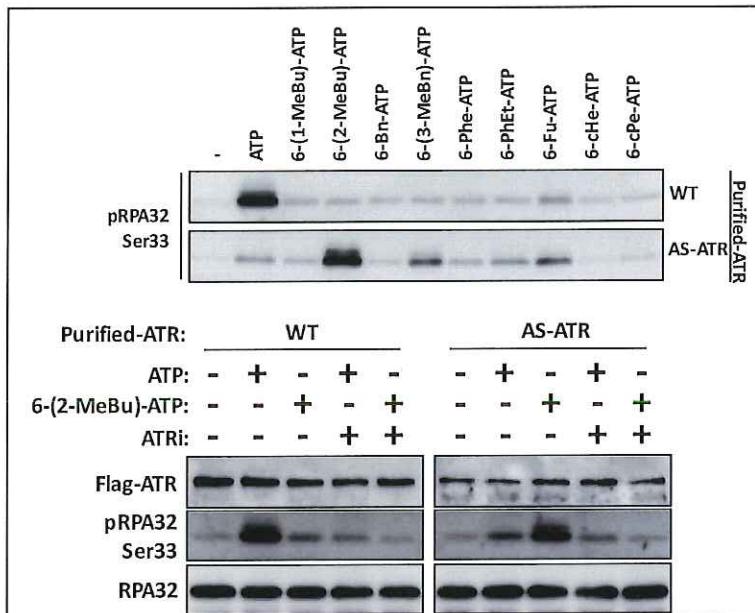
[研究の背景及び目的]

Cisplatin や Doxorubicin 等の DNA 損傷性（殺細胞性）薬剤は多くの癌腫・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、薬効の最大化、奏効性を示す患者の選択、重篤な副作用の軽減、治療抵抗性の克服はこれら DNA 損傷性治療法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。ほぼすべてのがん細胞は細胞周期調節異常に起因する内因性の DNA 複製ストレスを抱えながら生存・増殖する。DNA 損傷誘発性の治療法はがん細胞が増殖を繰り返すうえで避けることができない DNA 複製を標的とし、更なる DNA 複製ストレスを誘発し効果を示す。最近報告された ATR 選択的阻害剤 VE822 (Vertex 社) や AZD6738 (AstraZeneca) は、単剤または 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し、がん細胞特異的な細胞死を引き起すことが報告されている。すなわち DNA 損傷誘発性薬剤による DNA 複製ストレスに対して、細胞内では ATR 依存的な DNA 損傷応答機構が働き細胞周期を停止、DNA 修復し細胞死を回避することにより治療効果抑制的に働くことが示唆される。したがって個々の細胞における DNA 複製ストレスレベル (ATR 依存度) を推し量ることは DNA 損傷性治療の効果を予測、さらには ATR 阻害剤との併用療法の奏効性を効率よく予測する可能性がある。しかしこまでの ATR 研究では、がん遺伝子誘発性等の内因性の DNA 複製ストレスに応答する ATR の機能解析はほとんどなされていない。そこで本研究では、ATR キナーゼの機能発現に必須である新規特異的基質リン酸化を網羅的に同定し、DNA 複製ストレス応答における機能解析を行い、DNA 損傷性治療及び ATR 阻害剤併用による奏効性を予測するバイオマーカーの創出に資する分子基盤を構築することを目的とした。

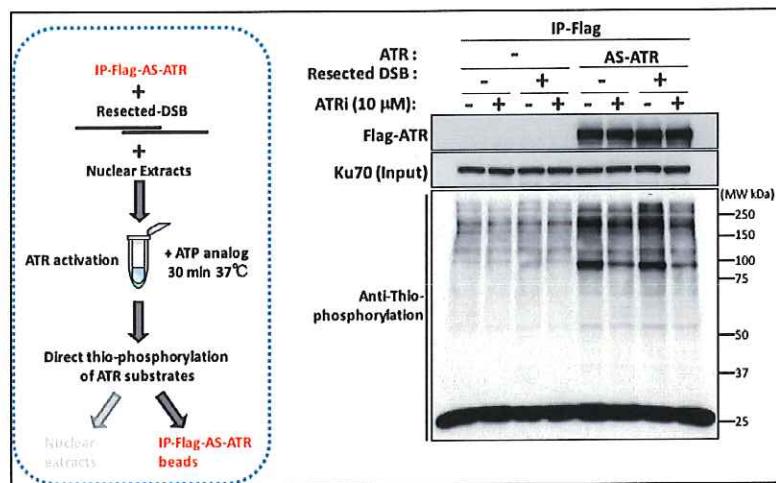
[研究の成果と考察]

本研究では ATR 特異的リン酸化基質の網羅的な解析を行うため、自然界には存在しない ATP アナログを利用できるように ATR のキナーゼドメイン中の ATP-binding pocket を改変した。ATR のファミリーキナーゼである ATM における Y2365A 改変に



よって AS-ATR 作成に成功したと報告を参考に ATRにおいて Y2365A を導入したところ、予想に反してキナーゼ活性が完全に失われた。そこで Y2365A に加えて ATP 結合部位に変異を様々に導入しキナーゼ活性を維持する AS-ATR 候補を約 60 種類作成し、これらの中から 6-(2-Mebu)-ATP 存在下で活性を示す Analog sensitive ATR (AS-ATR)を同定した。またこの活性は ATR 阻害剤存在下で効率よく抑制されたことから ATR 特異的な活性を維持していることをみいだした（下図）。さらに 6-(2-Mebu)-ATP-gamma-S 存在下で AS-ATR は ATR 特異的基質である Rad17 及び RPA32 に対してキナーゼ活性を示すことを確認した。

次に核抽出液中において ATR を活性化する合成 DNA、免疫沈降法により精製した Flag-AS-ATR を、6-(2-Mebu)-ATP-gamma-S 存在下でインキュベートしたのち、Flag-AS-ATR と共に沈するタンパク質におけるチオリン酸化をウエスタンプロット法によって解析したところ、多くの未知基質をチオリン酸化することが明らかとなった。またこれらのチオリン酸化は ATR 阻害剤存在下において抑制されたことから、ATR 特異性の極めて高い基質が検出可能となった（下図）。



AS-ATR によってチオリン酸化された基質ペプチドを Sulfolink beads にて精製し質量分析による解析を行った。その結果、in vitro AS-ATR 基質スクリーニングによって 19 種類のタンパク質上に 25 種の新規リン酸化部位を同定した。これらのリン酸化配列には典型的な SQ/TQ 配列およびこれらとは異なる配列を認めた。これらのことから ATR はこれまでに知られていない未知基質をリン酸化することにより DNA 損傷応答を制御することを見出した。

次にがん遺伝子誘発性の内因性 DNA 複製ストレス応答を解析するため、変異型 K-Ras を正常肺上皮細胞に導入し形質転換を誘導する肺腺がんモデルを構築した。正常上皮細胞に比べて変異型 K-Ras 発現細胞は ATR 阻害剤に対して強い感受性を示したことから、ATR 依存性が高いことが示された。また変異型 K-Ras 発現細胞から調整した核抽出液中のリン酸化プロテオーム解析から 5568 種類のリン酸化サイトを 2654 種類のタンパク質において同定し、DNA 複製ストレス応答性のリン酸化基質を含む約 700 種類のリン酸化サイトを同定した。この中には ATR が認識する SQ/TQ 配列を有

する 90 基質を含むこと、これらのうち正常細胞で 2 倍以上リン酸化されている基質を 3 種類、変異型 K-Ras 発現細胞において 2 倍以上リン酸化を認める基質を 7 種類同定した。しかしこれまで報告のある外的 DNA 損傷応答で認められる ATR 基質のリン酸化は顕著には認められなかった。以上より内因性 DNA 複製ストレス応答における ATR は外的要因による DNA 損傷応答時とは異なる基質群をリン酸化することにより染色体を安定に維持しがん細胞の生存を維持することが示唆された。また、2 倍以上の変動を認めるリン酸化基質中に、上記 *in vitro* AS-ATR 基質スクリーニングで同定した基質候補と一致するものは得られなかっことから、より多くの基質を同定するためスケールアップが必要であること、変異型 K-Ras 発現細胞におけるリン酸化について ATR 特異性を検証する必要があると考えられた。

次に肺腺がん細胞パネル (A427, A549, H1299, H1650, H1975, H2228, RERF-LC-OK, RERF-LC-MS) を対象に ATR 阻害剤(VE822)及び Cisplain の感受性試験を行ったところいずれも 8 種中の 7 細胞株において正常肺上皮細胞 (SAEC) に比べて高い感受性を示した。また各細胞における ATR 阻害剤存在下における内因性 DNA 複製ストレス度について露出 ssDNA 陽性細胞を指標に解析したところ、興味深いことに ATR 阻害剤 : -0.65、Cisplatin : -0.75 の相関係数が得られた。さらに ATR 阻害剤 (100 nM) と Cisplatin 併用効果を調べたところ、A549 や A427 においては Cisplatin に対する感受性が約 16 倍も上昇するなど肺腺がん細胞株すべてにおいて相乗効果が認められた。さらに 2 剤併用感受性と露出 ssDNA 陽性細胞率には-0.88 の相関係数が得られた。以上のことから個々の細胞における DNA 複製ストレスレベル (ATR 依存度) を推し量ることは DNA 損傷性治療の効果を予測、さらには 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示唆された。

なお本研究成果の一部は第 75 回 日本癌学会学術総会、第 39 回日本分子生物学会年会において発表した。