

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07246

研究課題名(和文)CHK1阻害剤の細胞死誘導能の分子機構に着目した感受性遺伝子の同定と臨床応用

研究課題名(英文)Clinical application and biomarker of CHK1 inhibitor-mediated cell death

研究代表者

安藤 清宏 (Ando, Kiyohiro)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・副部長

研究者番号：10455389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療応用が期待されるCheckpoint kinase 1 (CHK1)阻害剤の臨床応用に向けて、感受性遺伝子を探した。神経芽腫細胞株において当該薬剤の感受性の低いものに対しては、DNA損傷修復の主要分子であるATMまたはDNA-PKの阻害剤の併用が効果的だった。一方、感受性の高い細胞株では染色体の欠失にともなうfibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)の発現低下が関連することが判明した。FGFR2はMEK/ERK経路の活性化を誘導することから、FGFR2の高発現を認めるがんではCHK1阻害剤とMEK1/2阻害剤との併用が有効と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHK1阻害剤は、非臨床において高い抗腫瘍効果が示されているにもかかわらず、臨床試験の結果はいまだ十分でないことから、治療応用には感受性遺伝子の同定が急務である。本研究では、CHK1の機能阻害に対してATMまたはDNA-PKのDNA損傷修復機構及びFGFR2の細胞増殖効果が補完的に働くことが明らかとなった。この成果は、がん細胞におけるCHK1の機能的役割に新しい知見を与える学術的意義が高いと考えられ、またこれらの感受性に関連するがん細胞の遺伝子背景は、効果予測および適応決定の指標として今後の適切なCHK1阻害剤の臨床試験デザインに有用であり、また併用治療薬の選択に臨床的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Selective inhibitors of checkpoint kinase 1 (CHK1) are undergoing clinical evaluation for various human malignancies. We reported that ATM inhibitor and DNA-PK inhibitor potentiated CHK1 inhibitor-mediated cell death in neuroblastoma cell line. Furthermore, the decreased expression of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) was causally related to CHK1 sensitivity. Since FGFR2 activated MEK/ERK pathway for cell proliferation, our data suggested that loss of FGFR2 expression might be possible utilization for determination of CHK1 inhibitor sensitivity in patients with neuroblastoma, whereas the increase expression of FGFR2 might be a candidate biomarker for combination therapy with MEK inhibitor.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：CHK1阻害剤 神経芽腫 DNA損傷応答 CEP131 FGFR2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞周期のS期及びG2/M期の適切な進行に中心的な役割を担うCheckpoint kinase 1 (CHK1) 蛋白質 checkpoint kinase 1 に対する阻害剤(以下、CHK1 阻害剤)は、非臨床において高い抗腫瘍効果が示されているにもかかわらず、臨床試験の結果はいまだ十分でないことから、その感受性を決定するバイオマーカーの同定が急務といえる。

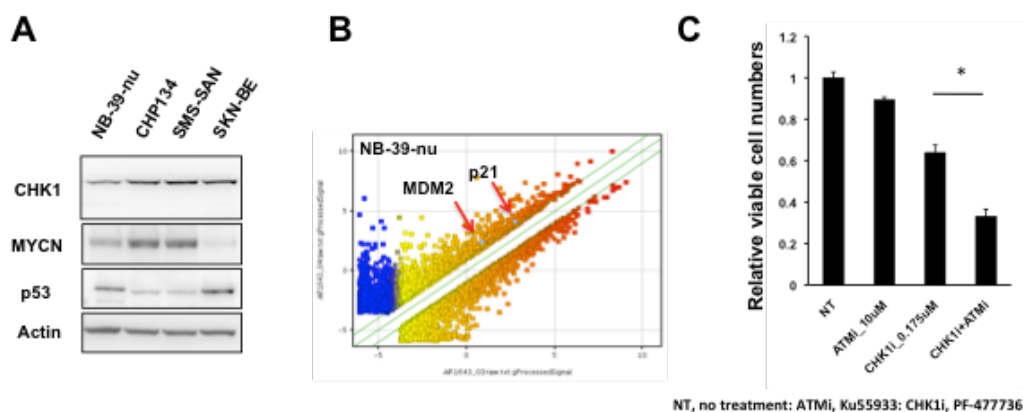
### 2. 研究の目的

本研究は、CHK1 阻害剤の感受性に関わる特徴的な遺伝的背景を探索することによって効果予測および適応決定に臨床応用可能な感受性遺伝子を同定し開発につなげることを目的とした。

### 3. 研究の方法

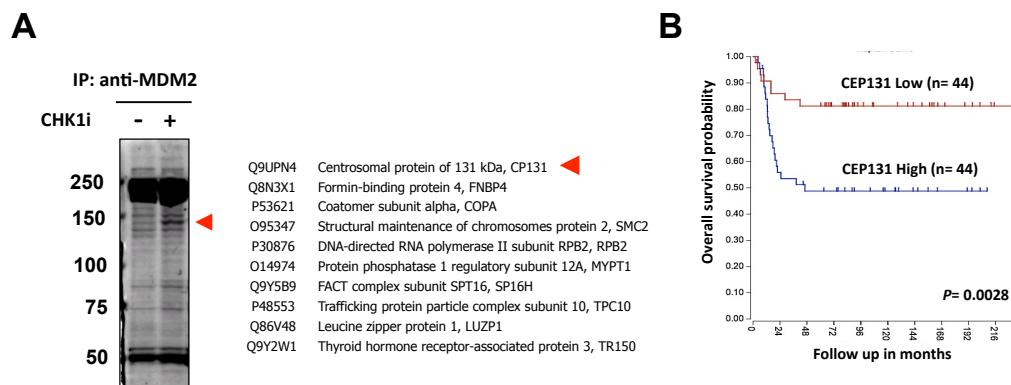
数種の神経芽腫細胞株を用いてCHK1 阻害剤(PF-477736)に対する感受性を検討した結果、CHK1 阻害剤に感受性の低いSK-N-BE細胞およびNB-39nu細胞においてp53タンパク質の発現が高い特徴が見られた(Figure 1A)。NB39-nu細胞におけるCHK1 阻害剤処理前後の遺伝子発現変化をマイクロアレイで検討した結果、p53の転写活性化標的であるp21およびMDM2の発現上昇が顕著だった(Figure 1B)。このことから、CHK1 阻害剤により誘導されるp53に関連したDNA損傷応答が低感受性に関連していることが示唆された。そこでDNA損傷応答センサーの主要な分子であるATMまたはDNA-PKに対する阻害剤(Ku55933またはNU7441)をCHK1 阻害剤に併用処理して細胞増殖に及ぼす効果を調べたところ、アポトーシス誘導を伴う顕著な増殖抑制が見られた。Figure 1CにCHK1 阻害剤とATM阻害剤との併用効果を示す。

Figure 1



さらに、CHK1 阻害剤処理に誘導されたMDM2の新規結合分子を質量分析で検討した結果、神経芽腫の予後不良に関連するcentrosome-associated family protein 131 (CEP131)が同定された(Figure 2A and 2B)。そこでCEP131遺伝子をNB-39nu細胞にレンチウイルスを用いて導入したところ、CHK1 阻害剤に対する感受性が低下することが判明した。

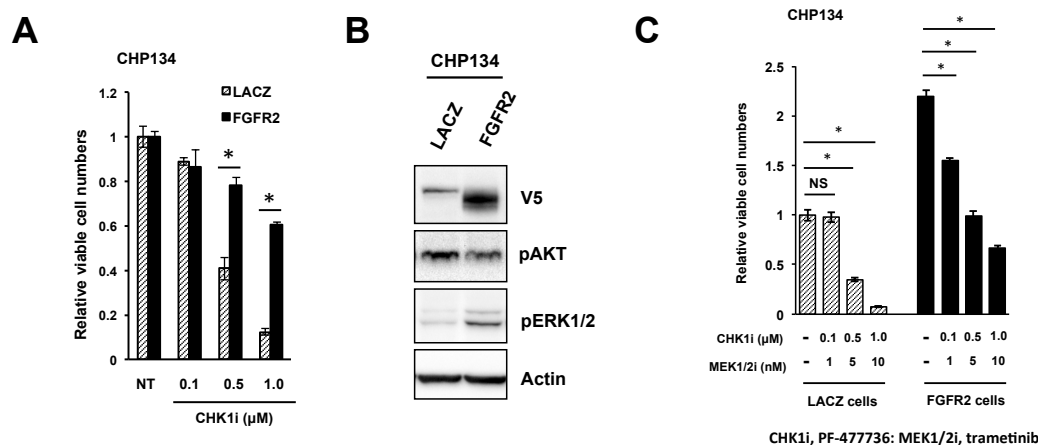
Figure 2



次に、CHK1 阻害剤の完全奏功を期待しうるがんの遺伝子背景の探索を行なった。CHK1 阻害剤

に対して高感受性を示す神経芽腫細胞株 CHP134 細胞および低～中等度の感受性を示す SK-N-BE, NBL-S, SH-SY5Y, SK-N-AS, SMS-SAN 神経芽腫細胞株についてアレイ CGH 法を用いて比較した結果、10 番染色体長腕のコピー数の低下が CHP134 細胞に特徴的であることが判明した。同細胞株の公開されている RNAseq データ、および遺伝子発現マイクロアレイを用いて当該欠失領域に含まれる既知のがん関連遺伝子群の発現を検討したところ、いずれの結果においても FGFR2 遺伝子が発現低下している可能性が見出された。そこで FGFR2 遺伝子を CHP134 細胞にレンチウイルスを用いて導入したところ、CHK1 阻害剤に対する感受性が低下することが判明した (Figure 3A)。この CHK1 阻害剤低感受性が誘導された FGFR2 を恒常的に発現する CHP134 細胞株は、下流の細胞増殖シグナルとして知られる MEK/ERK 経路の活性化が誘導されていた (Figure 3B)。そこで、CHK1 阻害剤と MEK1/2 阻害剤とを併用処理したところ、相乗的に感受性が高くなることが明らかとなった (Figure 3C)。

**Figure 3**



#### 4. 研究成果

ATM および DNA-PK の DNA 損傷応答遺伝子に対する阻害剤が CHK1 阻害剤の細胞増殖抑制効果を増強することを見出した。がん細胞におけるこれら DNA 損傷応答が CHK1 阻害剤の感受性低下を引き起こすと考えられたことから、一方では、がんにおけるこれら遺伝子の欠陥が CHK1 阻害剤の synthetic lethality となる可能性が示唆された。また、ATM および DNA-PK 阻害剤は CHK1 阻害剤低感受性がんにおける効果的な併用薬候補と考えられた。本研究成果は、International Journal of Molecular Sciences 誌に報告した。

CHK1 阻害剤低感受性細胞株において、MDM2 の結合分子 CEP131 が同定されたことから、中心体制御因子が新規治療標的となる可能性が示唆された。本研究成果は、Journal of Oncology 誌に報告した。

10 番染色体長腕の欠失に起因する FGFR2 遺伝子の機能喪失が CHK1 阻害剤に対する高感受性をもたらしている可能性が強く示唆された。このことは、10 番染色体の欠失が CHK1 阻害剤の完全奏功が期待しうがんの遺伝子背景の一つである可能性を示唆している。本研究成果は、Cancer Science 誌に報告した。

本研究では、CHK1 の機能阻害に対して ATM または DNA-PK の DNA 損傷修復機構及び FGFR2 の細胞増殖効果が補完的に働くことが明らかとなった。この成果は、がん細胞における CHK1 の機能的役割に新しい知見を与えるばかりでなく、がん細胞のこれら遺伝子背景を評価することによって CHK1 阻害剤の適切な臨床試験デザインにおける効果予測および適応決定の指標として有用であり、また併用治療薬の選択に臨床的意義が高いと考えられた。これらの研究成果は総論として Biomolecules 誌に報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ando Kiyohiro, Nakamura Yohko, Nagase Hiroki, Nakagawara Akira, Koshinaga Tsugumichi, Wada Satoshi, Makishima Makoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Co-Inhibition of the DNA Damage Response and CHK1 Enhances Apoptosis of Neuroblastoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3700 ~ 3700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20153700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suenaga Yusuke, Yamamoto Mami, Sakuma Tetsushi, Sasada Manabu, Fukai Fumio, Ohira Miki, Yamaguchi Yohko, Yamamoto Takashi, Ando Kiyohiro, Ozaki Toshinori, Nakagawara Akira	4. 巻 518
2. 論文標題 Tap63 represses transcription of MYCN/NCYM gene and its high levels of expression are associated with favorable outcome in neuroblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 311 ~ 318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ando Kiyohiro, C?zares-Ordo?ez Verna, Makishima Makoto, Yokoyama Atsushi, Suenaga Yusuke, Nagase Hiroki, Kobayashi Shinichi, Kamiyo Takehiko, Koshinaga Tsugumichi, Wada Satoshi	4. 巻 2020
2. 論文標題 CEP131 Abrogates CHK1 Inhibitor-Induced Replication Defects and Is Associated with Unfavorable Outcome in Neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2020/2752417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ando Kiyohiro, Nakagawara Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Acceleration or Brakes: Which Is Rational for Cell Cycle-Targeting Neuroblastoma Therapy?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 750 ~ 750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11050750	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Kiyohiro, Ohira Miki, Takada Ichiro, C?zares Ordo?ez Verna, Suenaga Yusuke, Nagase Hiroki, Kobayashi Shinichi, Koshinaga Tsugumichi, Kamiyo Takehiko, Makishima Makoto, Wada Satoshi	4. 巻 113
2. 論文標題 FGFR2 loss sensitizes MYCN amplified neuroblastoma CHP134 cells to CHK1 inhibitor?induced apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 587 ~ 596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤清宏、大平美紀、末永雄介、上條岳彦、永瀬浩喜、小林真一、和田聡
2. 発表標題 FGFR2の欠失はCHK1阻害剤が誘導する細胞死の感受性を増強する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤清宏
2. 発表標題 MDM2はp53とcentrosome-associated family proteinとの結合によりCHK1阻害剤感受性を増強する
3. 学会等名 第61回 日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤清宏
2. 発表標題 checkpoint abrogationを応用した神経芽腫治療の可能性
3. 学会等名 第60回 日本小児血液・がん学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安藤清宏、大平美紀、末永雄介、永瀬浩喜、横島誠、越永従道、上條岳彦、和田聡
2. 発表標題 CHK1阻害剤はFGFR2-MEK-ERK経路の抑制に相乗的に神経芽腫の増殖を抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末永 雄介  (Suenaga Yusuke)  (80581793)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ がん制御研究部・研究員   (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------