

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18423

研究課題名(和文) DNA複製阻害と細胞分裂促進を組み合わせた新規制がん戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer therapy strategies by promoting aberrant cell division in the presence of replication inhibitors

研究代表者

覺正 直子 (KAKUSHO, Naoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：30599593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：5FUなどS期阻害剤によるがん細胞死は、複製遅延から未複製領域が残存する状態でM期に進行する事で誘導されるという仮説に基づき、S期阻害とM期促進の組合せにより効率良く細胞死を誘導する戦略を提案した。

・Cdc7阻害剤によるS期阻害は、引き続きM期への進行時に細胞死を誘導した。・Cdc7阻害剤とWee1阻害剤(MK1775;M期進行を促進)の組合せは単独投与より効率良くがん細胞死を誘導した。・CCRF-CEM(白血病)、Lovo(結腸腺癌)、HeLa(子宮頸癌)等でも同様の効果が観察された。・HU(複製阻害)、Aphidicolin(DNAポリメラーゼ阻害)もMK1775との相乗効果を示した。

研究成果の概要(英文)：On the basis of our proposal that inhibition of S phase causes cancer cells to proceed into lethal M phase in the presence of unreplicated genomic segment, we proposed a novel cancer therapy strategy in which cancer cell death is promoted by combination of S phase inhibition and M phase promotion. We used inhibitors of Cdc7 kinase, essential for firing of replication origins in S phases, and showed that the Cdc7 inhibitor causes cell death only after cells have progressed through S phase in the presence of the inhibitor, apparently causing cancer cells to enter aberrant M phase. When combined with MK1775, the inhibitor of Wee1 kinase that inhibits M phase, Cdc7 inhibitor caused synergistic cell death effect on cancer cells including Colo205 (colon cancer) and CCRF-CEM(leukemia). HU and Aphidicolin also induced efficient cancer cell death in combination with MK1775.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：Cdc7キナーゼ Wee1キナーゼ 細胞周期 S期 M期 がん細胞死 キナーゼ阻害剤 DNA複製

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の Hallmark とされる遺伝的不安定性は、主に細胞周期進行に伴う染色体の複製・伝搬の異常に起因する。細胞周期の S 期と M 期が連動して秩序正しく進行する事によりゲノムは安定に維持される。がん細胞においてはこれらの連係が異常になる事によりゲノム不安定性が誘導される例が知られている。逆にこれはがん細胞の脆弱性であり、治療の標的となる。

がん細胞は、oncogenic stress という初期のゲノム・エピゲノム変化が誘導する複製ストレスに対する細胞応答が、破綻することにより引き起こされると言われている。したがって、がん細胞は、その元来の性質として複製ストレスに対して感受性が高いといえる。実際、がんの治療には、DNA 合成を阻害する 5FU(代謝拮抗剤)、Cisplatin(DNA 架橋剤)などが使用される。

しかし、複製ストレスによるがん細胞死のメカニズムはよく理解されていない。複製ストレスによるがん細胞死のメカニズムを解明することにより、より効果的な制がん戦略が期待される。

2. 研究の目的

研究代表者は S 期を制御する Cdc7 キナーゼの構造・機能解析の過程でこれを阻害することにより多くのがん細胞において特異的に細胞死が誘導される事を見いだした。さらにこの細胞死は主に異常な M 期進行に伴い誘導される。代表者は Cdc7 阻害による S 期の阻害が複製進行に遅延をもたらし、その結果がん細胞においては未複製領域が残存した状態で異常な M 期に進行する事により細胞死が誘導されるという仮説を提案した。更にこの仮説に基づき S 期阻害と M 期促進を組み合わせて効率よいがん細胞死を誘導するという戦略を提案した。本研究ではこれらの仮説を検証し、がん細胞死誘導のメカニズムを解明し、さらに有効な制がん戦略を策定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 用いたヒト細胞

WI-38(正常細胞), Colo205, LoVo, HCT116(結腸癌), CCRF-CEM(白血病細胞), HCT-15-Luc#1(大腸癌細胞), HeLa(子宮頸癌細胞), 293T(腎臓癌細胞)

(2) 細胞周期同調

2.5mM Thymidine 入り培地で 16 時間、その後薬剤なしの培地に release し 9 時間、2.5mM Thymidine 入り培地で 16 時間培養の後、薬剤なしの培地に release し、タイムコースを追う。

(3) 細胞周期、細胞死の解析

細胞 DNA を Propidium Iodide(PI)で染色し、FACS により細胞周期を解析した。また死細胞の割合は subG1 集団(2C より少ない DNA 含量の細胞を割合)を測定することにより推定した。

4. 研究成果

S 期阻害因子によるがん細胞死誘導のメカニズム

HeLa (ヒト子宮頸癌) U2OS (ヒト骨肉腫) Colo205 (ヒト大腸癌) などの細胞は、S 期の阻害剤である Cdc7 キナーゼ阻害剤を添加すると、やがて細胞死が誘導される。この細胞死のメカニズムを解析するために、細胞周期同調細胞(図1)を用いて、Cdc7 阻害剤添加のタイミングを変化させ、添加後の細胞の状態を解析した。

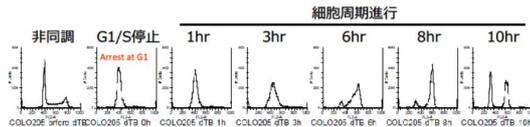


図1 Colo205 の細胞周期同調

Colo205 細胞を double thymidine block により G1/S 境界に停止。その後 thymidine を含まない培地に release して release 後の各時間における細胞周期分布を FACS で解析した。8 時間後に S 期はほぼ終了し、10 時間後には一部の細胞が分裂を終了しつつあることがわかる。

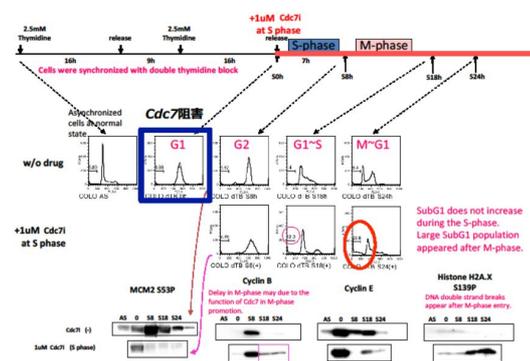


図2 Cdc7 阻害剤添加の同調細胞への影響(1)

double thymidine block からの release 時に Cdc7 阻害剤を添加。その後定時的に FACS で細胞周期解析。M 期を終了した時点で死細胞が検出される。

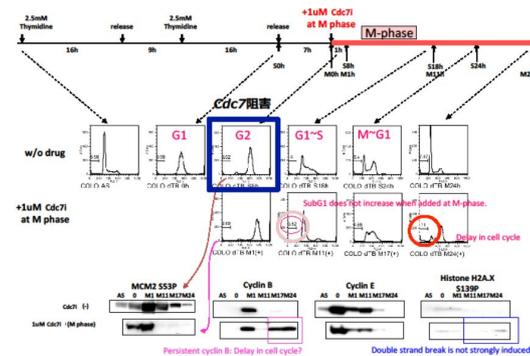


図3 Cdc7 阻害剤添加の同調細胞への影響(2)

double thymidine block からの release 後 7 時間(S 期終了後)時に Cdc7 阻害剤を添加。その後定時的に FACS で細胞周期解析。次の M 期に細胞死は観察されないが、次の S 期を経て、二回目の M 期を終了した時点で死細胞が検出される。

S 期開始時あるいは S 期開始前に添加した場合には、細胞は S 期進行はやや遅延するが、細胞死は観察されない。しかし、次の M 期に侵入する際に DNA 損傷を誘導し、細胞死にいたる (図 2)。一方、S 期の終了後(G2 期)に Cdc7 阻害剤を添加した場合には、次の S 期に細胞死はみられないが、次の S 期終了後の細胞分裂時に細胞死にいたる (図 3)。このことから、薬剤の存在下で、S 期を通過することが、M 期に細胞死に至ることに必要であることが示唆された(図 4)。

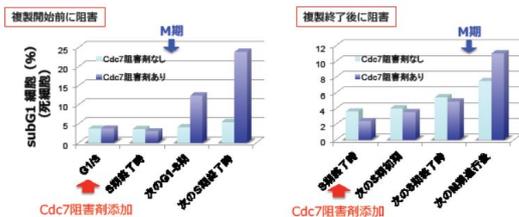


図 4 S 期阻害のタイミングの細胞死に及ぼす影響のまとめ

M 期進行促進との併用によるがん細胞死促進

上記の結果は、S 期阻害の状態でも M 期に進行することによりがん細胞死が誘導されることを示す。これは、M 期進行を促進させることにより S 期阻害による細胞死を効率よく誘導できる可能性を示唆する。M 期進行は Cdc2-CyclinB により誘導されるが、Cdc2 の活性は Y14,15 のリン酸化により制御され、Cdc25 脱リン酸化酵素により促進され、Wee1 キナーゼにより阻害される。したがって、Wee1 キナーゼを阻害することにより M 期進行が促進される (図 5)。MK1775 は Wee1 キナーゼの特異的阻害剤として知られている。Colo205 細胞を用いて Cdc7 阻害剤と MK1775 の併用による細胞死への影響を測定した。その結果、両方の薬剤の存在下でより強い細胞死が観察された (図 6)。逆に M 期を阻害する薬剤 Paclitaxel と共用すると、Cdc7 阻害剤による細胞死がやや減少した (図 7)。

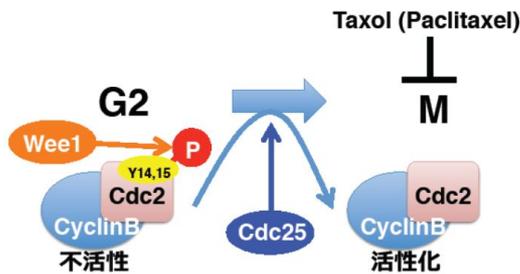


図 5 Cdc2 キナーゼ活性を制御する因子

Wee1 キナーゼは Cdc2 の Y14,15 をリン酸化しその活性を抑制する。一方、Cdc25 脱リン酸化酵素はこのリン酸化基を外すことにより Cdc2 を活性化する。したがって、Wee1 の阻害により Cdc2 は活性化され M 期進行が促進される。

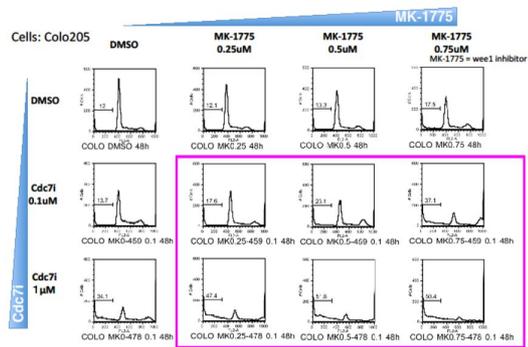


図 6 直腸癌細胞 Colo205 に対する Cdc7 阻害剤と MK1775 の併用の影響

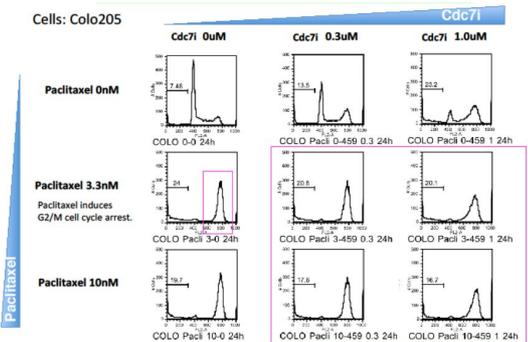


図 7 直腸癌細胞 Colo205 に対する Cdc7 阻害剤と Paclitaxel の併用の影響

他の癌細胞種での解析

Lovo (ヒト結腸腺癌細胞), CCRF-CEM (ヒト白血病細胞), HCT-15 (ヒト大腸癌細胞) において HU+MK1775 の併用による強い Synergy が観察された。特に、CCRF-CEM は、単独ではほとんど影響ないが、併用により特に強い細胞死が観察された (図 8)。

一方、正常細胞 (WI38; ヒト皮膚由来繊維芽細胞) では、HU+MK1775 の細胞周期への影響は観察されなかった (図 8)。

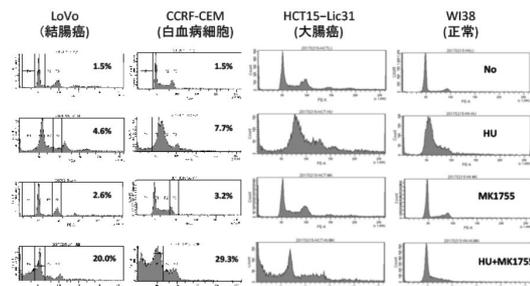


図 8 種々の癌細胞における S 期阻害と MK1775 の併用の効果

HU は 1mM, MK1775 は 1μM で 24 時間投与した。

他の薬剤を用いた解析

Cdc7 阻害剤以外の S 期阻害剤と MK1775 との組み合わせについてその CCRF-CEM 細胞に及ぼす影響を検討した。HU (ヒドロキシ尿素、リボヌクレオチドリダクターゼを阻害することにより複製を阻害する) は、MK1775 と強い相乗効果を示すことを見出した。両方の薬剤の titration を行った結果、

HU 0.1mM+MK1775 0.1μM で最も強い細胞死誘導の相乗効果が観察された(図9)。
HU 以外の S 期進行に障害を及ぼす薬剤 (Aphidicolin, Etoposide、Cisplatin、5FU、Paclitaxel、Gemcitabine) と MK1775 との組み合わせが CCRF-CEM 細胞の細胞死に及ぼす影響を解析したところ、これらの薬剤のなかでは、Aphidicolin(DNA ポリメラーゼ阻害剤)が、もっとも強い MK1775 との相乗効果を示した。また、SAC(Spindle Assembly Checkpoint)に必要な Mps1 キナーゼ阻害剤 Reversin との組み合わせでも、一部の細胞で同様な効果が観察された。

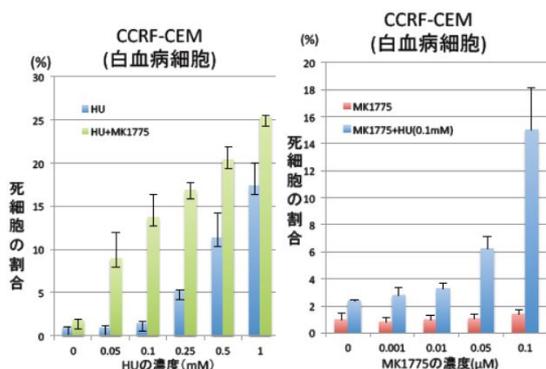


図9 白血病細胞 CCRF-CEM における S 期阻害と MK1775 の併用の効果
HU は 1mM, MK1775 は 1μM で 24 時間投与した。

まとめ

5FU など、S 期進行に影響を与える薬剤は、制癌剤として現在臨床に最も頻りに用いられている薬剤である。本研究では、これらの薬剤が細胞死を誘導するメカニズムを解析した。その結果、S 期の障害をかかえたまま、M 期に進行することにより細胞死にいたる可能性が示唆された。おそらく、複製遅延のため未複製領域が残存したまま M 期に進行し染色体断裂などの損傷が生じ、細胞死にいたると推定している。正常細胞では、複製完了をモニターするチェックポイントシステムが完備しているため、このような異常な M 期への進行は防がれている(図10)。

現在、S 期阻害剤により処理されたがん細胞における未複製領域領域を染色体コピー数の測定により、同定するとともに、正常細胞において複製完了をモニターするチェックポイントシステムに関する因子の同定を試みている。また複製阻害と M 期進行の併用による腫瘍抑制効果について Xenograft 実験系により検証する予定である。

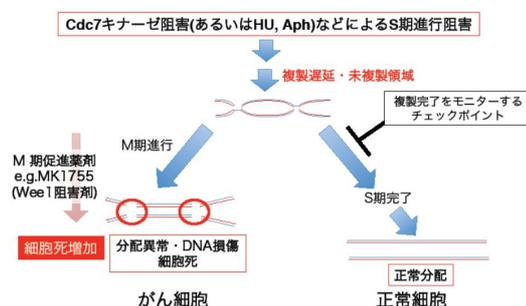


図10 まとめ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Matsumoto S, Kanoh Y, Shimmoto M, Hayano M, Ueda K, Fukatsu R, Kakusho N, Masai H. Checkpoint-Independent Regulation of Origin Firing by Mrc1 through Interaction with Hsk1 Kinase. *Mol Cell Biol*. 2017e00355-16 査読有 doi: 10.1128/MCB.00355-16

Kanoh Y, Matsumoto S, Fukatsu R, Kakusho N, Kono N, Renard-Guillet C, Masuda K, Iida K, Nagasawa K, Shirahige K, Masai H. Rif1 binds to G quadruplexes and suppresses replication over long distances. *Nat Struct Mol Biol*. 2015 22 889-97 査読有 doi: 10.1038/nsmb.3102

Jeffery DC, Kakusho N, You Z, Gharib M, Wyse B, Drury E, Weinreich M, Thibault P, Verreault A, Masai H, Yankulov K. CDC28 phosphorylates Cac1p and regulates the association of chromatin assembly factor I with chromatin. *Cell Cycle*. 2015 14 74-85 査読有 doi: 10.4161/15384101.2014.973745.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/genome/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

覺正 直子 (KAKUSHO, Naoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：30599593