



Title	細胞周期チェックポイントの阻害が制がん剤および放射線の殺細胞効果に与える影響の解析〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	鈴木, 基史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第12618号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65662
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Motofumi_Suzuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：鈴木 基史

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

細胞周期チェックポイントの阻害が制がん剤および

放射線の殺細胞効果に与える影響の解析

がん治療に用いられる制がん剤や放射線によって活性化する細胞周期チェックポイントには、主に G_1 期チェックポイント、 G_2 期チェックポイントならびにスピンドル形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint; SAC) の三つが存在する。正常な細胞では、これらのチェックポイントが活性化することで、DNA 損傷や染色体異常から細胞を防護している。一方、多くのがん細胞では p53 遺伝子の変異欠失などの理由から、 G_1 期チェックポイントの機能不全に陥っていることが多い。その代償機構として、がん細胞では G_2 期チェックポイントまたは SAC を制御するタンパク質を過剰に発現しており、それらの機能が正常細胞に比べて亢進している。そのため、 G_2 期チェックポイントまたは SAC に関わるタンパク質はがん特異的な治療標的になり得ると考えられており、近年これらを標的とする低分子阻害剤がいくつか開発されている。そこで本研究では、制がん剤または放射線により活性化したチェックポイントをその特異的阻害剤により抑制することが、既存のがん治療法による殺細胞効果に与える影響について検討した。

第一章では G_2 期チェックポイントに着目して研究を行った。放射線により発生した DNA 損傷は、 G_2 期チェックポイントを活性化することがよく知られている。 G_2 期チェックポイントの活性化に関わるリン酸化酵素の一つに Checkpoint kinase 1 (Chk1) があり、これまでに Chk1 を阻害すると放射線によって誘導された G_2 期チェックポイントが抑制されることが明らかとなっている。そのため、7-hydroxystaurosporine (UCN-01) や AZD7762 といった Chk1 阻害剤を放射線と併用することで放射線の殺細胞効果を増強できることが報告されている。しかし、これまでに用いられてきた低分子阻害剤は Chk1 に対する特異性が低いことや、毒性が強いことなどから臨床応用には至っていない。そこで本章では、近年開発された Chk1 阻害剤である MK-8776 を用いて、Chk1 を介した G_2 期チェックポイントの阻害が放射線による殺細胞効果に与える影響について、古典的 Chk1 阻害剤である

UCN-01 と比較・検討した。まず、亜致死濃度の Chk1 阻害剤と放射線を併用した際の細胞生存率についてコロニー形成試験により評価した。両 Chk1 阻害剤は放射線増感効果を示したが、治療線量域に相当する 2.5 Gy で比較した際には、MK-8776 でのみ放射線増感効果が観察された。このことから、MK-8776 は UCN-01 に比べて有用な放射線増感剤になり得る可能性が示唆された。次に細胞周期への影響について細胞の DNA 量をフローサイトメーターで計測することで解析したところ、MK-8776 は放射線によって誘起された G₂ 期チェックポイントを有意に抑制した。さらに、異常な細胞周期進行に伴って生じる分裂期崩壊および中心体複製異常について顕微鏡下で観察・評価したところ、MK-8776 はそれら 2 つの事象を有意に増悪した。このことから、MK-8776 による増感効果は分裂期崩壊および中心体複製異常の増加に起因することが示された。次に MK-8776 が DNA 損傷修復過程に及ぼす影響について免疫染色により評価したが、顕著な変化は観察されなかった。このことから、MK-8776 による増感効果に DNA 損傷修復機構が影響しないことが示された。最後に MK-8776 の有糸分裂機構への影響を評価するため、ライブセルイメージング技術を用いてタイムラプス観察による解析を行った。その結果、X 線照射後に MK-8776 を処理することで放射線誘発性の分裂期停止が顕著に延長することが明らかとなった。以上より、MK-8776 による G₂ 期チェックポイントの抑制が不適切な分裂期の開始および分裂期の延長を誘導し、分裂期崩壊および中心体複製異常を増悪したことが放射線増感効果につながることを示唆された。

第二章では SAC に着目して研究を行った。制がん剤や放射線に暴露された細胞では、G₂ 期チェックポイントの他に SAC も活性化されることが近年明らかになっている。SAC の活性化を制御するリン酸化酵素として polo-like kinase 1 や aurora kinase などが知られている。これまでに、これらのリン酸化酵素の阻害を介した SAC の抑制が既存のがん治療法の殺細胞効果を増強することが報告されており、このことは SAC ががん細胞の治療抵抗性に寄与している可能性を示唆している。しかし、これまでに SAC 関連キナーゼとされてきたリン酸化酵素の多くは G₂ 期チェックポイントや細胞質分裂などを含む多くの細胞周期イベントも同時に制御することが明らかになっている。つまり、これまでの報告における増感効果は、本質的な SAC の阻害がもたらす影響を反映しているとは言い難く、既存のがん治療法と SAC の関係性についてより直接的な影響を評価する必要があると考えられる。そこで本章では、SAC に限局した機能を持つリン酸化酵素である monopolar spindle 1 (MPS1) に着目した。MPS1 は SAC 活性化に必須のリン酸化酵素であり、その阻害により SAC が抑制されることが報告されている。本研究では二種類の MPS1 阻害剤 NMS-P715 および AZ3146 を用いて、SAC の抑制が遺伝毒性ストレスであるエトポシドおよび放射線の殺細胞効果に与える影響について検討した。まず、亜致死濃度の MPS1 阻害剤とエトポシドまたは放射線を併用した際の細胞生存率についてコロニー形成試験により評価したところ、エトポシドと MPS1 阻害剤の併用でエトポシド単独に比べて細胞生存率の低下が観察されたのに対し、放射線との併用では細胞生存率の変化は観察されなかった。次にエトポシドにおいてのみ増感効果をもたらす機構を解明するため、MPS1 阻害剤の細胞周期への影響を細胞の DNA 量をフローサイトメーターで計測することで解析した。その結果、MPS1 阻害剤とエトポシドを併用することで 4 倍体細胞の増加が観察されたのに対し、MPS1 阻害剤は X 線

を照射された細胞の細胞周期に影響を与えなかった。これらのことから、MPS1 を介したエトポシド誘発性 SAC の抑制が異常な細胞周期進行を誘導する可能性が考えられた。そのため、異常な細胞周期進行に伴って発生すると考えられる分裂期崩壊および中心体複製異常について顕微鏡下で観察・評価したところ、MPS1 阻害剤はそれらを有意に増強した。これらのことから、MPS1 阻害剤による増感効果は分裂期崩壊の増加に起因することが示唆された。以上より、MPS1 阻害剤はがん細胞のエトポシド感受性を増強するのに対し、放射線に対する感受性には影響を与えないことが示された。また、エトポシドによって誘導された SAC 活性が MPS1 阻害剤によって抑制されることで異常な細胞周期進行を誘導し、分裂期崩壊および中心体複製異常を増加したことが増感効果につながったと考えられる。

本研究の結果から既存のがん治療法とチェックポイント阻害剤を併用することはがん細胞の異常な有糸分裂および中心体複製異常を誘導し、分裂期崩壊による細胞死を増強できることから有用な治療戦略になり得ると考えられる。