



Title	5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells
Author(s)	赤坂, 智史
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51977
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	赤坂 智史
論文題名 Title	5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells (5-FU耐性はp53変異大腸癌細胞においてcheckpoint kinase 1阻害で誘導される細胞障害性の増幅を無効化する)
論文内容の要旨 〔目的〕 種々の抗癌剤治療は、DNA損傷を与えることにより癌細胞を細胞死へ誘導するが、重大な問題に薬剤耐性の獲得が挙げられる。薬剤耐性には、薬剤トランスポーターやDNA損傷への抵抗性など多様なメカニズムが関与している。抗癌剤によって生じたDNA損傷は、細胞周期のチェックポイント機構によって認知され、細胞周期の進行を止めるとともにDNA修復機構を活性化させるが、DNA損傷チェックポイントは、大きくATM-Chk2-p53経路とATR-Chk1経路によって制御されている。多くの癌では遺伝子変異などでp53経路が障害されており、その為DNA損傷を引き起こした後のDNA修復機構はATR-Chk1経路に依存している。そこで、Chk1を阻害する薬剤を併用することでDNA損傷を癌細胞特異的に増幅させ、細胞死を引き起こすこと(synthetic lethality)を期待して多くの薬剤が開発されている。また、Chk1活性は抗癌剤や放射線療法への治療抵抗性と相関し、Chk1シグナルの亢進は薬剤耐性獲得に関与するとの報告もある。しかし、大腸癌のkey drugである5-FUとChk1阻害剤によるsynthetic lethality効果、及び5-FU耐性機構におけるChk1活性の関与とChk1阻害剤の効果の検討はなされていない。そこで本研究では、p53変異大腸癌細胞における5-FUとChk1阻害剤併用でのsynthetic lethalityの可能性、およびその5-FU耐性化に伴うChk1シグナルの変化と5-FU耐性細胞に対するChk1阻害剤の効果を検討することを目的とした。 〔方法〕 p53変異大腸癌細胞(HT29)に段階的に5-FUの濃度を上げて投与し、長期間培養することにより5-FU耐性株(5FUR)を樹立し、その表現型とChk1阻害剤の効果を実験(Parent)と以下の項目で比較検討した。 生細胞測定をWST assayで、細胞内5-FU濃度をgas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)、細胞死・細胞周期をFlow cytometry、DNA損傷をAlkaline comet assay、Chk1 シグナル及びthymidylate synthase(TS)のタンパク発現をWestern blot analysisで解析した。 〔成績〕 5-FU存在下培養において、5-FUの濃度依存的にParentの生細胞数は減少したが、5FURではParentに比べ、有意に5-FUの濃度依存的な生細胞数の減少が減弱していた。5-FU耐性機構として、細胞内5-FU濃度とfree TSのタンパク量を検討したが、Parent、5FUR間で有意な差は認めず、Alkaline comet assayでも、Parent、5FURとも5-FU投与で同程度DNA損傷が生じていることが確認された。細胞周期解析で、Parentにおいて5-FU投与でsub-G1分画(細胞死)には変化がなく、S-G2/M arrestを認めたことから、5-FUの抗腫瘍機構としては増殖抑制によることが示唆されたが、5FURでは5-FU投与で細胞周期に変化は認めず、5FUによる増殖抑制効果が消失していた。Chk1 シグナルのWestern blot analysisで、Parentでは5-FU投与でATM-Chk1のリン酸化亢進を認めたが、5FURではそれらのリン酸化の亢進は認めなかった。Chk1阻害剤(SB218078)は、Parentでは5-FUによるearly S-phase arrestを減少させsub-G1分画(細胞死)を増加させるsynthetic lethalityを誘導したが、5FURでは5-FUの存在下・非存在下に関わらず、細胞周期・細胞死に有意な変化を惹起しなかった。 〔総括〕 p53変異大腸癌細胞(HT29)では5-FUによりDNA傷害が生じ、Chk1活性化を介したS-G2/M arrestが惹起され、さらにChk1阻害剤の併用で細胞死が誘導されるsynthetic lethalityを認めたが、5-FU耐性株(HT29 5FUR)では5-FUによりDNA傷害は惹起されるものの、Chk1シグナルの亢進・細胞周期の停止は認めず、Chk1阻害剤併用によるsynthetic lethalityは無効化されていた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		赤坂 智史	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	竹原 敏郎
	副 査	大阪大学教授	桑木 良典
	副 査	大阪大学教授	森井 栄一

論文審査の結果の要旨

種々の抗癌剤治療は、DNA損傷を与えることにより癌細胞を細胞死へ誘導するが、重大な問題に薬剤耐性の獲得が挙げられる。抗癌剤によって生じたDNA損傷は、細胞周期のチェックポイント機構によって認知され、細胞周期の進行を止めるとともにDNA修復機構を活性化させるが、DNA損傷チェックポイントは、大きくATM-Chk2-p53経路とATR-Chk1経路によって制御されている。多くの癌では遺伝子変異などでp53経路が障害されており、その為DNA損傷を引き起こした後のDNA修復機構はATR-Chk1経路に依存している。そこで、Chk1を阻害する薬剤を併用することでDNA損傷を癌細胞特異的に増幅させ、細胞死を引き起こすこと(synthetic lethality)を期待して多くの薬剤が開発されている。また、Chk1活性は抗癌剤や放射線療法への治療抵抗性と相関し、Chk1シグナルの亢進は薬剤耐性獲得に関与するとの報告もある。しかし、大腸癌のkey drugである5-FUとChk1阻害剤によるsynthetic lethality効果、及び5-FU耐性機構におけるChk1活性の関与とChk1阻害剤の効果について検討はなされておらず、そのメカニズムを明らかにすることは、大腸癌の治療において重要である。今回申請者は、p53変異大腸癌細胞では5-FUによりDNA傷害が生じ、Chk1活性化を介したS-G2/M arrestが惹起され、さらにChk1阻害剤の併用で細胞死が誘導されるsynthetic lethalityを認めたが、5-FU耐性株では5-FUによりDNA傷害は惹起されるものの、Chk1シグナルの亢進・細胞周期の停止は認めず、Chk1阻害剤併用によるsynthetic lethalityは無効化されていることを明らかにした。大腸癌による死亡者は多く、5-FU耐性機構におけるChk1活性の関与とChk1阻害剤の効果を明らかにした点において、本研究は新規かつ臨床的に意義の高い研究と考えられる。

以上より、申請者は学位の授与に値すると考えられる。