

## 神経芽腫におけるCHK1阻害剤の治療効果予測マーカーの開発

安藤清宏<sup>1)</sup>, カサレスヴェルナ<sup>1)</sup>, 横山 淳<sup>2)</sup>, 上原秀一郎<sup>3)</sup>,  
金田英秀<sup>3)</sup>, 槇島 誠<sup>1)</sup>, 越永従道<sup>3)</sup>

## Identification of a predictive marker for response to CHK1 inhibitor in neuroblastoma therapeutics

Kiyohiro ANDO<sup>1)</sup>, Verna CAZARES<sup>1)</sup>, Shuichiro UEHARA<sup>2)</sup>,  
Hide KANEDA<sup>2)</sup>, Makoto MAKISHIMA<sup>1)</sup>, Tsugumichi KOSHINAGA<sup>2)</sup>

## 要旨

Checkpoint kinase 1 (CHK1) 蛋白質に対する阻害剤は、神経芽腫を含む様々ながんの治療薬となる可能性が期待されて臨床試験が進められている。本研究は、臨床応用に向けたCHK1阻害剤がもつ癌細胞の増殖抑制効果の分子機構の解析およびその感受性を決定しうるバイオマーカーの探索を目的とした。CHK1阻害剤に感受性の低いNB-39-nu細胞においてCHK1阻害剤処理によって癌遺伝子MDM2の発現上昇が誘導されることに着目して、CHK1阻害剤の存在下にMDM2と複合体を形成するタンパク質を探索し、その候補から神経芽腫の予後と関連するASAP1およびCEP131を同定した。

## 1. はじめに

細胞周期のS/ G<sub>2</sub>/ M期に中心的な役割を担うCheckpoint kinase 1 (CHK1) 蛋白質に対する阻害剤は、様々ながんの横断的な治療薬となる可能性が期待されて10年来開発が進められている<sup>1)</sup>。近年、神経芽腫を含むいくつかのがん種の非臨床において、CHK1阻害剤の単剤での有効性が報告されており、小児がん領域においてもCHK1阻害剤の第I相および第II相海外臨床試験がすすめられている。しかしながら、CHK1阻害剤単剤での抗腫瘍効果の分子機構については未だ不明な点が多く、さらに臨床応用のためには感受性を決定しうるバイオマーカーの同定が急務の課題である。本研究は、CHK1阻害剤による神経芽腫細胞株の増殖抑制効果の分子機構の解明と臨床応用が可能な効果予測マーカーを開発することによって、難治性神経芽腫に対する治療成績の向上に寄与することを目的として行った。

## 2. 対象及び方法

これまでの研究において、CHK1阻害剤 (PF-477736) に比較的に感受性の低い神経芽腫NB-39-nu細胞株ではCHK1阻害剤処理に応答してp53の下流遺伝子の一つであり癌遺伝子として広く知られているMDM2の発現が亢進することが判明した。本研究ではNB-39-nu細胞におけるMDM2の発現をsiRNAによって抑制した際に細胞増殖に及ぼす影響を対照群と比較することによってCHK1阻害剤に対する感受性の変化の有無を検討した。さらに、CHK1阻害剤処理に応答してMDM2タンパク質と複合体を形成する分子を免疫沈降法により回収してSDS-PAGEにより分離、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を行なった。CHK1阻害剤処理によって、無処理の対照と比較して強く染色されたバンドをゲルより切り出したのち質量分析によって同定した。同定されたMDM2結合分子を公開されている

1) 日本大学医学部生体機能医学系生化学分野

2) 東北大学大学院分子内分生物学

3) 日本大学医学部外科学系小児外科分野

安藤清宏: kiyohiroan@med.showa-u.ac.jp

データベース (R2: Genomics Analysis and Visualization Platform) を用いて神経芽腫の予後との関連の有無を検討した。

### 3. 結果

NB39-nu細胞におけるMDM2の発現をsiRNAによって抑制したところ、CHK1阻害剤の細胞増殖抑制効果が減弱したことから、MDM2はCHK1阻害剤による細胞増殖抑制効果に必要な分子であることが判明した (図1)。

次に、CHK1阻害剤処理に応答してMDM2と共沈

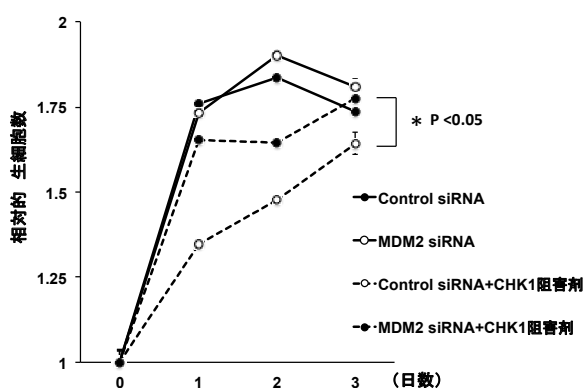


図1 MDM2はNB-39-nu細胞におけるCHK1阻害剤の細胞増殖抑制効果に必要な構成分子である。

するタンパク質を展開した結果、100-150 kDa付近に濃染するバンドが観察された (図2A: 赤矢印)。質量分析により同定された当該バンドに含まれる分子の候補からデータベース解析によって神経芽腫の予後と関わる分子であるASAP1およびCEP131が同定された (図2B)。

### 4. 考察

p53のもつ転写活性化能の標的遺伝子の一つであるMDM2は、さまざまな種類の癌においてその遺伝子座の増幅や転写産物の高発現が報告されており、さらにその機能が癌抑制遺伝子p53のタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼであることから、癌遺伝子の一つと考えられている<sup>2)</sup>。しかしながら本研究において明らかとなったCHK1存在下におけるMDM2の細胞増殖抑制効果の分子機構は、p53蛋白質の分解に関わる機能だけでは説明が困難と考えられた。CHK1阻害剤処理によってMDM2との複合体形成が増強されたASAP1およびCEP131は、いずれもmRNAの高発現と神経芽腫の不良な予後に相関する傾向が示されたが、両者はいくつかの成人の癌においても腫瘍の進展・転移・予後不良等に関連することが報告されている癌関連遺伝子であった<sup>3) 4)</sup>。これらの結果より、MDM2はCHK1阻害剤処理に応答して両分子との結合を介してそれら

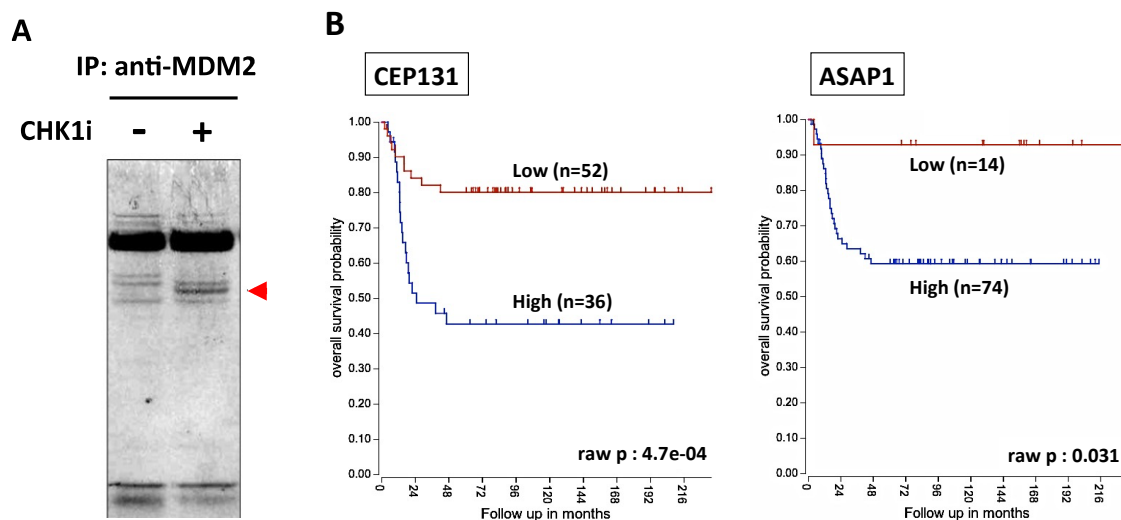


図2 CHK1阻害剤によりMDM2との結合が誘導されるCHK1阻害剤感受性決定分子の同定。A, NB-39-nu細胞を無処理 (-) およびCHK1阻害剤 (CHK1i) あり (+) の条件で抗MDM2抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行い、展開した産物を染色した。B, CEP131およびASAP1と神経芽腫の予後との関連。

の機能を抑制することで神経芽腫の細胞増殖を抑制する可能性が推察された。今後は、両分子とMDM2との機能的相互作用の解析を進めることで、その分子機構の面からの検討を行い、難治性神経芽腫に対するCHK1阻害剤治療の効果予測バイオマーカーの開発を進めてゆく。

#### 4. 結 語

CHK1阻害剤の感受性に関わるMDM2結合分子としてCEP131およびASAP1を同定した。

#### 文 献

- 1) Bartek J and Lukas J. *Nature*. **2003**, 421, 486-488.
- 2) Jan-Philipp Kruse and Wei Gu. *Cell*. **2009**, 137, 609-622.
- 3) Müller T1, Stein U, Poletti A, Garzia L, Rothley M, Plaumann D, Thiele W, Bauer M, Galasso A, Schlag P, Pankratz M, Zollo M, Sleeman JP. *Oncogene*. **2010**, 29, 2393-403.
- 4) Liu XH, Yang YF, Fang HY, Wang XH, Zhang MF and Wu DC. *Int J Biochem Cell Biol*. **2017**, 90, 1-8.