

論文内容の要旨

報告番号		氏名	伊藤 宗一郎
Inhibition of the ATR kinase enhances 5-FU sensitivity independently of non-homologous end-joining and homologous recombination repair pathways			
ATRのキナーゼ活性阻害は非相同末端結合および相同組換えの修復経路非依存的に5-FUによる細胞感受性を増強する			

論文内容の要旨

5-fluorouracil (5-FU) は、DNA 一本鎖切断 (SSB) や二本鎖切断 (DSB) を誘導することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられており、様々な悪性腫瘍の治療に使用されている。Ataxia telangiectasia and RAD3-related protein (ATR) は、S 期と G2/M 期において、SSB や DSB 等の DNA 損傷に応答し細胞周期の停止を誘導する役割を担う。本研究では、ATR のキナーゼ活性を選択的に阻害することによる細胞の 5-FU 感受性増強の分子機構を明らかにすることを目的とした。

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株である SAS と HSC3 を用いて、5-FU 処理による DNA 修復関連因子のタンパク質量およびその活性の変動をウエスタンブロットイングにて分析した。5-FU に ATR 阻害剤 (ATRi)、ATM 阻害剤、DNA-PK 阻害剤を併用し、細胞生存率を算出した。フローサイトメトリにて細胞周期、DSB、アポトーシスの評価を行った。中性コメットアッセイおよび γ H2AX 免疫染色にて DSB の、ヘキスト染色にてアポトーシスの評価を行った。RNA シーケンスおよび定量 PCR にて遺伝子発現解析を行った。さらに、相同組換え (HR) 因子の *BRCA2* が変異したチャイニーズハムスター肺線維芽細胞株、非相同末端結合 (NHEJ) 因子の *Lig4* および HR 因子の *Rad54* が欠損したマウス胎児線維芽細胞株を用いて細胞生存率を算出し、5-FU と ATRi の感受性の検討を行った。

5-FU 単剤処理では ATR の自己リン酸化が促進し、ATRi の併用によってそのリン酸化が抑制された。5-FU と ATRi の併用は、その他阻害剤との併用と比較し高い殺細胞効果を示した。5-FU と ATRi の併用は、DSB やアポトーシスの誘導が増加した。5-FU によって S 期以降での細胞周期の停止が確認された。遺伝子発現解析では、5-FU によって S 期以降での細胞周期の停止に関わる遺伝子の発現が確認された。*BRCA2* 変異細胞および *Lig4* と *Rad54* の両遺伝子欠損細胞への 5-FU と ATRi の併用処理後の細胞生存率の結果から、既知の DNA 修復機構以外による ATR の分子動態が 5-FU 感受性増強に影響している可能性が示唆された。

本研究により、ATR のキナーゼ活性阻害は、NHEJ および HR の修復経路非依存的に 5-FU による細胞感受性を増強することが明らかとなった。