抗腫瘍治療の分子メカニズム

佐 谷 秀 行

Molecular Mechanisms of Anti-cancer Therapies

by

Hideyuki Saya, M.D.

from

Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, University of Kumamoto

Cell cycle checkpoints block the transition from one phase of the cell cycle to the next phase until all processes are completed. Defects in these checkpoint functions lead to genomic instability, which results in the development of malignant tumors. However, it has become known that a loss of checkpoint function is directly related to sensitivity to antineoplastic treatments. Most cancer cells are deficient in G1 checkpoint function and therefore fail to arrest in the G1 phase on exposure to genotoxic agents. Instead, they accumulate temporarily in the G2 phase. However, given that the G2 checkpoint is also partially impaired in cancer cells, they are unable to maintain G2 arrest and eventually die as they enter mitosis. This process is known as mitotic catastrophe or mitotic death.

Mitotic catastrophe is an important mechanism for the induction of cell death in cancer cells by antineoplastic agents. Cells entering mitosis with DNA damage arrest at metaphase for more than 10hr without chromosome segregation and subsequently die directly from metaphase. This long-term metaphase arrest before catastrophic death is termed the "precatastrophic phase". We found that spindle check is activated during the precatastrophic phase. Therefore, inhibition of the spindle checkpoint function as a result of depletion of BubR1 or Mad2 by RNAi caused cells to escape from mitotic catastrophe and led to subsequent abnormal mitosis when DNA damage is induced. Our data suggest that a dysfunction of the mitotic checkpoint in cancer cells may confer resistance to DNA-damaging agents and malignant progression.

In this review article, I would like to summarize how cancer cells are terminated by DNA-damaging agents and anti-mitotic drugs. Based on these findings, I would like to propose the novel mechanisms by which tumors become insensitive to those chemotherapeutic agents.

(Received July 10, 2006 ; accepted July 22, 2006)

Key words : chemotherapy, mitosis, checkpoint, cell cycle**Jpn J Neurosurg (Tokyo) 15 : 688-693, 2006**

はじめに

現在臨床で使用されている抗腫瘍剤の多くは、正常細胞の傷害は最小限にとどめ癌細胞のみを死滅させるといいう *in vitro* のスクリーニングによって得られたものであ

り、その抗腫瘍効果の分子メカニズムは意外にも明らかになっていない。また、現在行われている抗腫瘍治療の多くは、癌腫に対してある程度の効果を発揮するものの、正常細胞への影響（副作用）が無視できないために、いまだに理想的な治療とはいえない。抗腫瘍剤がどのような

熊本大学大学院医学薬学研究部腫瘍医学分野／〒860-8556 熊本市本荘 1-1-1〔連絡先：佐谷秀行〕

Address reprint requests to: Hideyuki Saya, M.D., Department of Tumor Genetics and Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Kumamoto-shi, Kumamoto 860-8556, Japan

Fig. 1 Effects of DNA damaging agents in normal cells and cancer cells

Treatment of normal cells with DNA damaging agents induces cell cycle arrest at the G2 phase because the G2 checkpoint is intact in the normal cells. When the DNA damage is repaired, the cells revert back to their normal cell cycle. When the damage is irreparable, the cells undergo apoptosis. In contrast, cancer cells which have a G2 checkpoint impairment cannot arrest at the G2 phase in the presence of DNA damage. Those damaged cells enter mitosis instead and arrest at the metaphase. When the spindle checkpoint is intact, cells undergo mitotic catastrophe after a long-term metaphase arrest. However, cells with an impaired spindle checkpoint function escape mitotic catastrophe, resulting in aberrant mitosis.

機構によって癌細胞を殺すのか、また癌細胞と正常細胞の感受性の差がどのような要因に基づくのか、さらには治療が奏効する癌と奏効しない癌の違いがどこにあるのかを理解することは、副作用を最小限に抑えつつ癌細胞を特異的に死滅させる新たな癌治療を創生するうえで極めて重要である。

チェックポイント異常に起因する正常細胞と癌細胞の反応性の違い

増殖能を持つ正常細胞は、DNA複製・細胞分裂の途上において遺伝子や染色体の異常が生じると、一時的に細胞周期を停止しその異常を修正する（あるいは異常細胞を除去する）能力があり、組織内に異常細胞が出現することを防いでいる。このように、細胞周期中の異常を察知して、修復や細胞死を誘導することによって異常細胞を取り除く機構をチェックポイントと呼ぶ。

細胞周期の各フェーズに設定されたチェックポイントは、さまざまな細胞内分子が関係することにより制御さ

れているが、それらの分子自身あるいは関係に異常が生じると、遺伝子変異や染色体異常を持つ細胞が排除されずに分裂を繰り返していくことになり、細胞の腫瘍化の一因になると考えられている。遺伝子の異常を抱えていても生存できるようになった腫瘍細胞の中には、分裂するたびに新たな遺伝子変異を獲得したり、染色体構造や染色体数を変える、いわゆる「ゲノム不安定性」を有する細胞が存在することが明らかとなっている。このようなゲノム不安定性は、塩基レベルから染色体レベルに及ぶ広い範囲で起こり、細胞周期チェックポイントの異常は、それを誘導するきわめて重要な要因である。

現在広く使用されている抗腫瘍薬として、DNA傷害性薬剤、分裂期作動性薬剤があるが、特にDNA傷害性薬剤は、腫瘍細胞のチェックポイント異常という性質を期せずして利用して、選択的に癌に細胞死を引き起こす治療法であることが、最近の分子生物学的解析によってわかってきた。薬剤や放射線によってDNAや染色体に傷を与えると、正常の細胞ではチェックポイントが作動し細胞周期は停止するが、癌細胞においてはチェックポイ

Fig. 2 Dynamics of mitotic catastrophe induced by DNA damage (ref. 3, Fig. 2a)

The mitosis of DNA damaged cell was observed by time-lapse fluorescence video microscopy.

ント異常があるため傷を抱えたまま次の周期に突入することになる。特にほとんどの癌細胞では、G2 期チェックポイントに異常があるために染色体に傷を抱えたまま M 期に突入し、その結果として多くの細胞に「分裂死」と呼ばれる細胞死が誘導されることがわかってきている¹⁾²⁾⁴⁾。つまり、チェックポイント異常を抱えた癌細胞の「チェックポイント乗り越え」による細胞死誘導こそが、抗腫瘍治療の重要なメカニズムとなっているのである (Fig. 1)。

分裂死とは

分裂死 (mitotic death) という言葉は、もともと放射線照射によって引き起こされる細胞の変化のうち「DNA 傷害に起因する分裂能の喪失」といった意味で用いられ、癌細胞が DNA に傷を持ったまま分裂期に進入

し、死滅あるいは増殖停止する現象をいう。これに対して高線量の放射線を照射した場合にみられる、間期における細胞死を間期死 (interphase death) と呼び、癌細胞のみならず正常細胞もこの死滅形態を取る。このように細胞傷害の程度によって誘導される細胞死の形態が異なるといった現象は放射線照射に限ったものではなく、DNA 傷害性薬剤でも観察される。

DNA 傷害を抱えた細胞が分裂期に進入することで引き起こされる細胞死については、近年、分裂期崩壊 (mitotic catastrophe) と呼ぶことが多い。分裂期崩壊は、基本的には分裂死とほぼ同意であるが、最終的な結果が「細胞死」に限られている点で、若干「分裂死」とはニュアンスが異なる。分裂期崩壊は、分裂中期もしくは分裂後期から直接死滅する細胞死と考えるのがよい。

DNA 傷害性薬剤と分裂死

正常細胞は、薬剤や放射線などによって DNA に傷害を受けると G1 期あるいは G2 期に停止するが、癌細胞ではこれらのチェックポイント機能に異常があるために、DNA に傷を持ったまま M 期に突入してしまう。細胞の動きをリアルタイムで記録し動画として再現できる機能を持つタイムラプス顕微鏡を用いた観察では、染色体がいったんは赤道面に整列するものの両極への染色体分離が起こらず、整列したはずの染色体がさまざまな方向に引っ張られるような不規則な挙動をみせた。このような分裂中期付近での停止状態が数～10 時間前後持続した後、細胞が分裂期から直接崩壊する現象が観察された (Fig. 2)³⁾。われわれは、崩壊死に至るまでの分裂中期での停止期間 (precatastrophic phase) では、スピンドルチェックポイントが活性化していることを明らかにした。そこで、スピンドルチェックポイント機能と分裂死との関係を明らかにするため、RNA 干渉によって Mad2 あるいは BubR1 をノックダウンし、スピンドルチェックポイント機能をキャンセルした状態で分裂死が生じるか否かを観察した。その結果、分裂中期停止はみられなくなり、分裂死を免れて分裂期を脱出するのが観察された。このように、スピンドルチェックポイントにおける停止は、DNA に傷害を持つ細胞が分裂期に進入した際、分裂死の誘導に不可欠なファクターであることが明らかとなった。つまり、adriamycin や cisplatin のような DNA 傷害性の抗癌剤に対して、スピンドルチェックポイント機能が保たれている癌は感受性が高く、スピンドルチェックポイント機能が損なわれている癌では感受性が低いということがいえる。つまり、スピンドルチェックポイントの機能をモニターすることができれば、薬剤の感受性を評価することが可能になると考えられる。

分裂期作動薬と分裂死

Paclitaxel や vincristine や vinorelbine などの微小管重合に影響を与える薬剤は、分裂期において紡錘体の形成に異常をきたすためにスピンドルチェックポイントを活性化し分裂期細胞の増加を誘導するが、分裂期に停止することでなぜ細胞が死んでいくのか、またどのような過程で死ぬのかはよくわかっていなかった。すでに述べたように、DNA 傷害を持った癌細胞が分裂期に入り分裂中期でスピンドルチェックポイント依存性に停止することが細胞死を誘導するメカニズムであるならば、微小管作動薬によって分裂期に停止することこそがこれらの薬剤

の有効性を決定する因子になるのではないかとわれわれは考えた⁵⁾。タイムラプス顕微鏡による細胞の動態解析により、微小管阻害剤で誘導される細胞死も長時間の分裂期停止状態から直接に生じることが判明し、分裂期崩壊と同様の機構で細胞を死に至らしめていることが予想された。事実、RNA 干渉を用いて Mad2, BubR1 などスピンドルチェックポイントのキーとなるタンパク質発現を抑制したところ、微小管作動薬による細胞死誘導が回避されるという結果が得られ、このことから分裂期作動性これらの薬剤による細胞死誘導においても、DNA 傷害性薬剤同様、スピンドルチェックポイントの活性化が不可欠であることが強く示唆された。つまり、微小管作動薬に対する感受性も、DNA 傷害性薬剤同様、スピンドルチェックポイントの機能に依存することが明らかになった。

DNA 傷害性薬剤と分裂期作動性薬剤の比較

DNA 傷害性薬剤も微小管阻害剤もスピンドルチェックポイント依存性分裂死の誘導が癌細胞の主たる殺細胞機構であることがわかったが、2つの薬剤の間には幾つかの重要な相違点がある。スピンドルチェックポイントの活性が低下している癌細胞にこれらの薬剤を作用させた場合、DNA 傷害性薬剤では細胞分裂が進行するため、染色体の不均衡分配や分裂異常が生じ、異数体細胞の出現を誘導する頻度が高くなると考えられる。それに対して微小管作動薬では、たとえスピンドルチェックポイントの機能が低下していても、紡錘糸が正常に形成されていないため、細胞は分裂することができず、多倍体を形成することになる。われわれの観察では、多倍体細胞は細胞老化に陥る頻度が高く、最終的には細胞の増殖は停止することになる。これらのことから、スピンドルチェックポイント機能が低下した細胞においても微小管阻害剤は効果を示すことが予想され、DNA 傷害性薬剤に比べて安全で優れているように思われる。しかしながら、癌細胞と正常細胞の選択性という観点からみると、微小管阻害剤が、癌細胞だけでなく、正常細胞の分裂も阻害し 4 倍体を形成するなど特異性に乏しいのに比べて、DNA 傷害性の薬剤では、チェックポイントできちんと止まれる正常細胞とチェックポイントの障害で止まらない癌細胞との差を引き出すことが可能となる点では、DNA 傷害性治療が優れていることになる。このように、それぞれの薬剤には短所と長所が存在し、正しい化学療法を今後考案し実施して行くためには、それらの性質がどのような分子背景で生じるのかを十分に理解する必要がある。

分裂死の分子機構解明による新たな治療の可能性

これまで述べてきたように、臨床の現場で用いられている抗癌剤の効果は、多くの場合、分裂期における停止時間の長短に依存している。つまり、DNA 損傷や紡錘糸の形成異常は、スピンドルチェックポイントを活性化し、細胞を分裂中に停止させ、そこから直接細胞を殺すことになっている。微小管作動薬が DNA 傷害性薬剤に比べて安全と考えられる根拠はすでに示したが、やはり分裂期以外の微小管機能にも支障をきたすことから、神経系障害など好ましくない副作用が存在することは確かである。そこで、細胞を分裂中期に停止させなおかつ微小管に影響を与えない薬剤があれば、理想的な抗癌剤となりうる。そうしたアイデアから、Eg5 阻害剤など、微小管に作用せず分裂中期に細胞を停止させる低分子化合物が新たに登場してきている。Eg5 は、分裂期に中心体を両極に分離する役割を果たすキネシンファミリーのモータータンパク質であり、他のキネシンファミリータンパク質と同様に ATPase 活性により細胞内物質を運搬する。それゆえ、本モータータンパク質の ATPase 活性を特異的に阻害する分子は、中心体分離を阻害し、微小管に何ら作用を及ぼすことなくスピンドルチェックポイントを活性化して細胞を分裂中期に停止させる能力を持つ。われわれの実験では、Eg5 阻害剤は微小管作動性薬剤と同様の作用（分裂期崩壊死と細胞老化）を癌細胞に及ぼし、しかも間期の細胞の微小管には影響しないことが明らかになった。今後、分裂期の分子制御機構が明らかにされるにつれ、理想的な分子標的分裂期作動性抗癌剤が開発されていくことであろう。

おわりに

タイムラプス顕微鏡を用いた細胞動態解析を用いるこ

とによって、抗癌剤による癌細胞の「死に様」が明らかになってきた。興味深いことに、paclitaxel など微小管作動性薬剤を用いて同様の動態解析を正常の細胞に行ったところ、十分な時間分裂中期で停止しながら、ほとんどの細胞は最終的に死に至らず、分裂を遂行しないまま 4 倍体の状態で G1 期へ進入して生きていくことがわかった。またさまざまな癌細胞株を paclitaxel でスクリーニングしていると、分裂期チェックポイントが正常で、十分に分裂期に停止できる能力を持ちながら、やがて分裂期をスリップして次の G1 期に速やかに進んでいく細胞がみつかった。これらの細胞では、分裂中期に停止して崩壊死するタイプの細胞とは異なるシグナルが作動していると考えられる。分裂死の分子メカニズムを今後明らかにすることにより、正常細胞と癌細胞のシグナルの違い、新たな薬剤耐性機構などが解明され、より特異的でさまざまな癌細胞に効果を及ぼす抗癌剤を開発することが可能となるであろう。

文 献

- 1) Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401: 616-620, 1999.
- 2) Fingert HJ, Chang JD, Pardee AB: Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. *Cancer Res* 46: 2463-2467, 1986.
- 3) Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H: Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 23: 6548-6558, 2004.
- 4) Roninson IB, Broude EV, Chang BD: If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4: 303-313, 2001.
- 5) Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT: Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 64: 2502-2508, 2004.

要 旨

抗癌治療の分子メカニズム

佐谷 秀行

ゲノムの不安定性は悪性腫瘍の主たる特徴であり、細胞周期チェックポイントの異常はそれを誘導するきわめて重要な要因である。現在広く使用されている抗腫瘍薬として、DNA 傷害性薬剤、微小管作動性薬剤があるが、これらの薬剤は腫瘍細胞のチェックポイントの異常を利用して選択的に癌に細胞死を引き起こすことが明らかにされてきた。タイムラプス顕微鏡と RNA 干渉法を用いた解析により、これらの薬剤によって癌細胞に誘導される細胞死は、主として分裂中期から直接生じる分裂期崩壊であり、紡錘体チェックポイント機能など複数の要素によって制御されていることが明らかになった。本稿では現行の抗癌治療の分子論を整理したうえで、その特徴と問題点を議論する。

脳外誌 15 : 688-693, 2006

第 27 回 日本脳神経外科コンgres 開催のお知らせ

会 期 : 2007 年 5 月 18 日 (金), 19 日 (土), 20 日 (日)

会 場 : 仙台サンプラザ (仙台)

会 長 : 富永悌二 (東北大学 脳神経外科)

連絡先 : 〒 980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1 東北大学 脳神経外科

☎ 022-717-7228 FAX 022-717-7233

主 題 : multimodality 時代のスタンダード