

主論文の要旨

**Thymidylate synthase inhibitor raltitrexed can induce
high levels of DNA damage in *MYCN*-amplified
neuroblastoma cells**

チミジル酸シンターゼ阻害剤ラルチトレキセドは
MYCN 増幅型神経芽腫細胞の DNA 損傷を大幅に誘発させる

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
生物化学講座 分子生物学分野

(指導：門松 健治 教授)

山下 顕

【緒言】

神経堤細胞に由来する神経内分泌腫瘍である神経芽腫は、日本では年間約 200 例が報告されており、小児期にできる固形腫瘍の中で白血病、脳腫瘍に次いで多い。国際神経芽腫リスクグループ病期分類システムは、治療前のリスク分類のための新しい病期分類システムとして提案され、予後因子、例えば診断時の年齢、腫瘍組織学、遺伝的異常などと組み合わせることにより、神経芽腫の患者を 4 つのグループ（超低リスク、低リスク、中間リスク、高リスク）に分類できる。MYC ファミリー遺伝子の一つである MYCN 遺伝子の増幅（100-200 コピー）は、高リスクグループの特徴であり、大規模な患者コホートにおける 5 年無イベント生存率は 29%であることが報告されている。つまり、MYCN 遺伝子の増幅は、神経芽腫における予後不良と強く相関しており、MYCN 増幅型神経芽腫の克服こそが最重要課題といえる。

現在、代謝拮抗剤である 5-フルオロウラシルやメトトレキサートは消化器がんや白血病などに広く使用されているが、これまで神経芽腫に対する有効性は十分に検討されていなかった。そこで本研究では MYCN 増幅型神経芽腫細胞株に対する代謝拮抗剤の有効性及び MYCN 増幅の有無による代謝拮抗剤の作用の違いの原因を究明する。

【方法】

MYCN 増幅型と MYCN 正常型の神経芽腫細胞株を 96 well プレートに播種し、0.01 nM から 100 μ M の代謝拮抗剤（メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド「以下、RTX という」）及び現在治療に用いられている薬剤（エトポシド、シスプラチン、カルボプラチン）で処理した。3 日後にアラマーブルーアッセイ法により細胞生存率を測定し、各種代謝拮抗剤に対する IC₅₀ 値を算出した。

次に、MYCN 増幅型と MYCN 正常型の神経芽腫細胞を用いて、代謝拮抗剤の主要なトランスポーターである RFC（reduced folate carrier）と RTX の作用標的タンパク質である TS（thymidylate synthase）の発現量をウェスタンブロットティング法により評価した。

また、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞株である IMR-32 をチミジン添加培地中にて 0.01 nM から 100 μ M の RTX で処理をし、3 日後の細胞生存率をアラマーブルーアッセイ法により評価した。

最後に、MYCN 増幅型である IMR-32 と MYCN 正常型である SH-SY5Y を RTX 添加培地中で培養し、72 時間後まで経時的に細胞を回収した後、細胞生存率をアラマーブルーアッセイ法により、DNA 損傷マーカーの発現量をウェスタンブロットティング法により評価した。

【結果】

試験した代謝拮抗剤の IC₅₀ 値は MYCN 正常型株と比較して MYCN 増幅型株で低値を示す傾向が認められた（表1）。一例として MYCN 正常型株である SH-SY5Y に対する RTX の細胞増殖抑制効果は最高濃度である 100 μ M でも観察されず IC₅₀ 値を算出できなかったが、MYCN 増幅型株である IMR-32 に対する IC₅₀ 値は 5.7 nM と極めて低い値を示した。

また、RTXのIC₅₀値は、現在治療に用いられている薬剤よりもSH-SY5Yでは高値を示したが、IMR-32では統計学的に有意に低値を示した。

次に、代謝拮抗剤の主要なトランスポーターであるRFC及びRTXの作用標的タンパク質であるTSの発現量をウェスタンブロッティング法で評価した結果、MYCN増幅型とMYCN正常型の細胞株間で発現量に有意な差がないことが示された。一般に、薬剤のトランスポーターの発現量低下や作用標的タンパク質の発現量増加が薬剤耐性の主要原因と考えられているが、神経芽腫細胞株において観察された代謝拮抗剤に対する感受性の違いは別の分子機構によるものであると考えられた。

また、チミジンを添加した培地でRTXのIMR-32に対する細胞増殖抑制効果を評価した結果、3 μmol/L以上のチミジンを添加することで細胞生存率が回復した。これはサルベージ経路によって培地中のチミジンがdTTPに変換されて細胞内のdTTP濃度が回復したことを示している。従って、RTXによって作用標的タンパク質であるTSの酵素機能が阻害されてdTTP濃度が低下することが細胞増殖抑制の主要原因であることが明らかとなった。

さらに、RTXによる細胞増殖抑制メカニズムを理解するために、IMR-32とSH-SY5Yを用いて、RTX処理下での各細胞株の経時的な細胞増殖率及びDNA損傷マーカーの発現量を評価した。その結果、RTXを添加することで、SH-SY5Yの細胞生存率には72時間後まで大きな影響を与えなかった一方で、IMR-32では、48時間後に細胞生存率が低下し始め、72時間後には極めて低い細胞生存率を示すことが確認された。加えて、DNA複製ストレスのマーカーであるリン酸化されたDNA損傷チェックポイントキナーゼChk1とリン酸化されたRPA（Replication protein）及び二本鎖切断のマーカーであるリン酸化されたDNA損傷チェックポイントキナーゼChk2とリン酸化されたH2AXの発現量がRTX添加後48時間以降にSH-SY5Yと比較してIMR-32で大幅に誘発されることが観察された。

【結論】

以上の結果から、代謝拮抗剤はMYCN増幅型の神経芽腫細胞の増殖を特異的に抑制することが判明した。代謝拮抗剤の中でも特にRTXでは強力な細胞増殖抑制能が認められ、MYCN遺伝子増幅がみられる高リスク患者に対して有効な治療手段となる可能性がある。

MYCN増幅型細胞とMYCN正常型細胞でRTXに対する感受性に違いが出たのは、RTXのトランスポーターや作用標的タンパク質の発現量が要因ではないことが確認された。一方で、各種のDNA損傷マーカーの解析結果からMYCN増幅型細胞においてRTXに対する感受性が増加したのは、MYCN増幅に起因する高いDNA複製ストレス存在下でRTX処理によりdTTP濃度が低下したことによって誘発されたDNA損傷レベルの上昇が原因であると考えられた（図1）。