

ゲノム編集による機能獲得型p53変異細胞の樹立とヌクレオシドアナログの抗腫瘍効果にp53ステータスがおよぼす影響

若狭, 武司

<https://hdl.handle.net/2324/5068187>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名	若狭 武司	
論 文 名	ゲノム編集による機能獲得型 p53 変異細胞の樹立とヌクレオシドアナログの抗腫瘍効果に p53 ステータスがおよぼす影響	
論文調査委員	主 査 九州大学	教 授 大戸 茂弘
	副 査 九州大学	教 授 小柳 悟
	副 査 九州大学	教 授 松永 直哉
	副 査 九州大学	准教授 江頭 伸昭

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

癌治療においては、化学療法、手術療法、放射線療法及び免疫療法は、重要な役割を担う方法である。これらの治療法で使用される薬剤は、主に内服や注射により全身に運ばれ、癌細胞の特徴的な生物学的プロセスに作用する薬剤は様々な癌腫に対して適応されている。癌細胞に対して、DNA複製プロセスを攪乱させ、DNA複製ストレスを誘導して抗腫瘍効果を発揮していることから、複製を遅延または阻害する DNA複製ストレス誘導は重要な癌治療戦略の一つである。本研究では、DNA複製ストレスを誘導するヌクレオシドアナログ系の薬剤であるトリフルリジン (FTD) に着目した。ロンサーフ (FTD/TPI) は、FTD と FTD の分解を防ぐ TPI との経口抗がん剤の配合剤であり、標準化学療法に抵抗性を示す転移性大腸癌患者を対象に、プラセボと比較して全生存期間を有意に延長し、医療現場で使用されている。FTD は、癌細胞の核酸代謝経路にのせて染色体 DNA に誤挿入させることで DNA dysfunction による抗腫瘍効果を発揮する。すなわち、FTD は Pol 複製進行に阻害的に働き、細胞内ヌクレオチドプール dTTP 量を低下させ、競合的にかつ優位に DNA に取り込まれる dTTP が減少することで、FTD-TP が DNA に取り込まれ複製フォーク進行遅延を誘導する。この FTD 誘導性 DNA複製ストレスを癌細胞に与えると、p53 野生型 HCT116 ではサイクリン B1 のタンパク質分解と有糸分裂期のスキップ、さらに G1 期への細胞周期停止および SA-β-Gal 活性の増加と細胞老化様の表現型を示す。一方、CRISPR/Cas9 システムにより樹立した p53 ノックアウト HCT116 では、サイクリン B1 分解および有糸分裂期スキップが起こらずに有糸分裂期に進行して、有糸分裂期後期に染色体ブリッジを伴った染色体分配異常が観察され、アポトーシス依存的な細胞死が誘導される明確な違いが報告されており、FTD に対する細胞応答において p53 が主要な制御因子である。

p53 をコードする TP53 遺伝子はヒトのがんで変異が最も高頻度に見られ、その変異の中で最も多いのはミスセンス変異である。p53 ミスセンス変異は腫瘍抑制機能を無効にし、がんを促進する機能獲得 (GOF) をもたらす。p53 は様々な細胞ストレスに応答する機構があり、その細胞ストレスの一つが DNA複製ストレスである。過剰な増殖シグナルや DNA 損傷など様々な要因で DNA複製進行が滞り、発がん過程におけるゲノム不安定性の誘因となるが、癌化学療法で用いる抗がん剤により DNA複製ストレスが惹起され、がんに対して治療効果を発揮している。がん細胞周期における DNA複製ストレスは、複製フォークの遅延・停止・崩壊、さらに DNA 損

傷や未成熟な有糸分裂など、多岐にわたる要因で発生している。

本研究では、機能獲得型 p53 ミスセンス変異細胞に対する FTD の抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。p53 野生型である大腸がん細胞株 HCT116 を親株としたゲノム編集 CRISPR/Cas9 システムを用いて機能獲得型変異として知られる DNA contact mutation R248Q と structural mutation R175H の p53 ミスセンス変異ノックイン細胞を樹立することで、p53 野生型、欠失型、機能獲得変異型のアイソジェニックなモデル細胞株を揃えることに成功した。これらのモデル細胞株を用いて、RNA seq 法により遺伝子発現プロファイルを比較し、ライブセルイメージングによる解析法を駆使することにより FTD に対する細胞応答を観察した。さらに、3D sphere モデルおよびマウス Xenograft モデルにより抗腫瘍効果を検証した。p53 ミスセンス変異では、FTD 誘導性 DNA 複製ストレスにより p53 野生型同様に p53 は蓄積し、p53 ノックアウト同様に p21 の誘導は認められなかった。FTD は p53 活性に依存して異なる作用機序で細胞増殖抑制を示した。p53 野生型細胞では FTD 誘導性 DNA 複製ストレスによる p53-p21 の活性化により有糸分裂期スキップと細胞老化様の G1 期停止を示した。一方、正常な p53 機能が損なわれたノックアウトおよび p53 機能獲得変異細胞はそれぞれ p53 野生型と比べ遺伝子発現プロファイルが大きく異なった。両者とも有糸分裂期に進行して異常な染色体分配が誘導され、その後アポトーシス依存的な細胞死が誘導された。FTD は 3D sphere モデルおよびマウス Xenograft モデルにおいても p53 ステータスに依存しない抗腫瘍効果を示した。以上の結果から、FTD は機能喪失あるいは機能獲得変異 p53 によるゲノムワイドな遺伝子発現の変化を乗り越えて p53 ステータスに依存しない抗腫瘍効果を発揮する抗がん剤であることを明らかにした。

以上のことから、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。