

# 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)

## 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

薬剤学分野 3PS19021W 若狭 武司

### 【序論】

トリフルリジン(FTD)はヌクレオシドアナログとして、癌細胞の核酸代謝経路を利用し FTD 3リン酸体 (FTD-TP) となり、DNA 複製プロセスを通じて染色体 DNA に誤挿入させることで DNA 機能不全を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮する。抗腫瘍効果を持つヌクレオシドアナログの中で FTD は顕著な DNA 鎖切断を起こさずに DNA 鎖に取り込まれる特徴を有する<sup>1)</sup>。FTD は FTD-TP 産生に伴い細胞内ヌクレオチドプール中の dTTP 量を低下させ、S 期進行を遅延させることが確認された<sup>2)</sup>。試験管内の反応で FTD-TP は dTTP に比べ DNA ポリメラーゼによる複製反応効率が極めて低かったことから、FTD 存在下では効率よく染色体 DNA に取り込まれる dTTP が減少することで、代わりに FTD-TP が DNA ポリメラーゼにより染色体 DNA に取り込まれ、その結果、複製フォーク進行遅延を誘導すると考えられた。このようなメカニズムによる 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、p53-p21 の蓄積、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 期での細胞周期停止が起こり、最終的に SA-β-Gal 活性の増加と細胞老化様の表現型を示した<sup>2)</sup>。一方で、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う染色体分配異常が観察され、その後アポトーシス依存的な細胞死が誘導された<sup>2)</sup>。このように、FTD に対する細胞応答と細胞運命決定において p53 が主要な制御因子であることが示されているが、ヒト腫瘍で多く検出されるミスセンス変異を含む p53 を発現する癌細胞において、FTD がどのように作用し、癌細胞はどのような運命に至るのかについては明らかになっていなかった。

p53 をコードする TP53 遺伝子はがんでミスセンス変異が最も高頻度に見られる。近年、機能獲得型 p53 ミスセンス変異が本来のがん抑制機能を失う(loss-of-function, LOF)のみならず、野生型と異なる遺伝子の発現を誘導してがんの促進に寄与すること(gain-of-function, GOF)が報告された<sup>3)</sup>。ヌクレオシドアナログである FTD が DNA 鎖に取り込まれることで、S 期進行の遅延とその後の p53 依存的な細胞周期停止が引き起こされることを報告したが、機能獲得変異 p53 がおよぼす影響についてはいまだ不明である (図 1)。

本研究では、ヒト腫瘍で最も多く検出される機能獲得型 p53 ミスセンス変異の癌細胞において、FTD は抗腫瘍効果に影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とした。

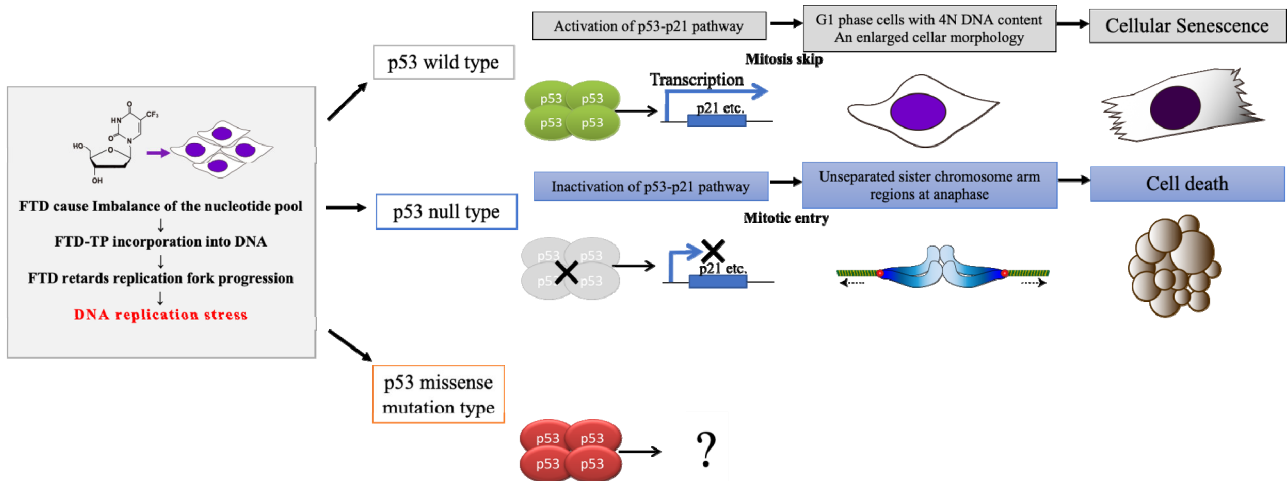


図 1 Different responses to FTD between p53 wild type and null cells

【方法】

初めに、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により、p53 遺伝子ノックアウトおよび機能獲得変異 (R175H あるいは R248Q) をノックインすることで、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樹立した。p53 ミスセンス変異細胞の機能喪失 (LOF) については、p53 標的遺伝子である p21 および MDM2 の遺伝子発現レベルを評価した。加えて、p53 を活性化する様々な DNA 損傷誘導剤に対する応答についてタンパク質発現レベルで評価した。

p53 ミスセンス変異細胞の機能獲得 (GOF) については、p53 R175H および p53 R248Q 細胞のミスセンス変異 p53 タンパク質と ETS2 との相互作用について評価した。ミスセンス変異 p53 タンパク質発現により細胞に起こる変化の全体像は、p53 WT、p53 KO、p53 R175H または p53 R248Q 細胞間のゲノムワイド遺伝子発現の差異を RNA-seq 解析により比較評価した。

次に、GOF p53 R175H および p53 R248Q 細胞について、細胞増殖曲線評価およびアポトーシスマーカーによる細胞死の検出により抗腫瘍効果の評価した。FTD の作用による細胞死に至るまでの細胞応答は、蛍光ライブセルイメージング技術により、p53 WT、p53 KO、p53 R175H または p53 R248Q の細胞周期および染色体を可視化して 1 細胞解析をした。スナップショットの高解像度の解析は、多重蛍光免疫染色により分裂期における染色体分配の様子、さらに分裂期終了後における核膜の形態を観察して、分裂期進行における染色体分配から細胞死に至るまでの時系列的な表現型を観察した。

最後に FTD の抗腫瘍効果は、樹立した GOF p53 R175H および p53 R248Q 細胞のスフェロイド 3D モデルおよびマウス皮下移植モデルで薬効試験を実施した。

【結果】

本研究では、はじめに CRISPR/Cas9 システムを用いて R248Q (野生型 p53 の転写調節領域 DNA との結合ドメインの変異、DNA contact mutation) と R175H (p53 タンパク構造変化を引き起こす変異、structural mutation) の p53 ミスセンス変異をゲノム DNA 上に組み込んだ HCT116 細胞株を樹立した。樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞について、p53 標的遺伝子の mRNA 発現レベルは、HCT116 (p53 WT) 細胞と比較して、p53 KO 細胞と同様に p21 および MDM2 の mRNA 発現レベルが有意に低かった。p53 を活性化する様々な DNA 損傷誘導剤を作用させた時、p53 R175H および p53 R248Q 細胞において、p53 タンパク質の蓄積が p53 野生型細胞と同様に確認された。すなわち DNA 損傷誘導剤に対して p53 タンパク質自体は応答したにもかかわらず、p53 WT 細胞と異なり p53 R175H および p53

R248Q 細胞の両方で DNA 損傷誘導剤による p21 蓄積を誘導されなかった。以上より、p53 にわずか1 アミノ酸の置換をゲノム上で導入するだけで、正常な p53 の機能を完全に消失した細胞に変質してしまい、DNA 損傷誘導剤に対する応答 (p21 タンパク質の蓄積) が不全になってしまうことが明らかになった。

樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞におけるミスセンス変異 p53 タンパク質と ETS2 との相互作用は、共免疫沈降により FLAG-ETS2 と p53 R175H との相互作用を確認した。しかし、p53 WT や p53 R248Q との相互作用は確認されなかった。以上より、Structural mutation である p53 R175H は ETS2 との相互作用を介して、新たな機能を獲得した GOF ミスセンス変異 p53 タンパク質である可能性が示された。

RNA-seq 解析によって p53 WT、p53 KO、p53 R175H または p53 R248Q 細胞間のゲノムワイドな遺伝子発現の差異を比較検討した結果、主成分分析 (PCA) プロットは、p53 R175H と R248Q クラスター間の発現プロファイルの重複を示したが、p53 WT および KO のクラスターは、p53 R175H と R248Q を含む GOF p53 のクラスターと区別できた。

以上より、HCT116 細胞のゲノム編集によって樹立した p53 R175H および R248Q 変異細胞は p53 KO とは明らかに異なるプロファイルを示し、機能獲得型の p53 ミスセンス変異細胞であることを示した。

これら機能獲得型 p53 ミスセンス変異細胞に FTD を作用させると、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 の活性化によって有糸分裂期スキップと細胞老化様の G1 期停止を示した。一方で正常な p53 機能が損なわれたロックアウトおよび 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るにも関わらず、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。さらに、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(図 2)。

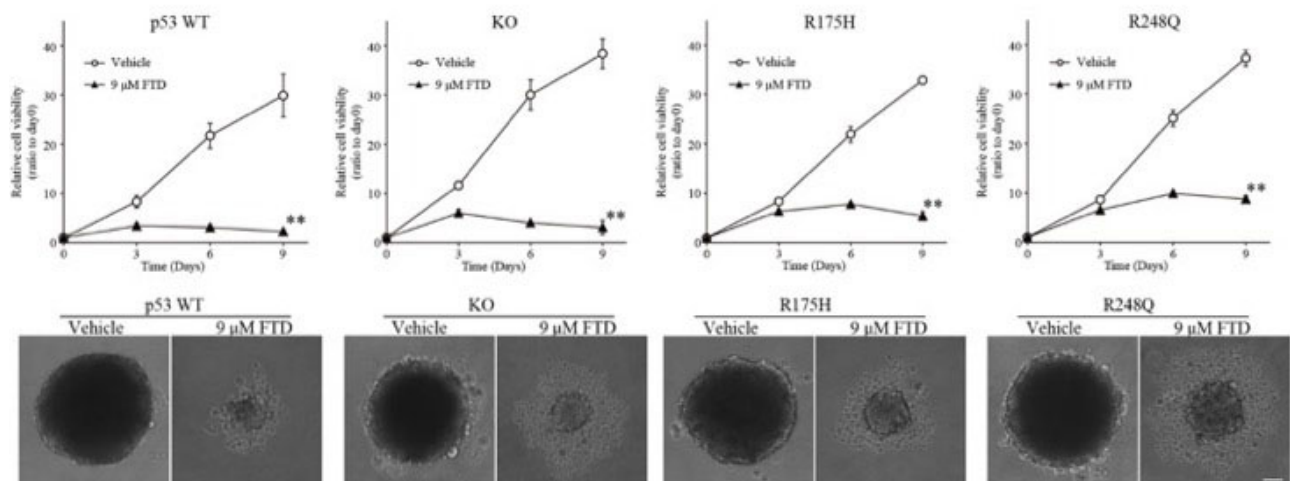


図 2 Growth curve of HCT116 p53<sup>WT/WT</sup>, p53<sup>-/-</sup>, p53R<sup>175H/R175H</sup> and p53R<sup>248Q/R248Q</sup> spheroid cells

#### 【考察】

本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムを用いて、機能獲得型 (gain-of-function, GOF) p53 ミスセンス変異細胞を樹立することに成功した。続いて、樹立した同質遺伝的な細胞の比較で、RNA-seq 技術を応用した網羅的遺伝子発現解析により、遺伝子発現レベルでの p53 の野生型、欠失、ミスセンス変異細胞の違いを明らかにすることができた。特筆すべきは、p53 の GOF 点突然変異のノック

クインはゲノムワイドな遺伝子発現に影響を与えていたことである。この特徴的な GOF p53 ミスセンス変異細胞に、トリフルリジン (FTD) による DNA 複製ストレスを与えると、p53 KO 細胞と同様に姉妹染色体の分配異常さらには細胞分裂後に核構造の不全を有する多核化を起こし細胞死が誘導された (図 3)。つまり、FTD は GOF 変異 p53 発現による遺伝子発現プロファイルの違いを乗り越えて抗腫瘍効果を発揮できる抗がん剤であることが示された。また、スフェロイド 3D モデル、ヒト腫瘍移植マウスモデルでの検討でも FTD (あるいはロンサーフ, FTD/TPI) の GOF 変異 p53 を発現する腫瘍に対する増殖抑制効果が確認されたことから、FTD は p53 変異の有無に関わらず抗腫瘍効果が期待できる抗がん剤であることが示唆された。

本研究成果の意義としては、(1) FTD を主成分とする抗がん剤ロンサーフの p53 変異ステータスによる抗腫瘍効果発揮のメカニズムの違いを明らかにしたこと、(2) メカニズムの違いにも関わらず p53 の変異の有無によらずロンサーフが一定の抗腫瘍効果を発揮しうることを明らかにしたこと、さらに (3) 薬剤により DNA 複製ストレスを与え、分裂期染色体分配異常を起こさせ染色体不安定性に伴う細胞死を誘導することが、特に正常な p53 の機能を喪失した癌細胞に対する新たながん治療戦略として有効であることを示したことである。

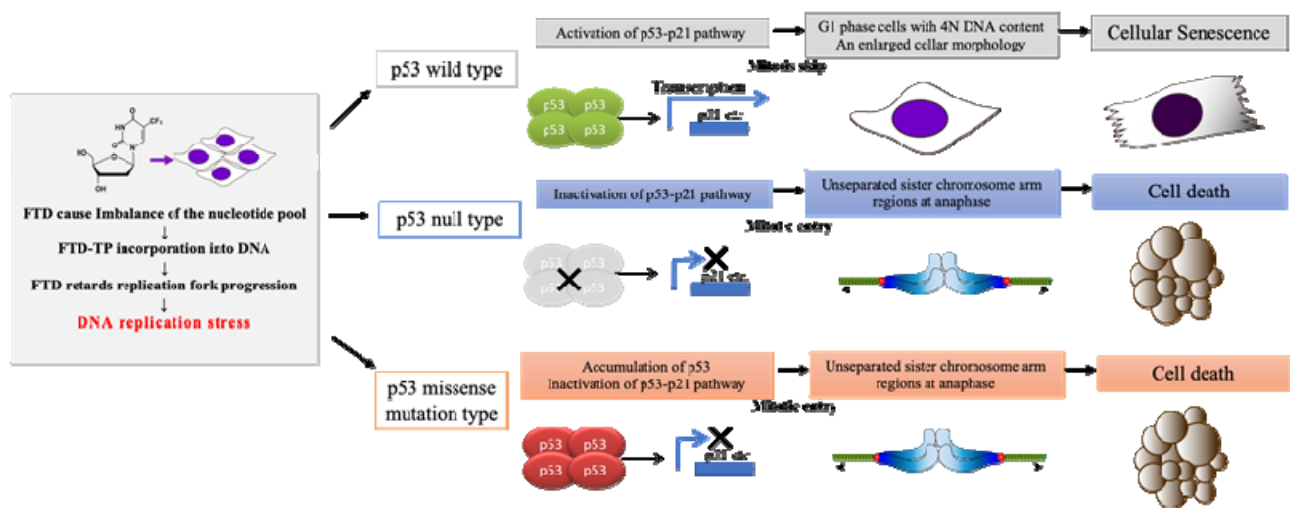


図 3 Schematic model of the effect of trifluridine (FTD)

【主な引用文献】

- 1). Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, et al. Trifluridine Induces p53-Dependent Sustained G2 Phase Arrest with Its Massive Misincorporation into DNA and Few DNA Strand Breaks. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):1004-13.
- 2). Kataoka Y, Iimori M, Fujisawa R, Morikawa-Ichinose T, Niimi S, Wakasa T, et al. DNA Replication Stress Induced by Trifluridine Determines Tumor Cell Fate According to p53 Status. *Mol Cancer Res.* 2020;18(9):1354-66.
- 3). Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature.* 2015;525(7568):206-11.