

氏名（本籍）	廣瀬 充明
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7450 号
学位授与年月	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	MDM2/MDM4 expression pattern implicates <i>TP53</i> -reactivation strategy for the treatment of <i>TP53</i> -wild-type cancers (野生型 <i>TP53</i> 腫瘍治療において <i>TP53</i> 再活性化戦略の重要因子と考えられる MDM2/MDM4 発現パターン)
主査	筑波大学教授 医学博士 千葉 滋
副査	筑波大学准教授 博士（医学） 坂東 裕子
副査	筑波大学講師 博士（医学） 高野 恵輔
副査	筑波大学助教 博士（医学） 川口 敦史

論文の内容の要旨

（目的）

TP53 癌抑制遺伝子の機能を抑制する癌遺伝子、*MDM2* と *MDM4* の野生型 *TP53* 腫瘍における発現パターンと、それぞれを抑制することによって *MDM2* および *MDM4* が治療標的になりうるか否かを明らかにする。

（対象と方法）

small interfering (si) RNA の配列選択：siDIRECT software (Nucleic Acids Research. 2004; 32: W124-W129.) を用いて knock-down 効果が強くオフターゲット効果の少ない配列を設計した。

double-stranded RNA-DNA chimera (dsRDC) の作成：ガイド鎖のシード領域を DNA 置換することで熱力学的安定性を低下させ off-target 効果を弱めることができる。本研究ではガイド鎖の 5' 末端から 6 塩基とパッセンジャー鎖の相補的配列を DNA 置換した。

標的細胞：野生型 *TP53* 腫瘍培養細胞 11 株 (SJSA-1、HepG2、HuH-6、C32TG、MCF-7、A375、SNU-1、HCT116、NUGC-4、LoVo、A549)、変異型 *TP53* 腫瘍培養細胞 4 株 (KATOIII、NUGC-3、DLD-1)。

評価方法：*MDM2*、*MDM4*、p53、p21 蛋白発現をウエスタンブロット法で、*MDM2* および *MDM4* mRNA 発現は qRT-PCR 法で、相対的生細胞数は WST-8 法によって解析した。

（結果）

MDM2 と *MDM4* の発現をウエスタンブロット法にて解析した。野生型 *TP53* 細胞 11 株のうち 7 株 (MCF-7、

A375、SNU-1、HCT116、NUGC-4、LoVo、A549) は、MDM4 発現レベルが高く、残り 4 株 (SJSA-1、HepG2、HuH-6、C32TG) では、MDM4 発現が低下していた。また、MDM4 発現の低い細胞株は MDM4 発現の高い細胞株と比べて全て MDM2 発現が高い傾向が見られた。

10 種類以上の *MDM2* siRNA (siMDM2) と *MDM4* siRNA (siMDM4) を設計合成し、knock-down 活性をウェスタンブロット法と qRT-PCR 法で解析した。これらの siRNA の中で knock-down 効果の高いものから dsRDC 修飾体を作製し、knock-down 活性が高く、且つ非特異的細胞毒性の低い dsRDC をそれぞれ 2 種類ずつ選択した。*MDM2* と *MDM4* に対する dsRDC として chiMDM2-1068 と chiMDM2-1489 および chiMDM4-452 と chiMDM4-1036 を選んだ。

これらの dsRDC を用いて各種癌細胞株における p53 と p21 の発現および細胞増殖に及ぼす効果を検討した。chiMDM2 は MDM2 と MDM4 の発現レベルに関わらず全ての野生型 *TP53* 細胞 11 株で p53 レベルの増加とその標的遺伝子である p21 の発現を強く誘導し、同時にそれらの増殖を抑制した。chiMDM4 は MDM4 高発現細胞株に対してのみ軽度の p53 レベル増加と p21 の強い発現増強と増殖抑制を誘導したが、MDM4 低発現細胞では、p53 レベル、p21 レベルおよび細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

さらに chiMDM2-1489 と chiMDM4-452 を用いて、それぞれの単独投与時の濃度-増殖抑制曲線と、chiMDM2/chiMDM4 併用時の増殖抑制効果を比較した。7 種類の全ての MDM4 高発現細胞株で、単独投与と比較して併用投与においてより強い増殖抑制効果が確認された。Chuo-Talalay 法による Combination index は、0.72 以下と強い相乗効果が得られた。一方 4 種類の MDM4 低発現細胞株では併用による相乗効果は見られなかった。また 3 種類の変異型 *TP53* 細胞株では chiMDM2/chiMDM4 は単独あるいは併用投与しても増殖は抑制されなかった。

MDM4 高発現細胞株における *MDM2*/*MDM4* 同時 knock-down の相乗的増殖抑制効果の誘導機構を調べるため、p53 と p21 の発現変化を解析した。MDM4 高発現細胞株 (MCF-7、A375) において、p53 と p21 の発現は *MDM2*/*MDM4* を同時に knock-down すると、それぞれを単独で knock-down した時に比べて極めて高い発現レベルの増加が見られた。一方、MDM4 低発現細胞株 (SJSA-1、C32TG) では単独と同時 knock-down との間で p53 および p21 の発現に差はなかった。

(考察)

これまでに *MDM2* と *MDM4* が野生型 *TP53* 腫瘍の *TP53* 再活性化治療の標的となり得ることは知られている。しかし、様々な野生型 *TP53* 腫瘍において MDM2 と MDM4 の発現状態とこれらの機能抑制による抗腫瘍効果との関係性は、いまだ十分に解明されていない。本研究で、我々は 11 種類の野生型 *TP53* 癌細胞株を解析したが、これら全ての細胞株が、2 タイプ、即ち MDM4 高発現あるいは MDM4 低発現タイプに分類された。さらにそれぞれのタイプにおいて、*MDM2* あるいは *MDM4* を特異的に knock-down することで野生型 *TP53* の制御にどのような役割を果たしているかを検討すると、MDM4 高発現細胞株では *MDM2* と *MDM4* knock-down のいずれも *TP53* を活性化し、それぞれ *TP53* 不活性化に関与しているが、MDM4 低発現細胞株では *MDM2* knock-down のみ *TP53* を活性化し、*MDM2* のみが *TP53* 不活性化に重要であることが明らかとなった。

MDM4 高発現細胞では、*MDM2*/*MDM4* 同時 knock-down によって相乗的な *TP53* 活性化と増殖抑制効果をもたらし、MDM4 低発現細胞ではこのような相乗効果は見られなかった。これらの事実は、MDM4 高発現細胞では、*MDM2*-*MDM4* が協調して *TP53* 不活性化に関与し、MDM4 低発現細胞では、*MDM2* 単独で *TP53* を不活化していることを示唆している。MDM4 は MDM2 とヘテロダイマーを形成することで MDM2 の p53 ユビキチン化能を増強することが報告されている。MDM4 高発現細胞では、*MDM2* と *MDM4* がともに p53 の発現調節に関わっていると推定される。また、*MDM2* は p53 によって転写活性され、ネガティブフィードバックループを形成しており、*MDM4* 単独 knock-down では p53 の転写活性を介して MDM2 の発現が増強し、結果的に p53 を抑制する。*MDM2*/*MDM4* 同時 knock-down ではこの MDM2-p53 ネガティブフィードバックを阻害することで相乗的な *TP53* 活性化が生じていると考えられた。我々の研究結果から、*TP53* 野生型腫瘍におい

てMDM4 高発現腫瘍では *MDM2* と *MDM4* を、MDM4 低発現腫瘍では *MDM2* 単独を標的にすることで、効率的な *TP53* 再活性化治療が行なえる事が示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

TP53 は悪性腫瘍においてもっとも欠失や変異による機能喪失の頻度が高い遺伝子である。一方、*TP53* 遺伝子が野生型の悪性腫瘍であっても、MDM2 あるいは MDM4 の発現によって P53 蛋白質が活性を失っていることが知られている。本研究ではこのような p53 野生型の悪性腫瘍に注目し、*MDM2* あるいは *MDM4* の発現を抑制する double-stranded RNA-DNA chimera (dsRDC) によって P53 を再活性化させる治療戦略について検討したものである。多数の細胞株を用いて MDM2 と MDM4 の発現が相互に異なることを見出し、MDM2 と MDM4 の発現パターン毎に dsRDC によるそれぞれの抑制による細胞増殖への効果が異なる、という結論を導いた。この成果は、p53 野生型の悪性腫瘍の治療法開発に寄与する可能性があり、さらなる発展が期待される研究である。

平成 27 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。