

氏名	片岡 裕貴		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 10827 号		
学位授与年月日	令和5年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査学術院	理工情報生命学術院		
学位論文題目	Analyses of the Molecular Determinant of Cell Fate Induced by an Antimetabolite, Trifluridine (代謝拮抗剤の抗腫瘍活性成分Trifluridineにより誘導される細胞運命を決定付ける分子の解析)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	博士（農学）	三浦 謙治
副査	筑波大学助教	博士（理学）	石川 香
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	徳永 幸彦

論 文 の 要 旨

数ある抗がん剤の中でフルオロウラシル等の核酸アナログに代表される代謝拮抗剤は、DNA の材料となるチミジンの枯渇等の様々な DNA 複製ストレス (DRS) を誘導し、細胞分裂を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する薬剤である。チミジンアナログ Trifluridine (FTD) は、この代謝拮抗剤に分類される FTD/Tipiracil (TPI) の抗腫瘍活性成分であり、細胞内に取り込まれると、チミジンのサルベージ経路によりリン酸化され、三リン酸体 (FTD-TP) が DNA 複製時に DNA 中に取り込まれる。これにより、FTD は DNA 機能障害を介した抗腫瘍効果を発揮するとされていたが、その分子機構の詳細はこれまで未解明であった。著者は、FTD が細胞内に取り込まれた後、活性化され細胞増殖抑制効果を発揮するまでの分子機構を明らかにすることを目的とし以下の二つの研究を行っている。

第一章で著者は、FTD と、FTD の活性化に関与する分子である TK1 の関係についての研究成果について述べている。TK1 はチミジンサルベージ経路において、最初にチミジンをリン酸化するキナーゼである。FTD はチミジンと同様に TK1 によりリン酸化されることから、FTD が抗腫瘍効果を発揮するためには TK1 が必要であることが示唆されており、実際にジーンターゲティング法による TK1 ノックアウト細胞や TK1 を欠損する細胞が FTD に耐性を有していることが報告されていた。しかしながら、これらの研究は、隣接する遺伝子も同時に欠損している細胞等、適切に検証された細胞を使用したものではなかったため、証明されていなかった。そこで著者は、大腸がん患者を対象とした臨床研究において TK1 の発現量が FTD/TPI の効果予測因子であるということが示唆されていたことを考察し、*in vitro* において TK1 の発現量と FTD の効果の相関性を明らかにすることを試みている。まず著者は、FTD の細胞増殖抑制効果とサルベージ経路の関係を検証するため、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集法により、ヒト大腸癌細胞株 HCT 116 の TK1 特異的遺伝子破壊株 (TK1KO) を樹立している。次に著者は、この細胞株の FTD 感受性を評価したところ、親株と比較して FTD 耐性となり、TK1 が FTD の効果発現に必要な因子であることが明らかにしている。さらに著者は、この TK1KO 細胞をもとに可逆的な遺伝子発現調節系である Tet-On システムにより TK1 の発現量を調節可能な細胞株を樹立して TK1 の効果を評価し、TK1 の発現量依存的に FTD の DNA 中取り込み量と、細胞増殖抑制効果が亢進することを明らかにしている。以上の結果により著者は、同一の遺伝的バックグラウンドをもつ細胞において、FTD の感受性は TK1 の発現量に依存することを初めて示している。

第二章で著者は、FTD が DNA 複製に及ぼす影響と、FTD が誘導する細胞の表現型についての研究成果について述べている。以前の研究では FTD は DNA 中に取り込まれることが明らかとされていたが、精製ヒト DNA ポリメラーゼを用いた検証等、*in vitro* での詳細な検討はなされておらず、FTD が DNA 複製効率に及ぼす影響は不明であった。また、p53 が正常な癌細胞株とその p53KO 株に対し、FTD は 3 日間接触時に同等の細胞増殖抑制効果を示すにもかかわらず、細胞周期への影響・表現型が異なること

が報告されていたが、未解明な点が多く残されていた。そこで著者は、FTD が抗腫瘍効果を発揮する分子機構を理解するためには、これらの詳細な解析が必要であると考え、FTD の DNA 複製に及ぼす影響及び FTD が誘導する細胞応答を検証している。まず、精製ヒト複製型 DNA ポリメラーゼタンパク質を用いた *in vitro* DNA 複製実験により DNA 複製に対する FTD の影響を評価した。その結果著者は、FTD 三リン酸体は新生 DNA 鎖中に取り込まれるものの効率が低いことを見出し、鋳型となる場合においても DNA 複製を遅延させることにより DRS が惹起されることを示唆した。また著者は、FTD 添加後の細胞内代謝物の変化を解析し、FTD は速やかにリン酸化され三リン酸体となる一方で、競合するチミジン三リン酸が枯渇し、FTD 三リン酸が DNA に取り込まれやすい状態となっていることを明らかにしている。さらに著者は、DNA 中に FTD を取り込んだ後の細胞運命について、p53 が正常である HCT 116 及び新たに樹立した p53KO 株を用いて検証し、p53 正常株においては FTD 処理により、細胞分裂も細胞死も起こらない状態、つまり細胞老化が誘導された一方で、p53KO 株においては M 期異常の後アポトーシスが誘導されることを明らかにしている。これらの結果から著者は、FTD により惹起された DRS が、細胞の p53 の状態により異なる表現型を誘導するが、いずれにおいても細胞の増殖を抑制できることを示している。p53 の変異は様々な抗がん剤の耐性に関与することが報告されていることから、以上の結果により著者は、FTD は p53 に変異があっても効果を発揮する可能性を示唆している。

審 査 の 要 旨

本研究において著者は、FTD が抗腫瘍効果を及ぼすまでの分子作用機構について検証し、初めて細胞の FTD 感受性が TK1 発現量に依存すること、FTD が DRS を介して特徴的な表現型を誘導することで抗腫瘍効果を発揮することを明らかにしている。臨床において TK1 高発現がん細胞が FTD/TPI に高感受性であることが示唆されていることから、今回の結果は *in vitro* からこれを支持するものであり今後この研究分野に大きな知的基盤を提供することが期待される。さらに、医薬品を適切に使用するためには、その薬剤が効果を発揮するまでの分子機構の理解が重要であるが、著者の今回の成果により今後この分子機構の詳細が解明され、併用薬の探索など、より効果的な治療方法が創出されることが期待される。また、近年活発に研究が進められている通常の培養条件下における Ultrafine DNA bridge (UFB) と呼ばれる姉妹染色体の不分離構造は、本研究における p53KO 細胞で認められた M 期異常の FTD が UFB を増加させたという観察結果が今後 UFB の分子機構を理解するためのツールとして利用できる可能性が示唆されており、FTD の基盤研究への利用意義が高くなることも期待される。

令和 5 年 1 月 23 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に論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。