筑　波　大　学

博士（医学）学位論文

MDM4高発現消化器癌における
MDM4・*MDM2* の同時ノックダウンによる
5FUの効果増強について

２０１８

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

今西　真実子

略語

MDM2　murine double minute 2
MDM4　murine double minute 4
RING　 really interesting new gene
siRNA　small interfering RNA
dsRDC　double-stranded RNA-DNA chimera
mRNA　messenger RNA

目次

略語一覧 ……………………………………………………………………1

第1章　研究の背景 ……………………………………………………………4

1. 1　*MDM2*、*MDM4* 同時ノックダウンによる p53 の再活性化

1. 1. 1　癌抑制遺伝子 *TP53* と癌遺伝子 *MDM2*、*MDM4*

1. 1. 2　MDM2、MDM4 を標的とした創薬

1. 1. 3　RNAi を利用した MDM2、MDM4 の発現抑制と p53 の活性化

1. 2.　消化器癌に対する薬物療法

1. 2. 1　切除不能進行・再発消化器癌に対する薬物治療

1. 2. 2　培養系胃癌細胞に対する MDM2 阻害薬と抗腫瘍薬の併用

第2章　目的 ……………………………………………………………………14

第3章　方法 ……………………………………………………………………14

3. 1　細胞株と 5-FU

3. 2　siRNA とその導入

3. 3　細胞生存実験

3. 4　コンビネーションインデックス（Combination Index, CI）

3. 5　免疫ブロット法

3. 6　Quantitative reverse transcription - polymerase chain reaction（qRT-PCR）

3. 7　細胞周期解析

3. 8　動物実験における抗腫瘍効果の検討

3. 9　統計解析

第4章　結果 ……………………………………………………………………19

4. 1　野生型 *TP53* を有する大腸癌・胃癌細胞株に対する *MDM4*/*MDM2* ノックダウンと 5-FU による細胞増殖抑制

4. 2　*MDM4* と *MDM2* のノックダウンによる MDM2、MDM4、p53 とその下流分子の発現

4. 3　　細胞周期変化とアポトーシス
4. 4　　動物実験における抗腫瘍効果

第 5 章　考察　……………………………………………………………30
5. 1　　本研究で明らかにしたこと
5. 2　　細胞により異なる相乗効果と相加効果
5. 3　　細胞により異なる 5-FU の作用機序
5. 4　　MDM4、MDM2 のノックダウンによる治療の利点

第 6 章　結論　……………………………………………………………33

利益相反　……………………………………………………………35

引用文献　……………………………………………………………36

参考文献　……………………………………………………………41

謝辞　……………………………………………………………………42

第 1 章　研究の背景

1. 1　*MDM2*、*MDM4* 同時ノックダウンによる p53 の再活性化

1. 1. 1 癌抑制遺伝子 *TP53* と癌遺伝子 *MDM2*、*MDM4*

癌抑制遺伝子である p53 は細胞周期やアポトーシス、DNA 修復などを制御する様々な遺伝子を司る転写因子である[1-4]。*TP53* 遺伝子は約半数の癌において変異あるいは欠失しており[5]、*TP53* の不活化は癌の進展に重要な役割を果たしている。残りの半数の癌では野生型 *TP53* を有しているが、その機能は上流あるいは下流遺伝子などにより阻害されている[3, 6]。

MDM2 遺伝子は p53 の N 末端転写活性ドメインに結合してその機能を抑制する主な因子であり[7, 8]、さらに MDM2 は RING フィンガー領域を介して E3 リガーゼとして機能し、p53 をポリユビキチン化しプロテアソームを介して分解する働きがある[9-11]。逆に MDM2 は p53 の転写標的遺伝子でもあり、自己制御のフィードバックループを形成している[12, 13] 。様々な癌種における *MDM2* 遺伝子の増幅は 10%以上の頻度でみられる[14, 15]。

MDM2 のホモログであり、非常に類似した構造である MDM4 もまた *TP53* を制御している。MDM2 と同様に、MDM4 も p53 の転写活性ドメインに直接結合し、転写活性を抑制している[16]。MDM4 も RING ドメインを有するが E3 リガーゼの活性を欠くため、p53 を直接分解することはできない。しかし MDM2 と互いの RING ドメインを介してヘテロダイマーを形成することにより p53 に対する E3 リガーゼの活性を増強することができる[17, 18]。*MDM4* 遺伝子の増幅あるいは過剰発現は 10-20%の頻度で報告されている[19, 20]。

さらに、MDM2 はユビキチン化により MDM4 を分解することも知られている[21]。ここまでに述べた野生型 p53、MDM2、MDM4 の関係性を図 1 に示す[22]。

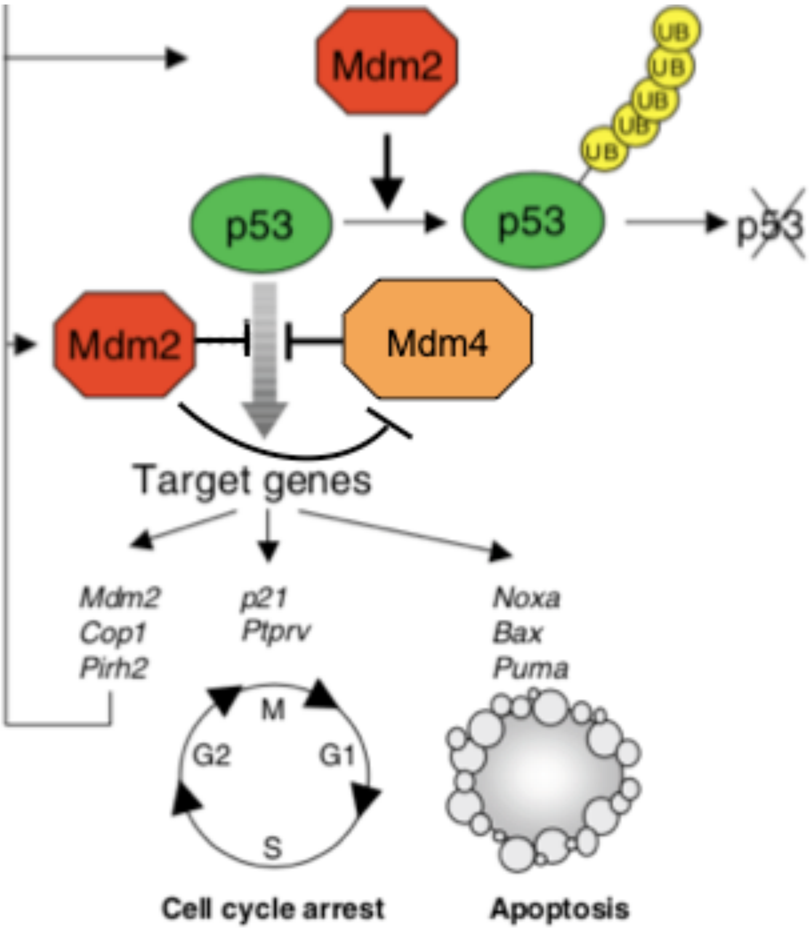


図 1 野生型 p53 と MDM2、MDM4 の関係

Marine, J.C., et al., *MDMX: from bench to bedside.* J Cell Sci, 2007.より引用。一部改変。

MDM2 と *MDM4* の癌遺伝子としての機能や、その発現傾向については様々な癌種で報告されており、野生型 *TP53* の培養系癌細胞は MDM2 高発現タイプと MDM4 高発現タイプの 2 つのタイプに分けられることが報告されている[23]。さらに、この研究では MDM2 高発現のタイプは MDM4 の発現が非常に低く、MDM4 高発現のタイプは MDM2 の発現が中程度であることも示された（図 2）。

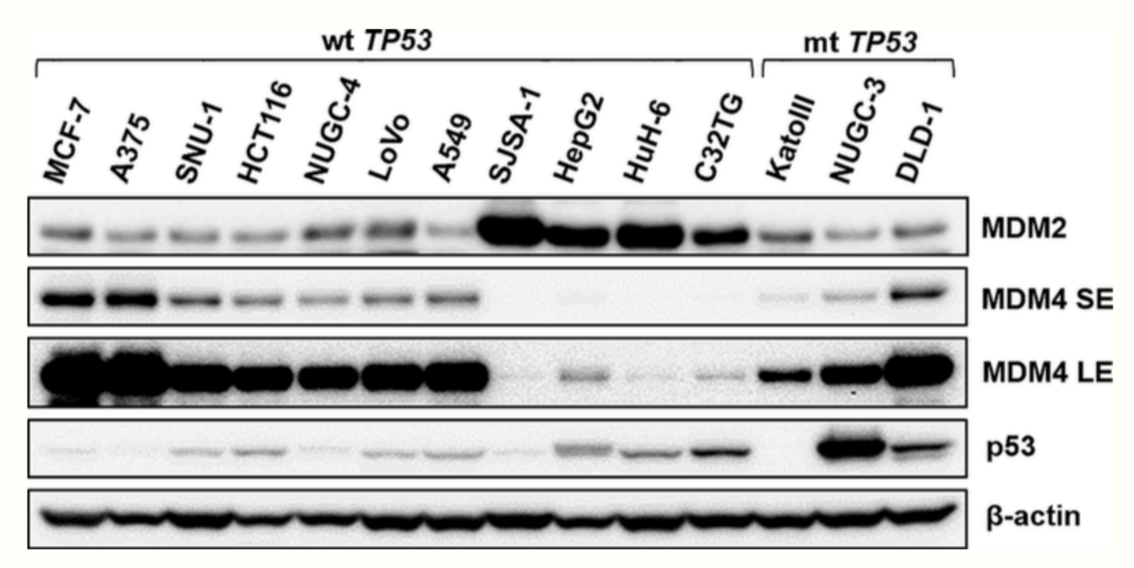


図２ 野生型 *TP53* 培養系癌細胞における MDM2、MDM4 の発現パターン

Hirose, M., et al., *MDM4 expression as an indicator of TP53 reactivation by combined targeting of MDM2 and MDM4 in cancer cells without TP53 mutation.* Oncoscience, 2014.より引用。

１．１．２ MDM2、MDM4 を標的とした創薬

野生型 *TP53* 腫瘍における p53 の機能修復はアポトーシスや細胞の老化を引き起こすことで腫瘍退縮を促すため、癌治療に適していると考えられており[24]、上述のような p53 を抑制する MDM2、MDM4 は癌治療において良い標的となる。これまでに MDM2-MDM4-p53 の相互作用を阻害する数々の小分子化合物やペプチドが開発されている[25-28]。この中でも MDM2 と p53 の結合を阻害する小分子化合物である nutlin-3 は idasanutlin として悪性リンパ腫や急性骨髄芽球性白血病に対していくつかの臨床試験が行われる段階まで進んでいる[29-31]。nutlin-3 は、MDM2 の N 末端に存在する p53 結合ドメインのポケットに結合し、MDM2 と p53 の結合を阻害する。その

結果、p53 の発現を増加させ、さらに *TP53* 標的遺伝子の転写活性を促すことで細胞増殖抑制、アポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を示す。

遠藤らは nutlin-3 を用いて種々のヒト胃癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討し、*TP53* 野生型の細胞株に対して一様に高い抗腫瘍効果があることを報告した[32]（図 3）。また、nutlin-3 の投与により p53 の発現量が増加し p21/WAF1 や Noxa の誘導も確認され、p53 の活性化による抗腫瘍効果が裏付けられる結果が得られている。

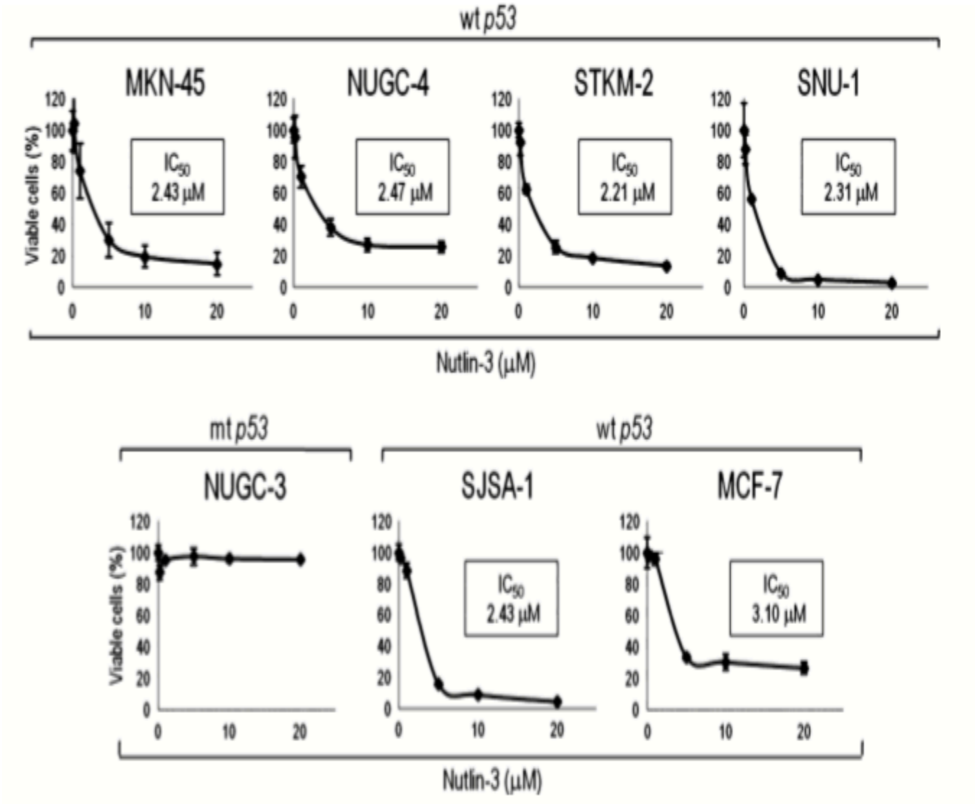


図 3　野生型 *TP53* 胃癌細胞に対する nutlin-3 の抗腫瘍効果

Endo, S., et al., *Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells.* Cancer Sci, 2011.より引用。

1．1．3 RNAi を利用した MDM2、MDM4 の発現抑制と p53 の活性化

遺伝子の発現抑制方法として siRNA を用いる方法があり、癌や他疾患の有望な治療戦略の一つとして精力的に研究されてきた[33-35]。siRNA はしばしば部分的な相補配列により非標的遺伝子の発現まで抑制してしまう（オフターゲット効果）が[36, 37]、siRNA のガイド鎖のシード領域とパッセンジャー鎖の相補配列を DNA 置換し二本鎖 RNA-DNA キメラ（dsRDC)とすることでオフターゲット効果を回避することができる[38]。廣瀬らはこの dsRDC を利用して *MDM2*、*MDM4* を特異的にノックダウンする DNA 修飾型 siRNA を合成し、p53 を再活性化させることにより抗腫瘍効果を発揮することを報告した（図 4-1）[23]。さらに、MDM4 高発現タイプの野生型 *TP53* 腫瘍に対しては *MDM4* と *MDM2* を同時にノックダウンすることが相乗的な効果を示すことを報告した（図 4-2)。

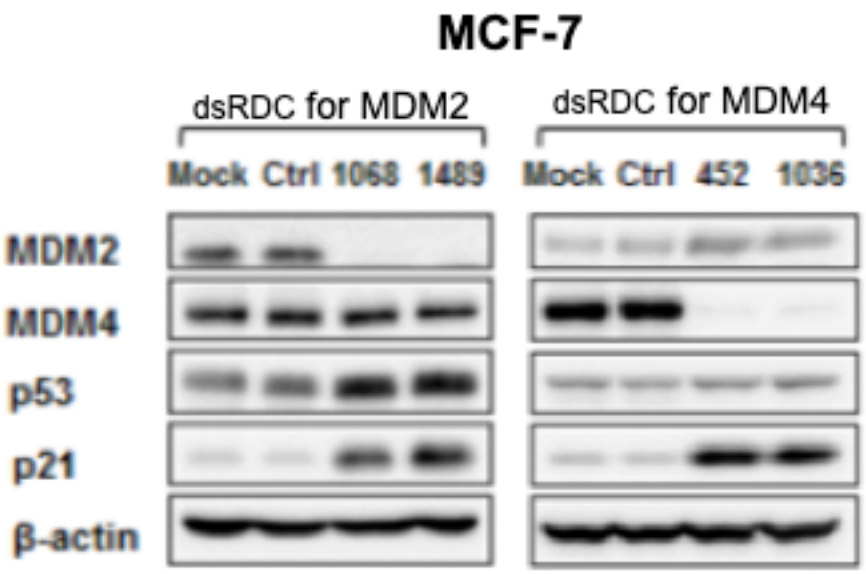


図 4-1　MCF-7(野生型 *TP53* 乳癌細胞)に対する *MDM2*、 *MDM4* を標的とした dsRDC による MDM2、MDM4 の発現抑制

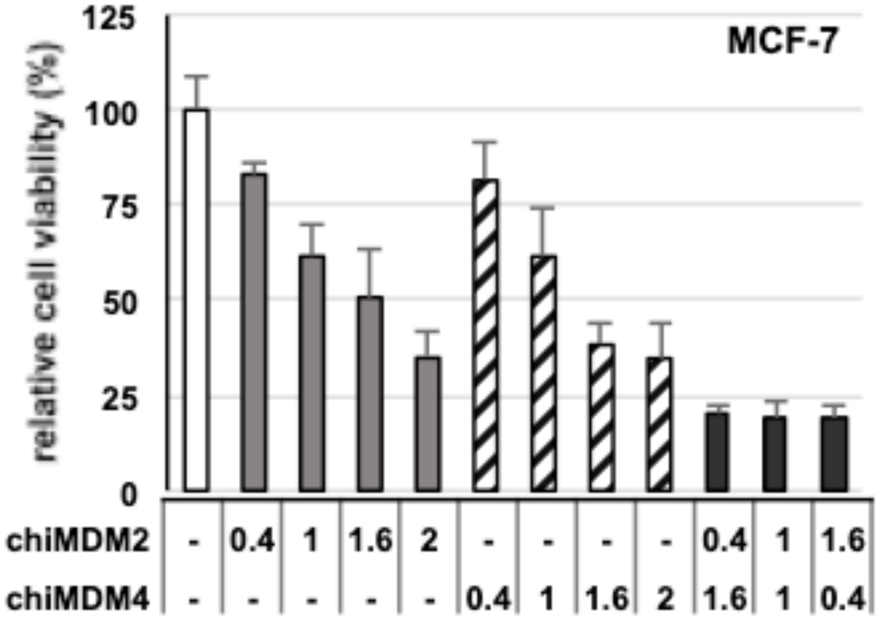


図 4-2　MCF-7(野生型 *TP53* 乳癌細胞)に対する *MDM2*、 *MDM4* を標的とした dsRDC（chimera, chi）の併用による抗腫瘍効果の増強

図 4-1、4-2 はいずれも Hirose, M., et al., *MDM4 expression as an indicator of TP53 reactivation by combined targeting of MDM2 and MDM4 in cancer cells without TP53 mutation.* Oncoscience, 2014. より引用した。

1．2．　消化器癌に対する薬物療法

1．2．1 切除不能進行・再発消化器癌に対する薬物治療

切除不能進行・再発消化器癌に対する薬物治療は分子標的薬等の発展により治療選択は多岐にわたる。胃癌と大腸癌の化学療法のアルゴリズムを図 5、図 6 に示す。

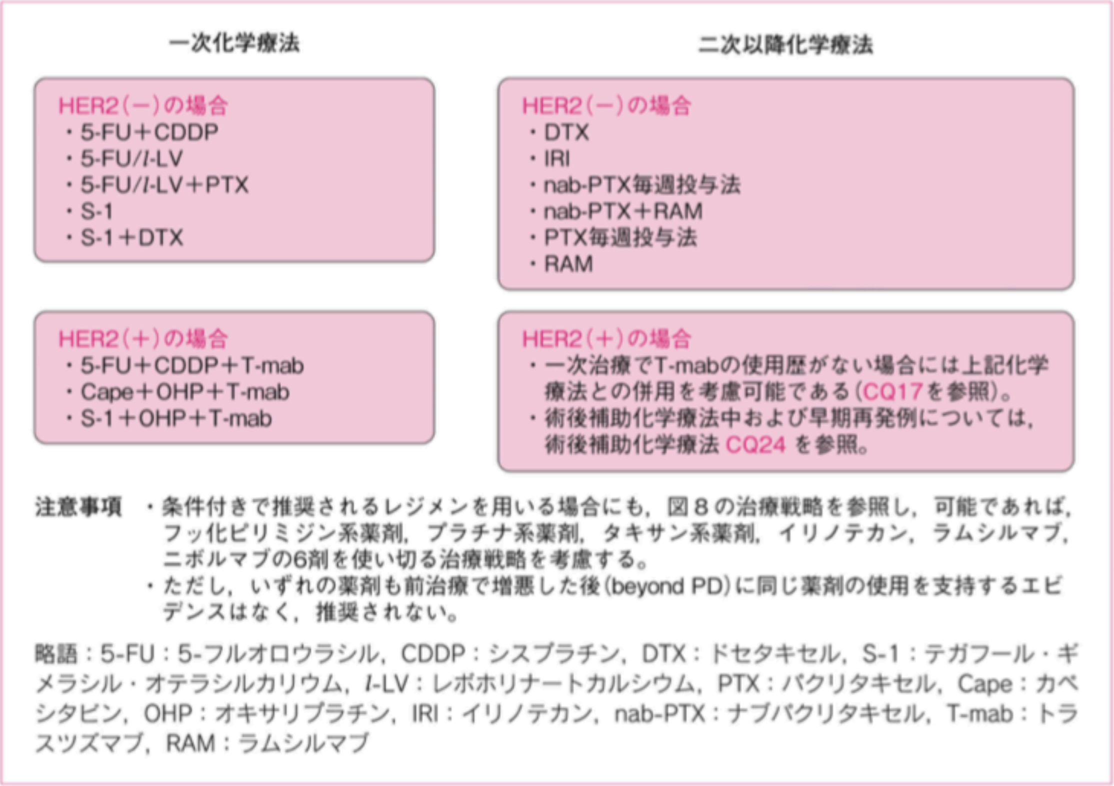


図 5　切除不能進行・再発胃癌に対して推奨されている化学療法レジメン

胃癌治療ガイドライン 2018 年第 5 版より抜粋した。

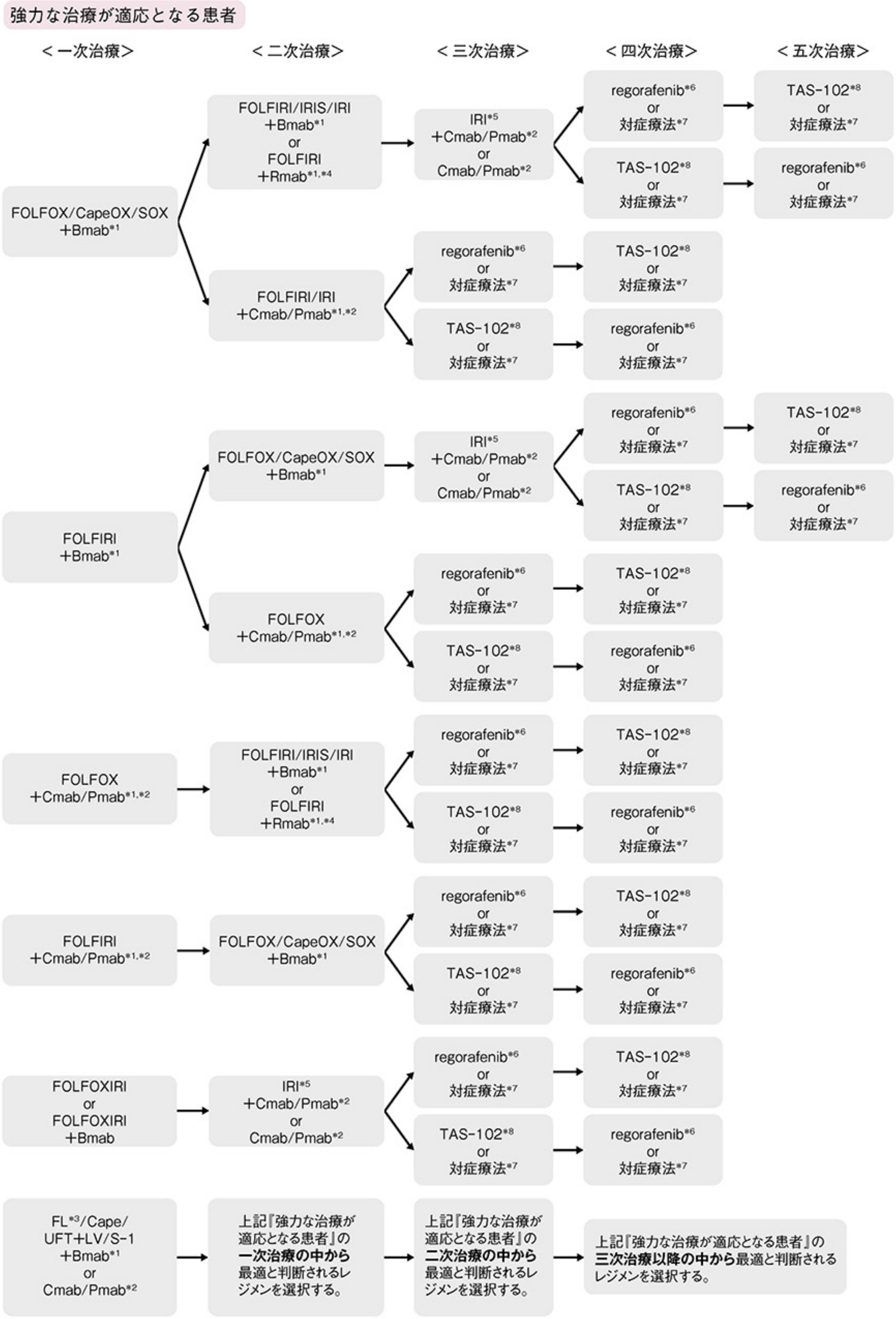


図 6　切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法のアルゴリズム

大腸癌治療ガイドライン 2016 年版より抜粋した。

切除不能進行・再発胃癌に対する分子標的薬としては、HER2 陽性である場合はトラスツズマブを 5-FU やシスプラチン等の殺細胞性抗腫瘍薬と併用することや[39]、二次療法として抗 VEGFR-2 抗体であるラムシルマブをパクリタキセルに併用すること[40]が推奨されており、さらに抗 PD-1 抗体薬の有効性も報告される[41]など、予後の改善が見込まれる。切除不能進行・再発大腸癌に対しては、殺細胞性抗腫瘍薬の組み合わせに、KRAS 変異の有無によって一次治療で選択する分子標的薬が異なることや、三次治療以降でもマルチキナーゼ阻害薬が使用できることなど、選択肢は多くアルゴリズムのように四〜五次治療まで行われることもあり、予後は大きく改善してきた。しかし、生存中央値は切除不能進行・再発胃癌で約 6-13 ヶ月、切除不能進行・再発大腸癌で約 30 ヶ月と未だに短く、薬物療法による治癒はほとんど望めないのが現状である。

1.2.2 MDM2 標的治療薬と抗腫瘍薬の併用

消化器癌に対する薬物治療の現状の限界から、新たな治療戦略として MDM2、MDM4 をターゲットとした治療と、様々な癌種に投与されている抗腫瘍薬を併用した研究は多く報告されている[28]。遠藤らは、MDM2 阻害薬である nutlin-3 と 5-FU あるいはシスプラチンの併用が野生型 *TP53* 胃癌細胞株に対して相加あるいは相乗的な効果があったことを報告した[32]。この研究では *in vivo* でもその併用効果を検証しており、nutlin-3 と 5-FU の併用による抗腫瘍効果の増強を示した（図 7)。

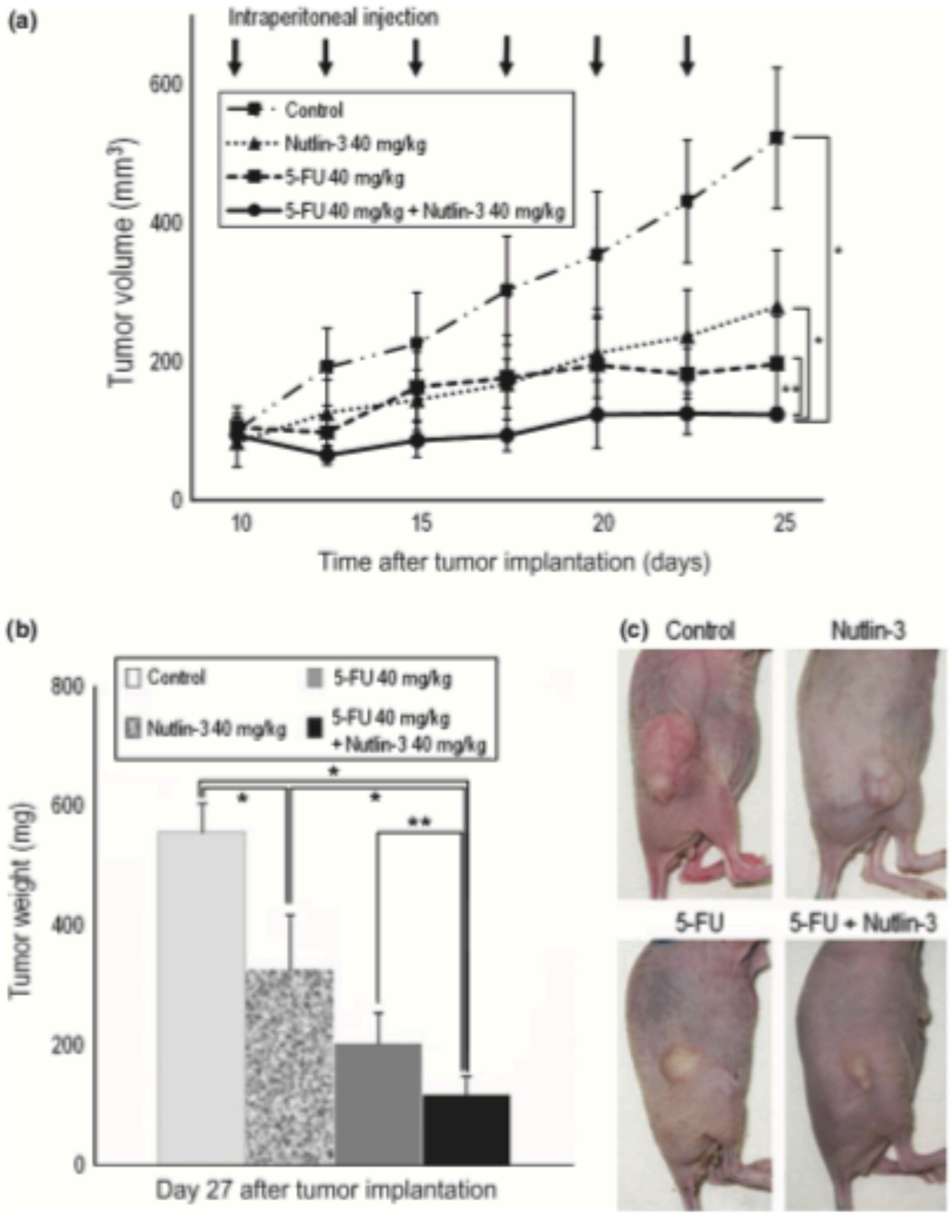


図 7　野生型 *TP53* を有する胃癌細胞（MKN-45）を使用した皮下異種移植腫瘍に対する nutlin-3 と 5-FU の併用による抗腫瘍効果

Endo, S., et al., *Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells.* Cancer Sci, 2011.より引用。

このような MDM2 阻害薬と抗腫瘍薬を併用した研究は多くみられるが、MDM4 阻害

薬との併用は報告が少ない。さらに、MDM 4 高発現腫瘍に対する MDM2 と MDM4 の同時阻害はそれぞれの単独阻害より強い効果があることは示されてきたが[23, 42, 43]、同時阻害と抗腫瘍薬の併用効果に関しては不明である。

第 2 章　目的

5-FU は消化器癌の治療において最も重要な薬剤のひとつであり、他の抗腫瘍薬と様々な組み合わせで投与され生存率の改善に寄与しているが、生存期間は未だ短く、化学療法による治癒はほとんど望めないのが現状である[44-48]。この現状を打開するためには新たな治療戦略が必要である。

MDM4 高発現かつ野生型 *TP53* を有する腫瘍に対して *MDM2*、*MDM4* の同時ノックダウンによる抗腫瘍効果の有用性や、MDM2 阻害薬と 5-FU の併用がその効果を増強することはこれまでの研究で立証されている。

本研究では、MDM4 高発現かつ野生型 *TP53* を有する消化器癌に対して *MDM2*、*MDM4* の同時ノックダウンが 5-FU の抗腫瘍効果に及ぼす影響について評価した。

第 3 章　方法

3. 1　細胞株と 5-FU

4 種類の野生型 *TP53* を有する培養細胞株を使用した。HCT116、LoVo は大腸癌細

胞株であり、SNU-1 と NUGC-4 は胃癌細胞株である。HCT116 は Horizon Discovery Ltd、LoVo と SNU-1 は American Type Culture Collection、NUGC-4 は理研バイオリソースセンターセルバンクよりそれぞれ購入した。HCT116、SNU-1、NUGC-4 は 10%のウシ胎児血清を添加した RPMI1640 培養液 (Sigma-Aldrich) で培養した。LoVo は 10%のウシ胎児血清を添加した Nutrient mixture F-12 HAM（Sigma-Aldrich）で培養した。

5-FU は協和発酵キリンより購入した。nutlin-3 は Calbio-chem より購入した。

3．2　siRNA とその導入

この研究で使用した DNA 修飾型 siRNA（dsRDC, chimera）の配列は以下の通りである。大文字はリボヌクレオチド、小文字はデオキシリボヌクレオチドを示す。

chimera Control (chiCtrl)

センス鎖　5′-GUACCGCACGUCAttcgtatc-3′

アンチセンス鎖　5′-tacgaaUGACGUGCGGUACGU-3′

chimera MDM2 (chiMDM2)

センス鎖　5′-CAGCCAUCAACUUctagtagc-3′

アンチセンス鎖　5′-tactagAAGUUGAUGGCUGAG-3′

chimera MDM4 (chiMDM4)

センス鎖　5′-CCCUCUCUAUGAUatgctaag-3′

アンチセンス鎖　5′-tagcatAUCAUAGAGAGGGCU-3′

chimera Control (chiCtrl)　（動物実験時に使用）

センス鎖　5′-gtaGUACCGCACGUCAttctc-3′

アンチセンス鎖　5′-gaaUGACGUGCGGUACtacGU-3′

chiCtrl はヒトとマウスの遺伝子に最少の相同性を持つように設計した。培養実験で使用した chimera はカートリッジ精製である（Sigma-Aldrich）。動物実験で使用した chimera は HPLC 精製である（ST Pharm. Co. Ltd.）。

培養細胞実験での siRNA の細胞への導入は Lipofectamine RNAiMAX（Inverogen）を使用した。動物実験での siRNA の導入は AteloGene Local Use（高研）を使用して行った。

3．3　細胞生存実験

WST-8 実験は細胞増殖／細胞毒性測定用試薬（同仁化学研究所）を使用した。siRNA を細胞へ導入後 5 日間培養し、iMark microplate reader（Bio-Rad）で測定した。吸光度は波長 450 nm と 620 nm の設定とした。

3．4　コンビネーションインデックス（Combination Index, CI）

chiMDM2 と chiMDM4 を混合したものと 5-FU の併用における相乗効果を定量化するため、CalcuSyn software（Biosoft）を用いて CI を算出し、Chou-Talalay 方式で決定した。

3．5　免疫ブロット法

SDS-PAGE と免疫ブロット法は過去の報告と同様の方法で行った[23]。使用した 1 次抗体と 2 次抗体は次の通りである。

MDM2（2A10）マウスモノクローナル抗体(Abcam)

MDMX（D-19）ヤギポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology）

抗 TP53 マウスモノクローナル抗体（BP53-12; Cell Sciences）

p21 Wafl/Cip1（DCS60）マウスモノクローナル抗体（Cell Signaling Technology）

p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA)ウサギポリクローナル抗体（Cell Signaling Technology）

βアクチンウサギポリクローナル抗体（Medical & Biological Laboratories）

HRP 標識抗マウス IgG 抗体（GE Healthcare）

HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体（GE Healthcare）

HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体（Sigma Aldrich）

化学発光検出は ECL select Western Blotting Detection Reagent（GE Healthcare）と Ez-Capture Imaging System（アトー）で行った。

3. 6 Quantitative reverse transcription -polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA サンプルは細胞融解液から抽出し、96 ウェルプレートの 1 ウェルあたり 40 μL の RealTime ready Cell Lysis reagent（Roche Diagnostics）を用いた。cDNA は 2 μL（0.2 μg）の RNA と 8 μL の Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Diagnostics) を 20 μL の反応液内で合成させた。qRT-PCR は Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR system（Applied Biosystems）を用いて 96 ウェルプレートで行った。p21 とβアクチンのプライマーと TaqMan プローブは Applied Biosystems より購入した。反応は 5 μL の cDNA、900 nM のプライマー、250 nM のプローブ、10 μL の TaqMan Gene Expression Mater Mix（Applied Biosystems）

で計 20 μL とし、標準的な熱サイクル下で施行した。標的とした *p21* mRNA の量はβアクチンの量で標準化した。

3．7　細胞周期解析

各細胞は 60 mm ディッシュに 1×10^5 個を撒き、chimera（濃度 0.5‐2 nM）の導入24 時間後に 5-FU（濃度 4 μM）を投与して 2 日間培養した。細胞は Accutase（US Biotechnologies）を投与して室温で 10 分間置いた後、静かにディッシュから剥がして回収した。PBS で一度洗浄し、Cycletest Plus DNA reagent kit （BD Bioscience）を用いて染色した。フローサイトメトリーは FACSCalibur flow cytometer と CellQuest software（BD Bioscience）を用いた。それぞれの細胞周期における細胞の割合は ModFit LT software（Verity Software House）で算出した。

3．8　動物実験における抗腫瘍効果の検討

全ての動物実験は筑波大学の動物実験委員会による承認を得て行った。生後 5 週の BALB/c ヌードマウス（雌）をチャールズリバージャパンより購入し、無菌の状態で適切な温度と湿度の環境下で管理した。HCT116 を生理食塩水（大塚製薬）で 5×10^4 個／μL の細胞融解液とした。この細胞融解液 100 μL を麻酔下でマウスの右脇腹に皮下注射した。接種 10 日後、皮下異種移植腫瘍が約 50 mm^3 になったマウスを無作為に4 グループ（各グループ 5 匹ずつ）にわけた。グループは chiCtrl（1 mg/kg）群、chiMDM4（0.5 mg/kg）＋chiMDM2（0.5 mg/kg）群、chiCtrl（1 mg/kg）＋5-FU（4 μM）群、chiMDM4（0.5 mg/kg）＋chiMDM2（0.5 mg/kg）＋5-FU（4 μM）群とした。chimera は AteloGene を用いて週 1 回局所注射で直接腫瘍内へ投与した。5-FU は週 3 回腹腔内

投与した。腫瘍体積は週 3 回計測し、体積＝長径×短径 ^{2}×0.5 の公式を用いて算出した。健康状態を管理するために、マウスの体重は週 3 回計測し、毎日状態を観察した。腫瘍体積が 2000 mm^3 に到達する前に実験は終了とした。

3．9　　統計解析

培養細胞実験での各グループ間の有意差は、Dunnett 法または Tukey 法を用いて評価した。動物実験での各グループ間の有意差は repeated ANOVA 法を用いて評価した。統計学的有意差は p 値＜0.05 とした。これらの統計解析は SPSS version 25.0 を用いて行なった。

第 4 章　結果

4．1　　野生型 ***TP53*** を有する大腸癌・胃癌細胞株に対する ***MDM4/MDM2*** ノックダウンと 5-FU による細胞増殖抑制

MDM4 と *MDM2* のノックダウンにより 5-FU の抗腫瘍効果が増強されるかどうかを検討するため、大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）を用いて、これらの細胞増殖性を WST-8 を用いて評価した。図 8 (a)に示すように、HCT116 細胞に対する chiMDM4 と chiMDM2 の混合投与（chiMDM4/chiMDM2）と 5-FU 単独投与は濃度依存性に腫瘍増殖を抑制した。chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用はそれぞれを単独投与した場合よりもさらに腫瘍増殖を抑制した。LoVo (b)や SNU-1 (c)、NUGC-4 (d)でも同様に 5-FU の増殖抑制が chiMDM4/chiMDM2 によってさらに増強することが確認できた。

chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用によるコンビネーションインデックス（CI）を算出し、結果を表 1 にまとめた。HCT116 が最も低い CI であり、続いて NUGC-4、LoVo、SNU-1 の順であった。この CI 値より、*MDM4* と *MDM2* を同時にノックダウンすることは 5-FU の効果を、HCT116 と NUGC-4 においては相乗的に増強し、SNU-1 と LoVo においては相加的に増強することがわかった。

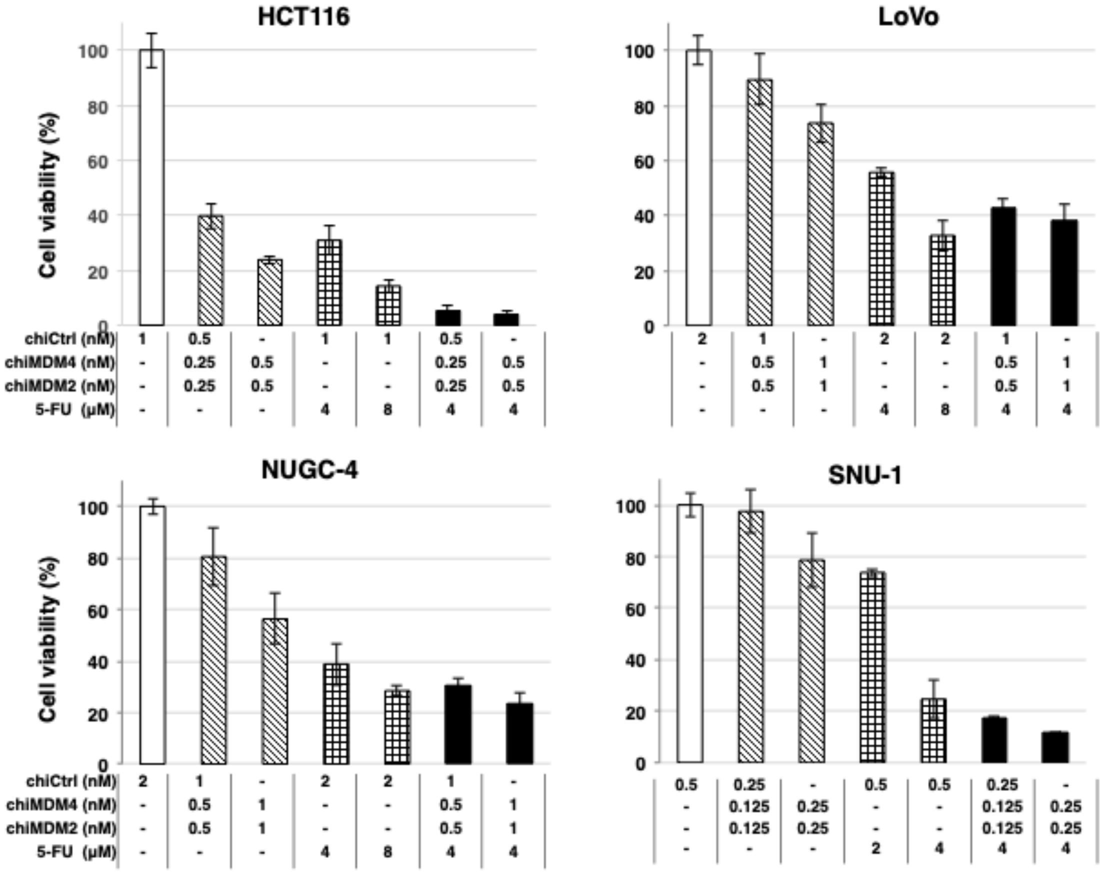


図 8 *MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンと 5-FU による抗腫瘍効果

大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）に対して chiCtrl あるいは同濃度の chiMDM2/chiMDM4 の混合液を導入後、5-FU を投与し、chimera 導入後 5 日後に WST-8 を用いて細胞生存を評価した。細胞生存率は chiCtrl を投与した群と比較して算出した。

表１　**chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用によるコンビネーションインデックス**

細胞株	chiMDM4 (nM)	chiMDM2 (nM)	5-FU (4μM)	Combination Index (CI)
HCT116	0.250	0.250	+	0.28
	0.500	0.500	+	0.29
NUGC-4	0.500	0.500	+	0.83
	1.000	1.000	+	0.77
LoVo	0.500	0.500	+	0.90
	1.000	1.000	+	0.97
SNU-1	0.125	0.125	+	0.95
	0.250	0.250	+	0.97

CI>1.1,拮抗効果; CI = 0.9–1.1,相加効果; CI<0.9, 相乗効果

さらに HCT116 と NUGC-4 において、chiMDM2 の代用として MDM2 阻害薬である nutlin-3 を用い、chiMDM4 と nutlin-3 による 5-FU の抗腫瘍効果の増強についても検討した（図 9)。HCT116 においては chiMDM4 と nutlin-3 の投与により 5-FU の効果が相乗的に増強することがわかったが、NUGC-4 においては相加あるいは拮抗効果であった（表 2)。

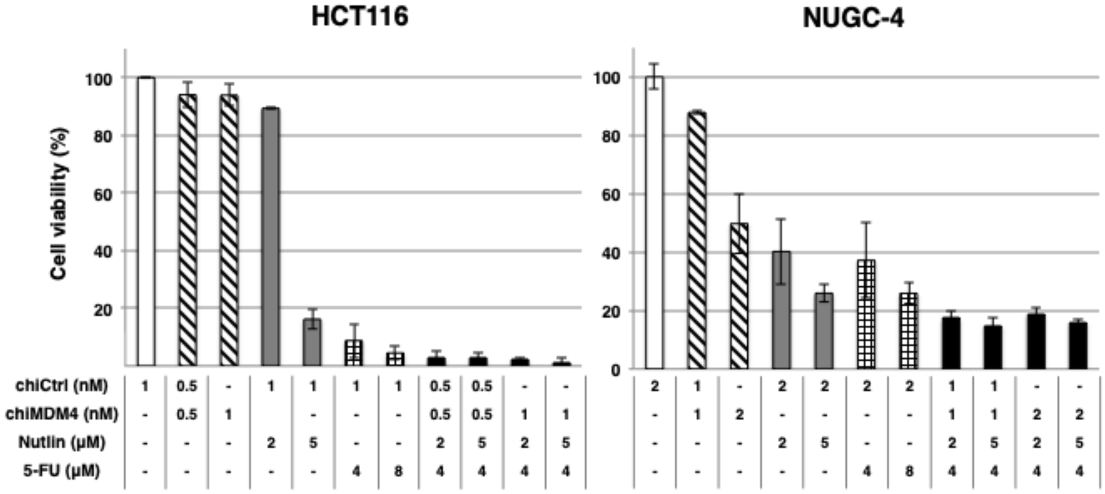


図 9 ***MDM4*** **のノックダウンと nutlin-3、5-FU による抗腫瘍効果**

大腸癌細胞 1 種(HCT116)と胃癌細胞 1 種(NUGC-4)に対して chiCtrl あるいは chiMDM4 を導入後、nutlin-3 と 5-FU を投与し、chimera 導入後 5 日後に WST-8 を用いて細胞生存を評価した。細胞生存率は chiCtrl を投与した群と比較して算出した。

表 2　chiMDM4/nutlin-3 と 5-FU の併用によるコンビネーションインデックス

細胞株	nutlin-3 (μM)	chiMDM4 (nM)	5FU (4μM)	Combination Index (CI)
HCT116	2.0	0.5	+	0.55
	5.0	0.5	+	0.93
	2.0	1.0	+	0.48
	5.0	1.0	+	0.66
NUGC-4	2.0	1.0	+	0.82
	5.0	1.0	+	1.06
	2.0	2.0	+	1.19
	5.0	2.0	+	1.42

CI>1.1,拮抗効果; CI = 0.9–1.1,相加効果; CI<0.9, 相乗効果

4．2　*MDM4* と *MDM2* のノックダウンによる MDM2、MDM4、p53 とその下流分子の発現

大腸癌細胞と胃癌細胞における、chiMDM4/chiMDM2 によって増強される 5-FU の抗腫瘍効果の作用機序を解明するため、同じく大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）を用いて、MDM2、MDM4、p53、p21、PUMA の発現変化を免疫ブロット法で解析した（図 10)。

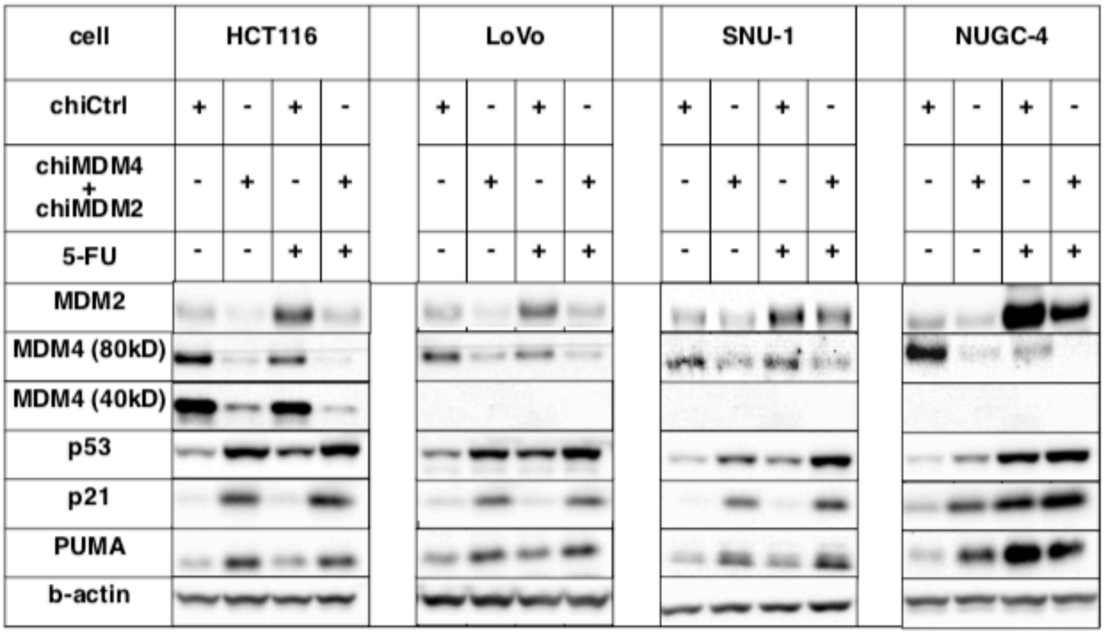


図 10　*MDM4* と *MDM2* のノックダウンによる MDM2、MDM4、p53 とその下流分子の発現

大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）に対して chiCtrl あるいは同濃度の chiMDM2/chiMDM4 の混合液を導入後、5-FU を投与し、その 24 時間後に回収した蛋白を用いて免疫ブロット法で解析した。MDM2、MDM4、p53、p21、PUMA の発現を評価し、βアクチンをコントロールとした。

HCT116 は *MDM4* の野生型と変異対立遺伝子を持つことが知られている。変異対立遺伝子はコドン 279 の 3 つ目のヌクレオチドに 1 塩基の欠失があるためフレームシフ

トが起こり、早期終止となる。これにより 289 アミノ酸の短い蛋白が形成されるが[49]、この蛋白も p53 結合領域は保たれており、p53 阻害機能を有する。chiCtrl を導入した HCT116 細胞が 80 kDa と 40 kDa の 2 つのバンドを発現しており、それぞれ野生型と変異型の MDM4 であることを示している。

免疫ブロットのバンドを定量化した結果を表 3 に示した。

表 3　　図 10 の免疫ブロットバンド定量結果

細胞株	/actin	chiCtrl	chiMDM4/chiMDM2	chiCtrl + 5-FU	chiMDM4/chiMDM2 + 5-FU
HCT116	MDM2	1.00	0.27	4.24	1.10
	MDM4 (80kDa)	1.00	0.09	0.54	0.03
	MDM4 (40kDa)	1.00	0.09	0.61	0.04
	p53	1.00	2.22	1.53	2.29
	p21	1.00	6.35	1.40	7.45
	PUMA	1.00	2.96	1.43	2.86
LoVo	MDM2	1.00	0.29	3.30	0.98
	MDM4	1.00	0.26	0.71	0.24
	p53	1.00	2.75	2.40	5.30
	p21	1.00	4.12	0.99	5.32
	PUMA	1.00	2.00	1.56	2.41
SNU-1	MDM2	1.00	0.75	1.38	1.23
	MDM4	1.00	0.56	0.84	0.46
	p53	1.00	2.85	1.88	6.27
	p21	1.00	44.53	7.85	61.31
	PUMA	1.00	2.50	1.63	3.74
NUGC-4	MDM2	1.00	0.65	8.79	3.64
	MDM4	1.00	0.10	0.45	<0.01
	p53	1.00	3.00	8.26	11.85
	p21	1.00	2.71	3.50	4.79
	PUMA	1.00	3.77	7.90	5.26

chiMDM4/chiMDM2 の処理により、HCT116 では野生型と変異型 MDM4 の発現が抑制された。MDM4 の発現は、HCT116 と NUGC-4 においてそれぞれの chiCtrl 処理群と比較して 11 倍、10 倍の抑制を認め、これは LoVo の 3.8 倍、SNU-1 の 1.8 倍より

も強い抑制を示していた。また、chiMDM4/chiMDM2 の処理により MDM2 の発現抑制も認めており、全ての細胞で chiCtrl 処理群と比較して 1.3-3.7 倍の抑制を示した。*MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンにより p53 の蓄積が起こり、その下流の p21 と PUMA が誘導された。p53 の発現はいずれの細胞においても同程度であった（2.2 - 3.0 倍）。

5-FU は p53 を増加させ、それに伴って MDM2、p21、PUMA を様々な程度で増加させた。5-FU による MDM2 の増加は、NUGC-4 と HCT116 でそれぞれ 8.8 倍、4.2 倍と LoVo の 3.3 倍、SNU-1 の 1.4 倍よりも多かった。その一方、MDM4 の発現レベルは MDM2 の発現と反比例しており、MDM2 の誘導により MDM4 が不安定になっていることが示唆された。

chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用では全ての細胞において、5-FU 単独よりも MDM2 の発現が弱まり、MDM4 の発現は最も強く抑制され、p53 と p21 は chiMDM4/chiMDM2 単独や 5-FU 単独よりも強く誘導されていた。

MDM2 と p21 は p53 反応性に誘導されるが、HCT116 と LoVo では 5-FU による p21 の誘導が MDM2 の誘導より弱かった。そのため、HCT116 に対して chiMDM4/chiMDM2 単独、5-FU 単独、chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用のそれぞれの治療による *p21* mRNA のレベルを qRT-PCR で解析した（図 11）。chiCtrl と比較して、5-FU 単独、chiMDM4/chiMDM2 単独、chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用では *p21* mRNA レベルがそれぞれ 2.4 倍、4.1 倍、5.1 倍に増加していた。この結果より 5-FU に暴露された細胞は MDM2 の誘導により p21 が不安定化していることが示唆された。

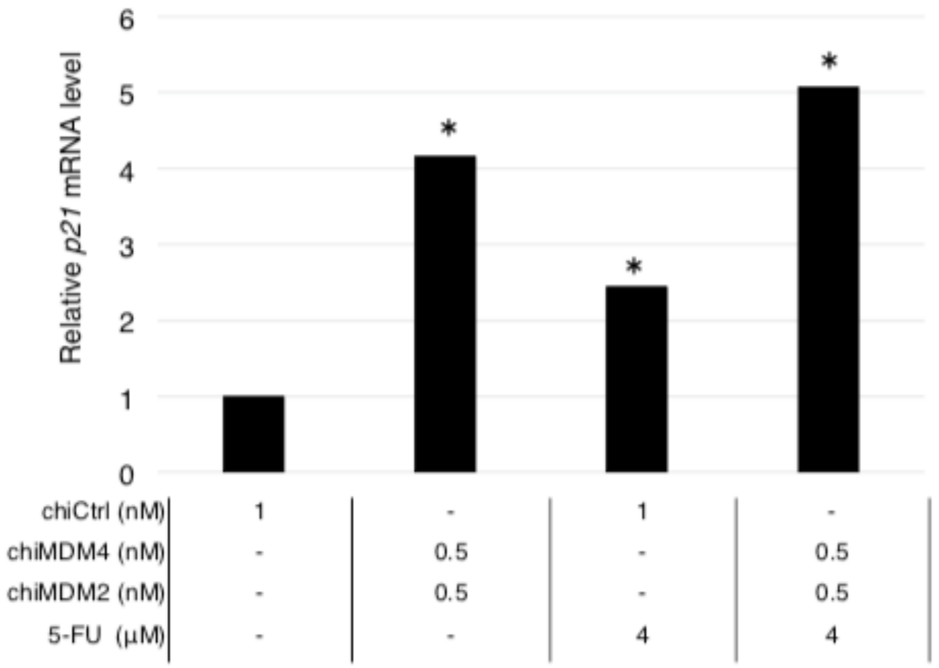


図 11　HCT116 における *p21* の mRNA 発現

HCT116 に chiCtrl あるいは同濃度の chiMDM2/chiMDM4 の混合液を導入後、5-FU を投与し、その 24 時間後に回収した細胞に対して qRT-PCR を用いて *p21* の mRNA の発現量を解析した。chiCtrl を投与した細胞と比較した *p21*mRNA の発現レベルをグラフとして示した。

4．3　　細胞周期変化とアポトーシス

chiMDM4/chiMDM2 単独、5-FU 単独、chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用による細胞周期変化とアポトーシスを評価するためフローサイトメトリーを行った（図 12）。

HCT116 では chiMDM4/chiMDM2 により G1 期分画が増加し、S 期分画が低下した。5-FU により G1 期分画が低下し、S 期分画が増加した。このことから *MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンは G1 期停止を、5-FU は S 期停止を惹起していることが示された。chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用は強力に G1 期停止を誘導し、さらには subG1 分画として検出されているアポトーシスも誘導した。

SNU-1 と LoVo は chiMDM4/chiMDM2 による G1 期停止を認めた。5-FU 単独投与により LoVo ではわずかな G1 期増加を、SNU-1 では明らかな変化は見られなかった。chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用では SNU-1 ではアポトーシスを起こしたが、LoVo では見られなかった。

NUGC-4 では、chiMDM4/chiMDM2 単独も 5-FU 単独も G1 期停止を誘導するがアポトーシスは誘導しなかった。chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用は 5-FU 単独、chiMDM4/chiMDM2 単独と比べて、ほぼ変化は認めなかった。

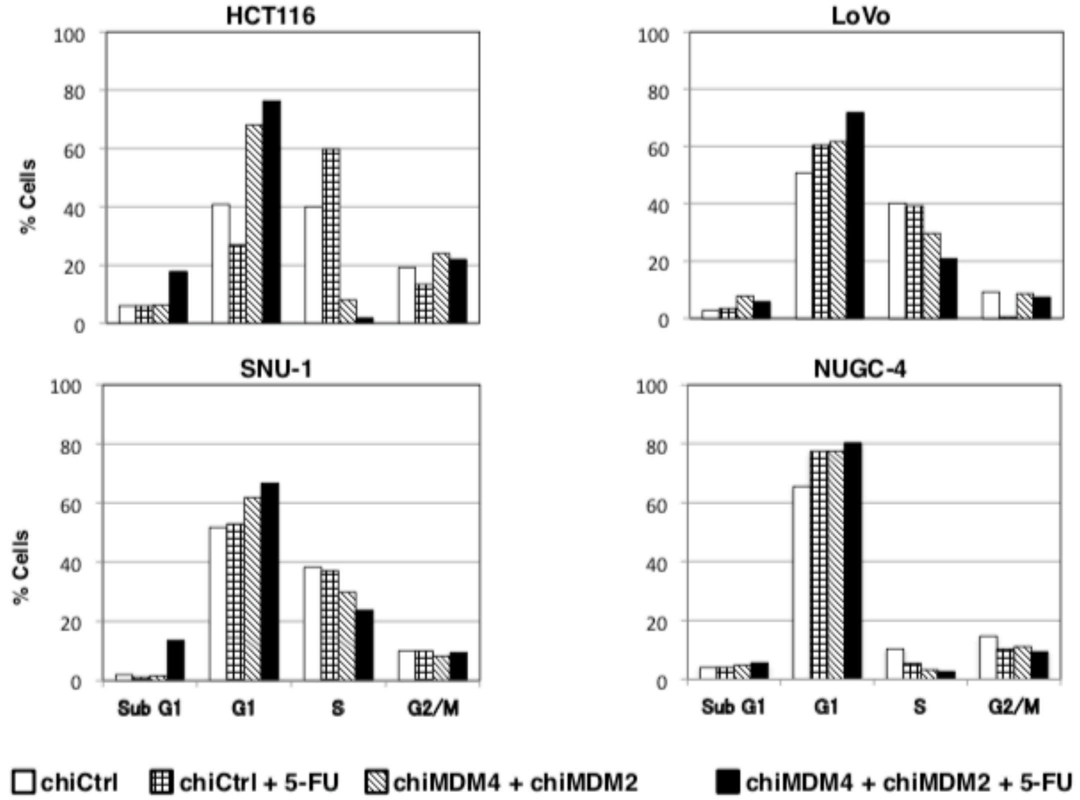
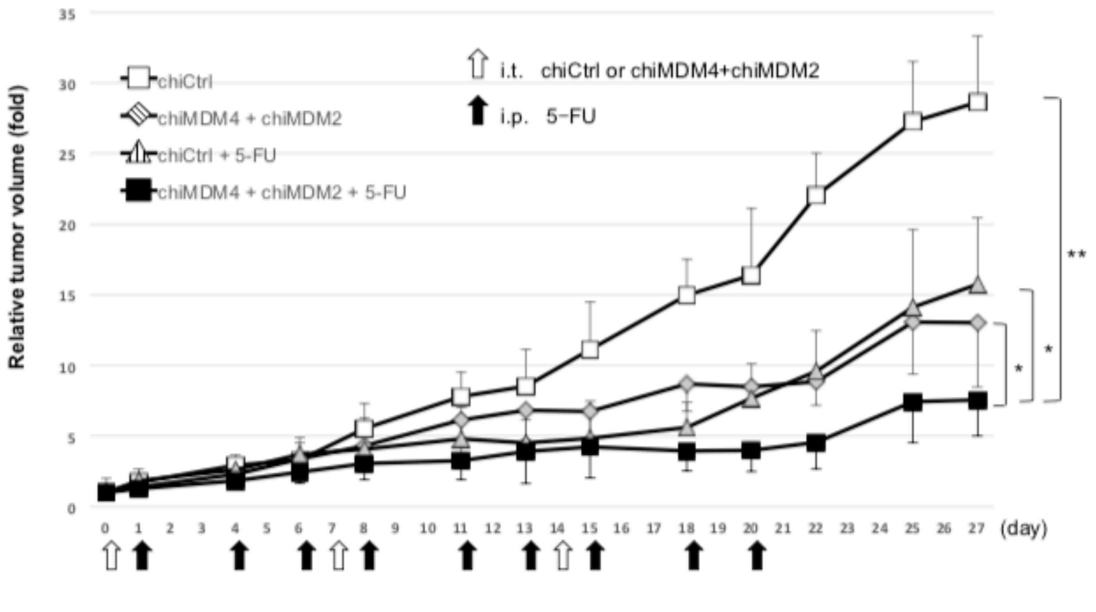


図 12　*MDM4* と *MDM2* のノックダウンと 5-FU による細胞周期への影響

大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）に対して chiCtrl または同濃度の chiMDM2/chiMDM4 の混合液を導入後、5-FU を投与し、その 24 時間後に回収した細胞を用いてフローサイトメトリーで細胞周期解析を行なった。

4．4　　動物実験における抗腫瘍効果

chiMDM4/chiMDM2 が *in vivo* でも腫瘍増殖を抑制し、さらには 5-FU の抗腫瘍効果を増強できるか否かを検証するため、HCT116 を皮下異種移植させたマウスで実験を行なった。chiMDM4/chiMDM2 単独と 5-FU 単独投与では chiCtrl 群よりも緩やかな腫瘍増殖を示し（図 13）、*MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンは 5-FU と同様に *in vivo* でも腫瘍増殖を強く抑制できることが示された。chiMDM4/chiMDM2 と 5-FU の併用では、それぞれの単独投与よりもさらに強い腫瘍増殖抑制効果を明らかにすることができた。



*P=0.03, **P<0.001

図 13　HCT116 皮下異種移植モデルにおける *MDM4* と *MDM2* のノックダウンと 5-FU による抗腫瘍効果

chiCtrl 投与群と各群の腫瘍体積の平均値±標準誤差を比較した。

第 5 章　考察

5．1　　本研究で明らかにしたこと

5-FU は大腸癌、胃癌、乳癌などを含む様々な癌に対して広く使用されている薬剤である。また、廣瀬らによって chiMDM4/chiMDM2 を用いた *MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンが野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現の腫瘍に対して相乗的に抗腫瘍効果を示すことが報告された[23]。本研究では、野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現の大腸癌、胃癌細胞で *MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンが 5-FU の抗腫瘍効果を増強することを示した。

本研究で使用した細胞株では、5-FU の投与により p53 の活性化とそれに伴う MDM2 の誘導が見られた。MDM2 の蓄積により p53 に対するネガティブフィードバック機構が働き、p53 を介した抗腫瘍効果は減弱する。chiMDM4/chiMDM2 の併用は *MDM2* ノックダウンによりこのネガティブフィードバックを断ち切り、5-FU の抗腫瘍効果を増強するものと考えられる。

5．2　　細胞により異なる相加効果と相乗効果

細胞により 5-FU の抗腫瘍効果を chiMDM4/chiMDM2 が増強する程度が異なるのは、MDM4 の抑制程度と関連していると考えられる。相乗効果が見られた HCT116、NUGC-4 では相加効果であった SNU-1、LoVo よりも 5-FU 投与による MDM4 抑制がより強く見られた。これらの細胞でどのように 5-FU による MDM4 の発現抑制が起こるのかは不明である。可能性の一つとして、5-FU 投与により p53 が活性化し MDM2 が誘導され、この誘導された MDM2 が MDM4 をユビキチン化し不安定にすることが

考えられる。

chiMDM4/chiMDM2 による MDM4 ノックダウンは、HCT116、NUGC-4 では SNU-1、LoVo よりも効果的であった。もともと MDM4 の発現レベルは細胞毎に異なっており（図 14）、相乗効果の見られた HCT116、NUGC-4 は、相加効果であった SNU-1、LoVo より MDM4 の発現レベルが高く、これらの細胞では腫瘍増殖能を MDM4 に、より強く依存している可能性が考えられた[50, 51]。

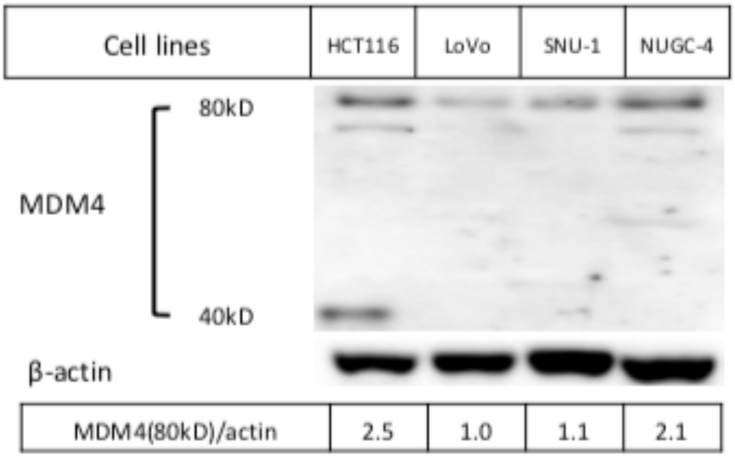


図 14　細胞による MDM4 発現の違い

大腸癌細胞 2 種（HCT116、LoVo）と胃癌細胞 2 種（SNU-1、NUGC-4）の MDM4 発現レベルを免疫ブロット法を用いて比較した。

5．3　　細胞により異なる 5-FU の作用機序

この研究で使用した野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現の細胞では、5-FU による p53 の蓄積は同程度で起こっていたが、細胞周期の観点からすると 5-FU の効果は細胞毎に異なっていた。HCT116 では 5-FU 投与により早期 S 期停止が起こり、LoVo と NUGC-4 では G1 期停止が起こっていた。5-FU には 2 つの異なる作用機序がある[52-54]。1 つはチミジン合成阻害による DNA 複製を阻害することで、これにより早期 S 期の停止が

起こる。もう1つは、リボゾーマルRNAの中に取り込まれてその行程を阻害することによる核小体ストレスを起こすことで、これによりp53の活性化を導き、G1期停止やアポトーシスを誘導している。本研究では5-FUによるp53の活性化は、HCT116よりLoVoとNUGC-4の方が強く見られた（図10、表3)。多くの癌細胞ではDNA複製阻害が5-FUの主な作用機序と考えられているが、核小体ストレスの程度は細胞によって異なり、LoVoやNUGC-4では、リボゾーマルRNAに取り込まれるフルオロウリジンの効果によるG1期停止が現れているものと考えられる。HCT116では5-FUによる早期S期停止が見られたが、chiMDM4/chiMDM2と5-FUを併用するとp53の活性化により、細胞周期分画は早期S期停止からG1期停止に大きく変化した。この結果から、HCT116ではchiMDM4/chiMDM2を加えることで5-FUの主な作用機序をDNA複製阻害からp53の活性化によるG1期停止にシフトさせる可能性が考えられた。

5．4　MDM4、MDM2のノックダウンによる治療の利点

本研究では、動物実験でも*MDM4*と*MDM2*の同時ノックダウンが腫瘍増殖を抑制し、5-FUの抗腫瘍効果を増強することを示し、かつ、目立った毒性は見られなかった。約50%の癌で野生型の*TP53*を発現しているが[5]、その一部はMDM2、あるいはMDM2とMDM4の両方によって機能が抑制されている。そのような癌に対する治療として、MDM2とMDM4は良い標的であり、最近ではMDM2とMDM4を標的とした小分子化合物やペプチド製剤の研究が盛んである[26]。しかし、その多くはMDM2とp53の結合を阻害してp53を増加させるものであり、同時にMDM2の発現も増加させてしまう。MDM2自身にはp53非依存性に細胞増殖や腫瘍形成を促す機能が報告されており、薬剤効果の持続性が懸念される[55]。本研究においても、*MDM2* ノックダ

ウンの代わりに MDM2 阻害薬である nutlin-3 を用いて、MDM4 ノックダウンとの併用による 5-FU の抗腫瘍効果の増強を評価したところ、chiMDM2 を用いて *MDM2* をノックダウンした場合に比べて 5-FU の効果を増強する程度は弱かった（図 9、表 2)。特に NUGC-4 では投与濃度によっては拮抗効果であった。NUGC-4 においては、5-FU によって誘導される MDM2 が多く、nutlin-3 の投与によりさらに MDM2 が蓄積するため、p53 や p21、RB、E2F1 などの MDM2 によって直接不活化される増殖抑制因子の不活化が起こるものと考えられた。また、*TP53* 欠失型の腫瘍では *MDM2* を欠失させると腫瘍増殖抑制が起こり、これは *TP73* を介する p53 反応性遺伝子の転写活性化の抑制によるものと報告されている[56]。p73 は p53 と類似の機能を有し、また同様に MDM2 によりユビキチン処理されている。*MDM4* と *MDM2* のノックダウンによる治療は *TP53* 欠失型の腫瘍においても有益である可能性がある。

本研究で使用した DNA-RNA chimera は血中での安定性を増し、さらには off-target 効果を減弱させるよう工夫してあるものの、ヒトへの応用には未だデリバリーの問題を残している。siRNA を搭載した治療薬の開発を目指して、オリゴ核酸のデリバリーシステムの研究を進める必要がある。

第 6 章　結論

野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現であるヒト大腸癌/胃癌細胞において *MDM4* と *MDM2* の同時ノックダウンは 5-FU の抗腫瘍効果を増強することが示された。*MDM4* と *MDM2* を標的とした siRNA 薬と 5-FU を含む細胞毒性抗癌剤を組み合わせた治療

は新たな治療戦略となるだろう。

利益相反

本研究に関わる利益相反はない

引用文献

1. Fridman, J.S. and S.W. Lowe, *Control of apoptosis by p53.* Oncogene, 2003. **22**(56): p. 9030-9040.
2. Pei, D., Y. Zhang, and J. Zheng, *Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx.* Oncotarget, 2012. **3**(3): p. 228-235.
3. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 307-310.
4. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 594-604.
5. Hainaut, P., et al., *IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools.* Nucleic Acids Res, 1998. **26**(1): p. 205-213.
6. Toledo, F. and G.M. Wahl, *Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(12): p. 909-923.
7. Momand, J., et al., *The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.* Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-1245.
8. Oliner, J.D., et al., *Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 857-860.
9. Demidenko, Z.N. and M.V. Blagosklonny, *Flavopiridol induces p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and, independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor.* Cancer Res, 2004. **64**(10): p. 3653-3660.
10. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53.* Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-299.
11. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2.* Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
12. Pant, V. and G. Lozano, *Dissecting the p53-Mdm2 feedback loop in vivo: uncoupling the role in p53 stability and activity.* Oncotarget, 2014. **5**(5): p. 1149-1156.
13. Piette, J., H. Neel, and V. Marechal, *Mdm2: keeping p53 under control.* Oncogene, 1997. **15**(9): p. 1001-1010.
14. Gunther, T., et al., *Mdm2 gene amplification in gastric cancer*

correlation with expression of Mdm2 protein and p53 alterations. Mod Pathol, 2000. **13**(6): p. 621-626.

15. Sun, L.P., et al., *[Relationship between gastric cancer and gene amplification of p14 and mdm2].* Ai Zheng, 2004. **23**(1): p. 36-39.
16. Shvarts, A., et al., *MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2.* Embo j, 1996. **15**(19): p. 5349-5357.
17. Linares, L.K., et al., *HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12009-12014.
18. Tanimura, S., et al., *MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains.* FEBS Lett, 1999. **447**(1): p. 5-9.
19. Gilkes, D.M., et al., *Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(6): p. 1999-2010.
20. Toledo, F. and G.M. Wahl, *MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy.* Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(7-8): p. 1476-1482.
21. Pan, Y. and J. Chen, *MDM2 Promotes Ubiquitination and Degradation of MDMX.* Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(15): p. 5113-5121.
22. Marine, J.C., M.A. Dyer, and A.G. Jochemsen, *MDMX: from bench to bedside.* J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 3): p. 371-378.
23. Hirose, M., et al., *MDM4 expression as an indicator of TP53 reactivation by combined targeting of MDM2 and MDM4 in cancer cells without TP53 mutation.* Oncoscience, 2014. **1**(12): p. 830-843.
24. Wade, M., Y.C. Li, and G.M. Wahl, *MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy.* Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 83-96.
25. Brown, C.J., et al., *Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(12): p. 862-873.
26. Burgess, A., et al., *Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies.* Front Oncol, 2016. **6**: p. 7.
27. Wachter, F., et al., *Mechanistic validation of a clinical lead stapled peptide that reactivates p53 by dual HDM2 and HDMX targeting.*

Oncogene, 2017. **36**(15): p. 2184-2190.

28. Zhang, Q., S.X. Zeng, and H. Lu, *Targeting p53-MDM2-MDMX loop for cancer therapy.* Subcell Biochem, 2014. **85**: p. 281-319.
29. Blotner, S., et al., *Phase 1 summary of plasma concentration-QTc analysis for idasanutlin, an MDM2 antagonist, in patients with advanced solid tumors and AML.* Cancer Chemother Pharmacol, 2018. **81**(3): p. 597-607.
30. Herting, F., et al., *Antitumour activity of the glycoengineered type II anti-CD20 antibody obinutuzumab (GA101) in combination with the MDM2-selective antagonist idasanutlin (RG7388).* Eur J Haematol, 2016. **97**(5): p. 461-470.
31. Lehmann, C., et al., *Superior anti-tumor activity of the MDM2 antagonist idasanutlin and the Bcl-2 inhibitor venetoclax in p53 wild-type acute myeloid leukemia models.* Journal of Hematology & Oncology, 2016. **9**(1): p. 50.
32. Endo, S., et al., *Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells.* Cancer Sci, 2011. **102**(3): p. 605-613.
33. Coelho, T., et al., *Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis.* N Engl J Med, 2013. **369**(9): p. 819-829.
34. Fitzgerald, K., et al., *Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial.* The Lancet, 2014. **383**(9911): p. 60-68.
35. Tabernero, J., et al., *First-in-humans trial of an RNA interference therapeutic targeting VEGF and KSP in cancer patients with liver involvement.* Cancer Discov, 2013. **3**(4): p. 406-417.
36. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi.* Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-637.
37. Saxena, S., Z.O. Jonsson, and A. Dutta, *Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells.* J Biol

Chem, 2003. **278**(45): p. 44312-44319.

38. Ui-Tei, K., et al., *Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: modified siRNA with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with significantly reduced off-target effect.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(7): p. 2136-2151.
39. Bang, Y.J., et al., *Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial.* Lancet, 2010. **376**(9742): p. 687-697.
40. Wilke, H., et al., *Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial.* Lancet Oncol, 2014. **15**(11): p. 1224-1235.
41. Shitara, K., et al., *Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial.* The Lancet, 2018. **392**(10142): p. 123-133.
42. Hu, B., et al., *MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin.* J Biol Chem, 2006. **281**(44): p. 33030-33035.
43. Tisato, V., et al., *MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer.* J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 133.
44. de Gramont, A., et al., *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2938-2947.
45. Douillard, J.Y., et al., *Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.* The Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1041-1047.
46. Falcone, A., et al., *Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional*

fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. J Clin Oncol, 2007. **25**(13): p. 1670-1676.

47. Goldberg, R.M., et al., *A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2004. **22**(1): p. 23-30.
48. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group.* N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 905-914.
49. Barretina, J., et al., *The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity.* Nature, 2012. **483**(7391): p. 603-607.
50. Gembarska, A., et al., *MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma.* Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1239-1247.
51. Patton, J.T., et al., *Levels of HdmX expression dictate the sensitivity of normal and transformed cells to Nutlin-3.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3169-3176.
52. Akpinar, B., et al., *5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53.* Oncotarget, 2015. **6**(41): p. 43679-43697.
53. Fang, F., J. Hoskins, and J.S. Butler, *5-Fluorouracil Enhances Exosome-Dependent Accumulation of Polyadenylated rRNAs.* Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(24): p. 10766-10776.
54. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-338.
55. Ganguli, G. and B. Wasylyk, *p53-independent functions of MDM2.* Mol Cancer Res, 2003. **1**(14): p. 1027-1035.
56. Feeley, K.P., et al., *Mdm2 Is Required for Survival and Growth of p53-Deficient Cancer Cells.* Cancer Res, 2017. **77**(14): p. 3823-3833.

参考文献

・Mamiko Imanishi, Yoshiyuki Yamamoto, Xiaoxuan Wang, Akinori Sugaya, Mitsuaki Hirose, Shinji Endo, Yukikazu Natori, Kenji Yamato, Ichinosuke Hyodo. Augmented antitumor activity of 5-FU by double knockdown of MDM4 and MDM2 in colon and gastric cancer cells. *Cancer Science*.

・Mamiko Imanishi, Yoshiyuki Yamamoto, Yukako Hamano, Takeshi Yamada, Toshikazu Moriwaki, Masahiko Gosho, Takehiro Okumura, Narikazu Boku, Haruhiko Kondo, Ichinosuke Hyodo. Efficacy of adjuvant chemotherapy after resection of pulmonary metastasis from colorectal cancer: A propensity score-matched analysis. *European Journal of Cancer*, 2018. 106: p. 69-77.

謝辞

本研究は、私が筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻博士課程に在学中に行った研究を纏めたものです。本研究を進めるにあたり、素晴らしい研究環境を与え、多大なるご指導、ご助言を賜りました兵頭一之介教授に感謝を致します。また、最初の実験手技から研究発表、論文作成に至るすべてにおいて多大なるご指導を賜った大和建嗣先生に感謝の辞を述べます。そして研究内容や論文作成に多くのご助言、ご指導を頂いた山本祥之先生に感謝の辞を述べます。

本研究がこれからの癌治療のために、わずかでも役に立つことがあれば幸いです。