

氏 名 (生年月日) <sup>しみず</sup>清水 <sup>だいき</sup>大器 (1995 年 5 月 6 日)

学 位 の 種 類 博 士 ( 薬 学 )

学 位 記 番 号 博 薬 第 235 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 16 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 DNA polymerase delta 1, catalytic subunit (POLD1) の悪性胸膜中皮腫  
における新規治療標的候補分子としての有効性の検討

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 芦 原 英 司

(副査) 教 授 長 澤 一 樹

(副査) 教 授 中 山 祐 治

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序章

悪性胸膜中皮腫 (MPM) は、アスベスト曝露に起因して発症する希少がんである。MPM は発症までに 20-50 年を要することから、我が国における死亡者数は近年も増加傾向であり、5 年生存率は 5-10%と極めて予後不良である。現代の MPM の標準治療では未だ満足 of いく治療成績が得られていないのが現状であり、MPM に対する新規治療戦略はアンメット・メディカル・ニーズである。本研究は、公共データベースから抽出した RNA-seq データの解析および MPM 細胞株を用いた抗腫瘍効果の検討を組み合わせることにより、MPM に対する新規治療標的候補分子を同定することを目的に実施した。

### 第 1 章 治療標的候補分子としての POLD1 同定と RNA 干渉法による増殖抑制効果の検討

MPM の主な発症原因は、アスベストが産生する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) による恒常的な DNA 損傷や、breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) や BRCA1 associated protein 1 (BAP1) などの DNA 損傷修復 (DNA damage repair; DDR) 因子の機能欠失に起因するゲノム不安定性であると考えられている。このような DNA 損傷や遺伝子変異によって誘導される複製ストレスが蓄積しやすい細胞では、致死性の DNA 損傷によって細胞死が誘導される一方で、DDR 因子が過剰発現することで生存/増殖するクローンが選択されることがある。そこで本研究は、DDR 因子の過剰発現が MPM の予後悪化に寄与するものと仮説を立て、新規治療標的候補として DNA polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) に着目した。Pol  $\delta$  は POLD1-4 からなるヘテロ 4 量体であり、DNA のラギング鎖の伸長と種々の DDR 機構に参与している。近年、様々ながん種における Pol  $\delta$  構成サブユニットの変異や過剰発現が認められているが、MPM

における Pol  $\delta$  の予後予測因子および新規治療標的としての可能性については明らかとされていない。そこで、11,000 症例以上のがん患者組織由来のゲノムデータベースである The Cancer Genome Atlas (TCGA) より MPM 患者の RNA-Seq データ (TCGA MESO, n=79) を抽出し、*POLD1-4* の mRNA を高発現 (n=39) 群および低発現 (n=40) 群に分け、全生存期間 (OS) との相関について解析した。その結果、触媒サブユニットをコードする *POLD1* 高発現群の患者において、低発現群に比して有意に OS が短かった (OS 中央値: 385 日 vs 741 日,  $p<0.001$ , Log rank test)。続いて、TCGA の汎がん分析データ (n=6,634) と Genometype-Tissue Expression (GTEx) の正常組織由来 RNA-Seq データ (n=4,030) を比較したところ、*POLD1* 発現量がほとんどの固形腫瘍で正常組織と比較し有意に高かった。さらに、正常肺線維芽細胞 (IMR-90、MRC-5) と MPM 細胞株 (211H、H2052、MESO-1、H2452、MESO-4、MESO-14) における *POLD1* タンパク質発現量をウェスタンブロットにて解析したところ、MPM 細胞株 6 株すべてにおいて *POLD1* が過剰発現していた。続いて、*POLD1* に対する siRNA (siPOLD1) による *POLD1* 発現抑制の MPM 細胞株の増殖に対する影響を WST-8 assay にて評価したところ、ネガティブコントロール siRNA (siCtrl) と比較し、*POLD1* を発現抑制させた MPM 細胞の増殖は有意に低かった。以上の結果より、*POLD1* が MPM 細胞の増殖に寄与しており、*POLD1* の過剰発現が MPM 患者の生命予後を悪化させることが示唆された。

## 第 2 章 *POLD1* 発現抑制が細胞周期およびアポトーシスにおよぼす効果の検討

第 1 章にて認められた *POLD1* の発現抑制による MPM 細胞の増殖抑制作用を受けて、第 2 章では、*POLD1* の細胞周期および細胞死制御への関与を検討した。はじめに、*POLD1* の発現抑制が細胞周期におよぼす影響を、ヨウ化プロピジウム (PI) により DNA を染色し、flow cytometry (FCM) 法にて解析した。その結果、siPOLD1 処理された 211H 細胞株においては、細胞死と判断される SubG<sub>1</sub> 期の細胞の割合が siCtrl と比較し有意に多く (siCtrl:  $8.7 \pm 2.4$ , siPOLD1#1:  $28 \pm 5.8$ , siPOLD1#2:  $22 \pm 3.8$ )、siPOLD1 処理 H2052 細胞株においては G<sub>1</sub> 期の細胞の割合が有意に多かった (siCtrl:  $76 \pm 1.4$ , siPOLD1#1:  $86 \pm 0.9$ , siPOLD1#2:  $91 \pm 0.6$ )。さらに、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を用いてパルス染色した際の BrdU の取り込みを FCM にて解析したところ、BrdU 陽性細胞 (%) が siCtrl と比較し siPOLD1 処理 211H (siCtrl:  $28 \pm 1.5$ , siPOLD1#1:  $19 \pm 4.0$ , siPOLD1#2:  $13 \pm 1.6$ ) および siPOLD1 処理 H2052 (siCtrl:  $20 \pm 0.7$ , siPOLD1#1:  $5.6 \pm 1.9$ , siPOLD1#2:  $1.0 \pm 1.0$ ) 細胞株で有意に少なかった。続いて、*POLD1* 発現抑制によるアポトーシス誘導作用を PI/Annexin V 二重染色法にて評価したところ、FCM 法による解析で siPOLD1 処理 211H (siCtrl:  $6.6 \pm 1.3$ , siPOLD1#1:  $41 \pm 4.9$ , siPOLD1#2:  $21 \pm 1.4$ )、H2052 (siCtrl:  $4.4 \pm 0.3$ , siPOLD1#1:  $21 \pm 5.3$ , siPOLD1#2:  $7.6 \pm 1.0$ ) および siPOLD1 処理 MESO-1 (siCtrl:  $3.9 \pm 0.9$ , siPOLD1#1:  $8.4 \pm 0.6$ , siPOLD1#2:  $22 \pm 0.5$ ) 細胞株においてアポトーシス細胞の割合が有意に多かった。次に、DNA2 本鎖切断マーカーであるリン酸化 histone H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) の発現量をウェスタンブロットにて解析したところ、siCtrl 処置群に比して siPOLD1 処置群で顕著に高かった。さらに、DNA2 本鎖切断に対してセンサーとして機能し、主に G<sub>1</sub>/S 期において細胞周期を制御する ataxia telangiectasia mutated (ATM)-checkpoint kinase 2 (Chk2)-p53 経路の活性化をウェスタンブロットにて解析した。その結果、siPOLD1 処理され

た 211H、H2052 および MESO-1 細胞株においてリン酸化 ATM、Chk2 および p53 の発現量が顕著に高かった。以上の結果より、POLD1 発現抑制によって DNA2 本鎖切断が蓄積し、ATM-Chk2 経路が活性化することで、細胞周期の G<sub>1</sub>/S 期での停止およびアポトーシスが誘導されることが示唆された。

## 総括

本研究によって、POLD1 は MPM 細胞の DNA 損傷の修復と G<sub>1</sub>/S 期における細胞周期進行に寄与しており、POLD1 の発現抑制によって MPM 細胞の DNA 損傷蓄積を伴う細胞周期の停止およびアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。MPM 細胞における POLD1 の機能を解明した本研究成果は、有効な治療薬のない MPM に対する新規治療戦略確立につながる新たな知見である。

## 審査の結果の要旨

### <緒言>

悪性胸膜中皮腫 (MPM) は、アスベスト曝露に起因して発症する希少がんである。MPM は発症までに 20-50 年を要し、我が国における死亡者数は近年も増加傾向であり、5 年生存率は 5-10%と極めて予後不良である。現代の MPM の標準治療では未だ満足 of いく治療成績が得られておらず、MPM に対する新規治療戦略はアンメット・メディカル・ニーズである。

アスベストに曝露された中皮細胞は、アスベストが産生する活性酸素種により、恒常的に DNA 損傷を受けている。また breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) や BRCA1 associated protein 1 などの DNA 損傷修復 (DDR) 因子の機能欠失を生じ、DNA 複製ストレスが蓄積しやすく、これらの中皮細胞から DDR 因子が過剰発現し、生存／増殖能を獲得したクローンが MPM を発症すると考えられる。本研究では DDR 因子として DNA polymerase  $\delta$  に着目し、公共データベースから抽出した RNA-seq データの解析および MPM 細胞株を用いた抗腫瘍効果の検討を組み合わせることにより、MPM に対する新規治療標的候補分子を同定することを目的に実施した。

### <審査結果の要旨>

第 1 章では、まず公共データベース The Cancer Genome Atlas に公開された患者データベースを用い、MPM 患者組織由来 mRNA 発現量と、組織提供患者の全生存期間の相関を解析したところ、Pol  $\delta$  の触媒サブユニットである *POLD1* 高発現患者群の全生存期間が低発現患者群に比べ有意に短縮していることを明らかとした。次に、The Cancer Genome Atlas の固形腫瘍由来ゲノムデータと Genotype-Tissue Expression の正常細胞由来ゲノムデータの比較によって *POLD1* が甲状腺と前立腺を除く固形腫瘍で高発現していることを見出したほか、ウェスタンブロット法による解析では、正常肺線維芽細胞と比較し MPM 細胞株で *POLD1* タンパク質

の発現量が著明に高いことも明らかにした。さらに、RNA 干渉法により POLD1 を発現抑制したところ、MPM 細胞の増殖が抑制されたことから、POLD1 が MPM に対する新規治療標的候補としての可能性があることが明らかとなった。

第 2 章では、第 1 章で得られた POLD1 発現抑制によって誘導される MPM 細胞の増殖抑制効果が生じるメカニズムの解明を目的に検証実験を行った。細胞周期解析により、POLD1 の発現抑制 48 時間後に 211H 細胞においては細胞死が誘導され、その他の MPM 細胞株においては G<sub>1</sub> 期の細胞分画の蓄積を認めた。さらに、POLD1 発現抑制 120 時間後のアポトーシス解析により、DNA2 本鎖切断が蓄積した MPM 細胞においてアポトーシスが誘導されることが示された。また、POLD1 発現抑制によって DNA 複製ストレス応答経路である ataxia-telangiectasia mutated - checkpoint kinase 2 - p53 経路が活性化し、POLD1 が MPM 細胞における DNA 複製ストレスの抑制に寄与していることが示唆された。

以上のことから、POLD1 は MPM における DNA 損傷修復に寄与しており、POLD1 の発現抑制により、DNA 損傷蓄積による抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。

#### < 審査の結論 >

本研究により、POLD1 高発現が MPM 患者の予後悪化と相関すること、さらに POLD1 発現抑制によって MPM 細胞の DNA 損傷蓄積を伴う細胞周期の停止またはアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。本研究の成果によって、POLD1 が MPM の新規治療標的候補となる可能性があり、有効な治療法のない MPM に対する新たな治療戦略を提供できる知見を得た。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。