

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

2023 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

清水 大器

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) : 清水大器 (Daiki Shimizu)

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

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 δ (Pol δ) に着目した。Pol δ 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 機構に関与している。近年、様々ながん種における Pol δ 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 δ 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 Genotype-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 SubG₁ 期の細胞の割合が siCtrl と比較し有意に多く (siCtrl: 8.7 ± 2.4 , siPOLD1#1: 28 ± 5.8 , siPOLD1#2: 22 ± 3.8)、siPOLD1 処理 H2052 細胞株においては G₁ 期の細胞の割合が有意に多かった (siCtrl: 76 ± 1.4 , siPOLD1#1: 86 ± 0.9 , siPOLD1#2: 91 ± 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 ± 1.5 , siPOLD1#1: 19 ± 4.0 , siPOLD1#2: 13 ± 1.6) および siPOLD1 処理 H2052 (siCtrl: 20 ± 0.7 , siPOLD1#1: 5.6 ± 1.9 , siPOLD1#2: 1.0 ± 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 ± 1.3 , siPOLD1#1: 41 ± 4.9 , siPOLD1#2: 21 ± 1.4)、H2052 (siCtrl: 4.4 ± 0.3 , siPOLD1#1: 21 ± 5.3 , siPOLD1#2: 7.6 ± 1.0) および siPOLD1 処理 MESO-1 (siCtrl: 3.9 ± 0.9 , siPOLD1#1: 8.4 ± 0.6 , siPOLD1#2: 22 ± 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 (γ 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 G₁/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 G₁/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 G₁/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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また、本論文は、一部未発表データを含んでいる。

Daiki Shimizu, Miku Ishibashi, Tadaaki Yamada, Yuki Toda, Shigekuni Hosogi, Eishi Ashihara. POLD1 is required for cell cycle progression by overcoming DNA damage in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165. [第 1 章、第 2 章]

目次

略語一覧

序論	1
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..	6
第 1 節 緒言	6
第 2 節 実験方法	8
1. 公共データベースによる解析	8
2. 細胞培養	8
3. ウェスタンブロット法による POLD1 タンパク質発現解析	8
4. Small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン	9
5. qRT-PCR によるノックダウン効率の評価	9
6. WST-8 assay による siPOLD1 の増殖抑制効果の検討	10
7. 統計解析	10
第 3 節 結果	12
1. 公共データベースによる Pol δ と悪性中皮腫患者の生命予後の相関解析	12
2. 正常組織および腫瘍組織における POLD1 発現量比較	15
3. ウェスタンブロット法による正常細胞と MPM 細胞株の POLD1 発現量比較	16
4. siPOLD1 によるノックダウン効率の検証	17
5. POLD1 発現抑制による増殖抑制効果の検討 (WST-8 assay)	18
第 4 節 考察	19
第 5 節 小括	21
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	22
第 1 節 緒言	22
第 2 節 実験方法	23
1. 細胞培養	23
2. ヨウ化プロピジウム (PI) 染色法を用いた細胞周期解析	23
3. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)パルス染色法を用いた S 期細胞の検出	23
4. Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) 導入 H2052 細胞による細胞 周期解析	23
5. POLD1 発現抑制によるアポトーシス解析	24
6. ウェスタンブロット法による ATM-Chk2-p53 経路の活性評価	24
7. 統計解析	24
第 3 節 結果	26
1. ヨウ化プロピジウム (PI) 染色法を用いた細胞周期解析	26

2. BrdU パルス染色法を用いた S 期細胞の検出	29
3. Fucci 導入 H2052 を用いた細胞周期解析	31
4. POLD1 発現抑制によるアポトーシス解析	34
5. POLD1 発現抑制による DNA 損傷の定量解析	37
6. POLD1 発現抑制による ATM-Chk2-p53 経路の活性評価	38
第 4 節 考察	40
第 5 節 小括	43
総括	44
謝辞	46
引用文献	47

略語一覧

18S rRNA	18S ribosomal RNA
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ataxia-telangiectasia and Rad3-related
BAP1	BRCA1 associated protein 1
BRCA1/2	breast cancer susceptibility gene 1/2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
CDK4/6	cyclin-dependent kinase 4/6
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
Cdt1	cdc10 dependent transcript 1
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
DDR	DNA damage repair
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSB	DNA double strand break
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fucci	fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GTE _x	Genotype-Tissue Expression
HR	homologous recombination
ICI	immune checkpoint inhibitor
MPM	malignant pleural mesothelioma
NFDM	non-fat dry milk
NHEJ	nonhomologous end joining
OS	overall survival
PBS (-)	phosphate-buffered saline (Mg^{2+} - and Ca^{2+} - free)
PC/SM	penicillin-streptomycin
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PI	propidium iodide
Pol δ	DNA polymerase delta
Pol ϵ	DNA polymerase epsilon
POLD1	DNA polymerase delta 1, catalytic subunit
POLD2	DNA polymerase delta 2, accessory subunit
POLD3	DNA polymerase delta 3, accessory subunit
POLD4	DNA polymerase delta 4, accessory subunit
PVDF	polyvinylidene difluoride

qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-poly-acrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
siRNA	small interfering RNA
SSB	DNA single strand break
TBS	tris-buffered saline
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TPM	transcripts per million
γ H2A.X	phospho-histone H2A.X

序論

悪性胸膜中皮腫 (malignant pleural mesothelioma; MPM) はアスベストの曝露によって発症する希少がんである。悪性中皮腫は肺（胸膜）、心臓、腹膜、精巣に発症することが知られているが、MPM は悪性中皮腫症例の 90% 以上を占める¹。診断された時点ですでに進行している場合が多く、MPM の世界的な 5 年生存率は 5-10% で推移している²。また、我が国における病期別 5 年生存率は、I 期 25.0% (n=20)、II 期 22.2% (n=9)、III 期 5.9% (n=17)、IV 期 6.1% (n=34) であり、極めて予後不良である [全国がん (成人病) センター協議会の生存率共同調査 (2021 年 11 月集計)]。胸膜組織に突き刺さったアスベスト繊維はおよそ 20-50 年という長期にわたって残存し、MPM 発症に寄与することから、アスベストが使用されなくなった近年においても、我が国における死亡者数は増加傾向である (Figure 1)。

MPM の治療は、切除可能症例に対しては外科療法が、切除不可能症例や術後再発症例に対しては化学療法や免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor; ICI) が治療の主体となる。化学療法においては、殺細胞性抗悪性腫瘍薬であるシスプラチンおよびペメトレキセド併用療法が 2000 年代初頭から第 1 選択として使用されており³、近年では、ニボルマブとペンブロリズマブの ICI 併用療法の有効性が臨床試験によって示されている^{4,5}。しかしながら、前述の 5 年生存率が示す通り、MPM 患者の生命予後は未だ不良であり、MPM に対する新規治療標的の確立はアンメット・メディカル・ニーズである。

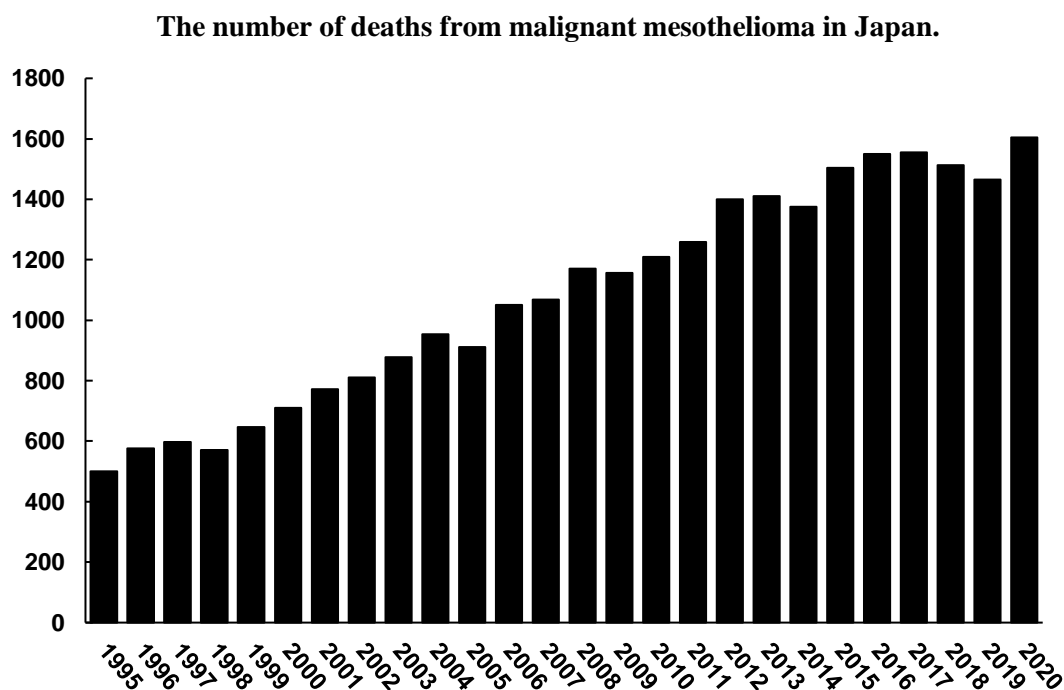


Figure 1. The number of deaths from malignant mesothelioma in Japan.

The graph shows the number of deaths from 1995 to 2020 based on vital statistics from the Ministry of Health, Labor and Welfare.

これまでの研究によって、アスベスト関連 MPM の発症機序として DNA 損傷および DNA 損傷応答の機能不全が重要であることが明らかとなってきた。DNA 損傷を引き起こす外的要因として挙げられるのが、アスベストに含有される鉄イオンである。胸膜組織に残存したアスベスト分子からは、鉄イオンに起因する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) が産生され恒常的に DNA 損傷を引き起こす^{6,7}。さらに、中皮細胞における DNA 損傷修復 (DNA damage repair; DDR) 機構の機能不全も MPM 発症に寄与していると考えられている。DNA 修復システムは、5 つの異なる複雑な経路群を通じて、さまざまなタイプの DNA 損傷を修復している。塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、DNA ミスマッチ修復、相同組換え (homologous recombination; HR)、非相同末端接合 (nonhomologous end joining; NHEJ) である⁸。MPM においてはこれらの正確な複製フォークの維持に関わる因子に高頻度の機能欠失型変異が見出されており、代表的なものに breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) や BRCA1 associated protein 1 (BAP1) があげられる。BAP1 は MPM 患者のおよそ 45.0% に機能欠失が観察されるヒストン脱ユビキチン化酵素であり、クロマチンリモデリングおよび BRCA1 などの脱ユビキチン化による基質安定化によって DDR 経路を制御している⁹⁻¹¹。また、BRCA1/2 の生殖細胞系列変異による HR 機構の破綻や、2-19% の MPM 患者において細胞周期やアポトーシスを制御する転写因子 p53 をコードする遺伝子である TP53 の変異が検出される^{12,13}。このような変異は、DNA 損傷応答を低下させ、DNA 損傷時においても細胞周期が停止せず、ゲノム不安定性の増大に寄与することが示唆されている。

また、環境的ストレスおよび遺伝的不安定性が誘導された細胞から、シグナル伝達経路の活性化やタンパク質の発現制御が変化した細胞が選択され、そのようなストレスに適応できるとともに腫瘍化の原因となることがある。アスベストの発がんメカニズムに、細胞分裂の際に染色体分配を障害することでゲノムの増幅・欠損および染色体転座を誘発するという機序が提唱されている¹⁴。このような、アスベスト誘発性のゲノム異常が引き起こされる遺伝子として、がん抑制遺伝子である cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) の欠損¹⁵や、がん遺伝子 KRAS の変異¹⁶などが挙げられる。CDKN2A がコードする p16^{INK4a} は、cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 を阻害し、retinoblastoma (Rb) タンパク質のリン酸化を抑制する。Rb は転写因子 E2F と結合し、その機能を抑制する制御因子であるが、Rb タンパク質がリン酸化されると E2F が遊離し、下流の転写活性が促進される。したがって、CDKN2A の欠損は Rb が制御する E2F による cyclin A/E や CDK2 などの転写活性を増大し、無秩序な細胞周期の進行を惹起する¹⁷⁻¹⁹。さらに、p14^{ARF} は p53 阻害作用を有する MDM2 の分解促進作用を担っており、CDKN2A のホモ接合型欠失を有する MPM 細胞では p53 の不活性化が認められている²⁰。また、KRAS のようながん遺伝子は MAP kinase/Erk 経路などの増殖シグナルを活性化させ、無秩序な DNA 複製を誘導し、DNA 複製ストレスを増大する²¹。これら DNA 複製ストレスの蓄積は細胞周期の停止を引き起こし、致死性の DNA 損傷が蓄積した細胞においては、細胞死が誘導される。一方、腫瘍細胞が分裂する中で、変異などによって DDR 系が活性化し、DNA 複製ストレスが抑制されることで生存/増殖するクローンを生じることがある。正常気道上皮細胞を用いた研究では、変異型 KRAS を強制発現させると複製ストレス増大によって高頻度に細胞死が誘導されるが、ataxia-telangiectasia and Rad3-related (ATR) が高発現し

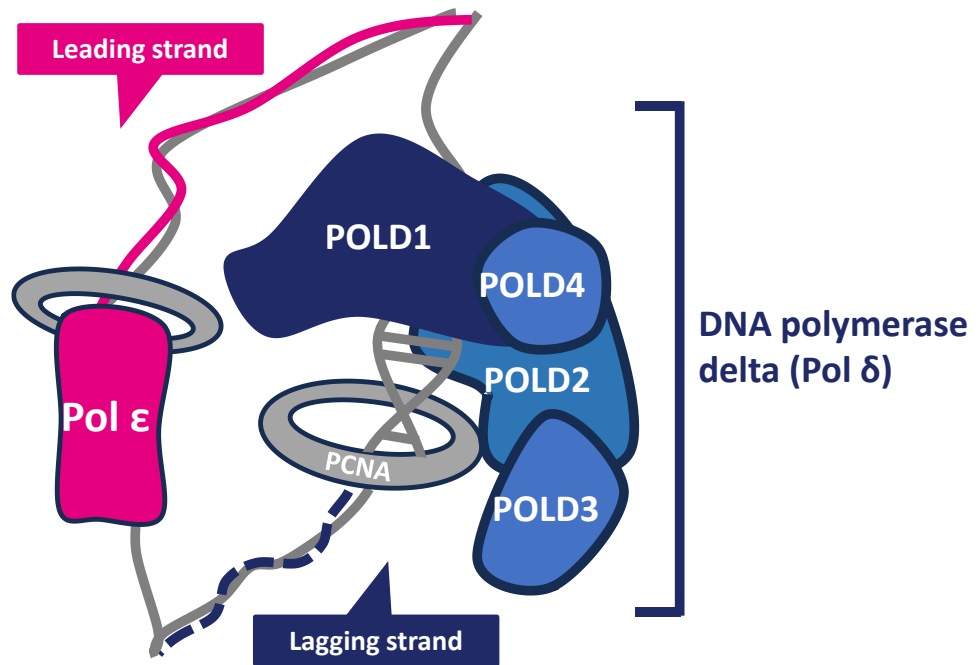


Figure 2. Model of DNA replication and structure of DNA polymerase delta (Pol δ) complex and DNA polymerase epsilon (Pol ϵ).

DNA replication is carried out by the DNA polymerase δ and ϵ . The leading strand are extended by Pol ϵ , and the lagging strand are extended by Pol δ .

たクローンが生存することが明らかとなった²²。したがって、DDR 因子を高発現した細胞が DNA 複製ストレス化で前がん細胞として選択され、腫瘍化に寄与すると考えられる。

以上の知見より、アスベスト由来の ROS による刺激や遺伝子変異によって複製ストレスが増大した環境下で、DDR 因子が発現増幅した中皮細胞が致死性の遺伝子異常に耐性を示すことで選択され、MPM の発症に繋がると考えられる。したがって、MPM 細胞において高発現した DDR 因子が恒常的な複製ストレスに適応させるとともに、MPM 患者の予後悪化に寄与していると仮説を立てた。そこで、複製ストレス下で多様な DDR 経路に関与し、正確な複製フォークの伸長に不可欠な機能を果たしている DNA polymerase delta (Pol δ) を新規治療標的候補として着目した。Pol δ は、塩基の伸長および 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する触媒サブユニットである DNA polymerase delta 1, catalytic subunit (POLD1; p125) および、構造サブユニットである POLD2, accessory subunit (p50)、POLD3, accessory subunit (p68) および、S 期におけるプロテアソーム分解を受け S 期後期～M 期に発現し、HR 活性に関与するとされる POLD4, accessory subunit (p12) からなるヘテロ 4 量体である²³。DNA 複製は、DNA polymerase α -プライマーゼ複合体によって合成されるプライマーを起点として増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA)-DNA polymerase epsilon (Pol ϵ) 複合体によってリーディング鎖が伸長される。対照的に、ラギング鎖の合成は不連続に行われ、PCNA-Pol δ 複合体によって不連続な岡崎フラグメントが生成される (Figure 2)。また、Pol δ は DNA 切断によって誘導される複製 (break-induced replication) 機構において切断された複製フォークやキャッ

プされていないテロメアなどにおける DNA 合成に関与し、相同染色体内の相補的配列をもとに切断部位の鋳型鎖を伸長することで、DNA 修復の起点として機能することが示唆されている²⁴。近年、様々ながん種において、Pol δ サブユニットをコードする遺伝子の変異やコピー数多型による遺伝子発現増幅、そして転写活性化によるタンパク質の発現増加が認められ、発症および悪性化に関与していることが示唆されている²⁵。一方で、Pol δ の MPM における機能およびその臨床における MPM 予後予測因子および治療標的分子としての可能性については明らかとされていない。著者は、アスベスト曝露より 20-50 年の長期間にわたる複製ストレスを受ける中で、一部の Pol δ を高発現した中皮細胞が、致死性の DNA 損傷を回避しながら生存／増殖することで、MPM の発症および予後の悪化に寄与しているのではないかと考えた。そこで本研究は、MPM に対する新規治療標的候補としての Pol δ の可能性を明らかとすることを目的に検討を実施した。

本論文では、Pol δ の触媒サブユニットである POLD1 を新規治療標的候補として見出し、その機能的解明と治療標的としての有効性について検討した結果を論述する。なお、本研究におけるフローチャートを Figure 3 に示した。

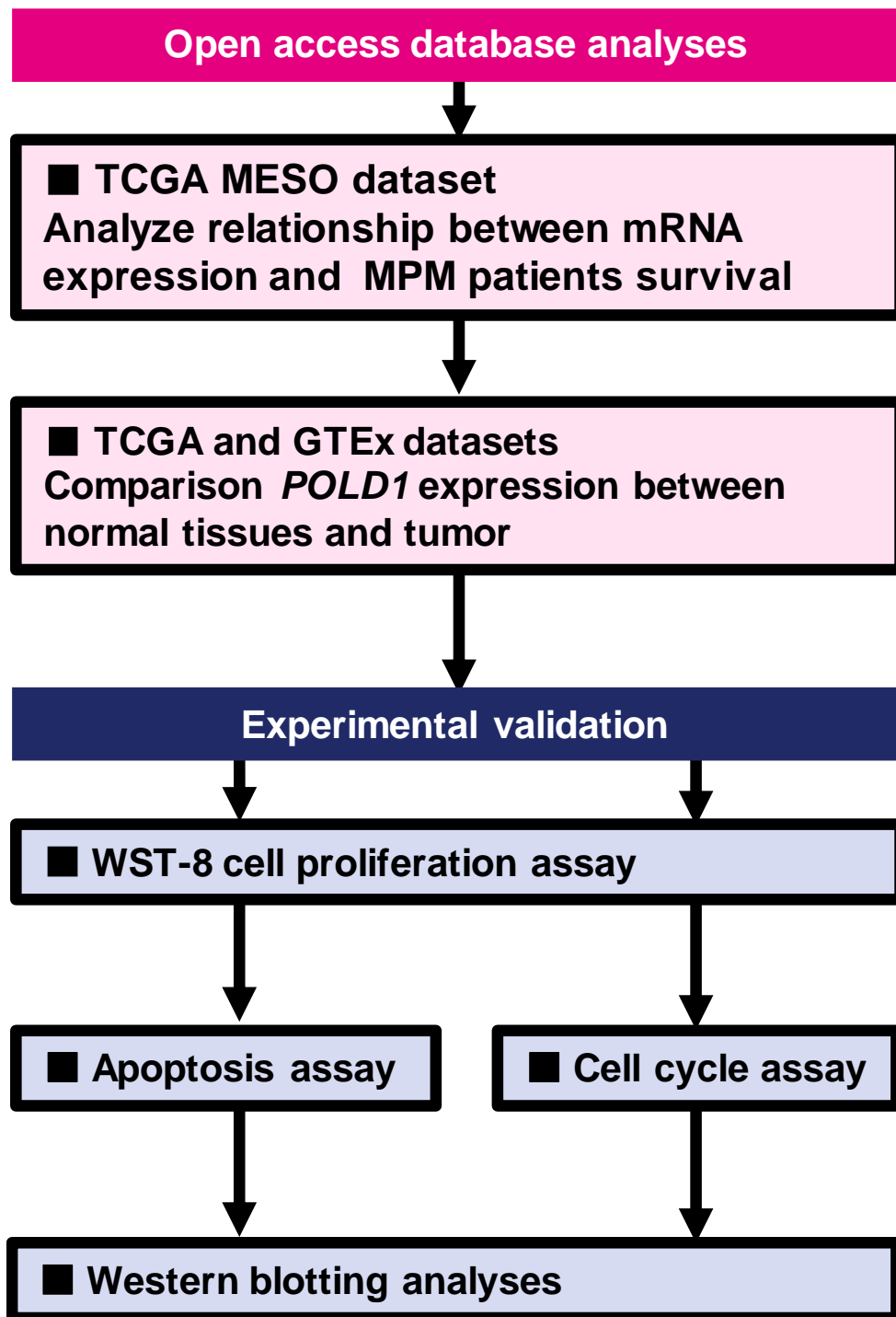


Figure 3. The study flow-chart.

First, we used TCGA and GTEx datasets to assess the possibility of pol δ for therapeutic target to MPM patients. Next, we performed the experimental validation to clarify the role of POLD1 in the cell cycle and apoptosis in MPM cell lines using siPOLD1. MPM: malignant pleural mesothelioma.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

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

第1節 緒言

近年、次世代シーケンサーの技術が向上し、がん患者の遺伝子検査が盛んに実施されるようになったことで、得られたゲノム情報がデータベース化され、がん研究者に新たな知見を提供している。なかでも、The Cancer Genome Atlas (TCGA) は米国国立研究所によって運営される公的基金プロジェクトであり、33のがん種、およそ20,000名のゲノムプロファイルが無償で公開している²⁶。TCGAを用いた研究によって、これまでに新たな予後予測マーカーや治療戦略が確立され、臨床現場に役立てられている。低悪性度神経芽腫に対する、遺伝子変異や染色体異常と臨床予後のクラスタリング解析によって *isocitrate dehydrogenase (IDH)*、*TP53* の変異と染色体の特定の領域の欠損 (1p/19q codeletion) が臨床的予後および組織学的診断結果と強い相関を示すことが明らかとなっている²⁷。低悪性度神経芽腫は予後良好なものから悪性膠芽腫へ進行する症例も存在し、従来の組織学的診断における病期分類は困難であった。しかし、ゲノムプロファイル解析によって確立された診断基準は、低悪性度神経芽腫の早期診断を可能にし、予後予測マーカーが確立された²⁸。また、胃がんに対する TCGA を用いた大規模プロファイリングによって、エプステイン-バーウイルス (EBV) 陽性、マイクロサテライト不安定性 (MSI)、ゲノム安定性、染色体不安定性の4つのサブタイプに分類されることが明らかとなった²⁹。なかでも、EBV 陽性および MSI 症例においては PD-L1/PD-L2 の発現増幅が高頻度に認められ、胃がんにおける ICI の有効性が高いことが示されている³⁰。染色体不安定性腫瘍は、上皮増殖因子受容体 (EGFR)、ERBB2 などのチロシンキナーゼ受容体をコードする遺伝子の増幅を伴うため抗 HER2 抗体 (トラスツズマブ) の治療効果が期待される³¹。一方で、ゲノム安定性症例は臨床的予後が最も悪いとされており、これらの腫瘍においては低分子 GTP タンパク質である RhoA が高頻度に発現増幅していることが TCGA のゲノム情報を用いたコホート研究より明らかとされている。これらの知見をもとに、胃がんにおける RhoA を治療標的とした細胞内分子メカニズムの解明が進められている^{32,33}。

このように、低悪性度神経芽腫では、TCGA より得られたゲノム情報が臨床的な生命予後と強く相関することが示されたことで、診断ガイドラインが見直され早期診断と予後予測が可能となった。また胃がんにおいては、分子標的療法に対する感受性を評価するバイオマーカーが確立し、有効性の高い治療を選択することが可能となったことで、がん患者の生命予後は改善しつつある。さらには、がん種を問わないゲノム情報の横断的研究によって既存の分子標的薬の適応拡大や、新規治療標的候補が見出されるなど、TCGA のようなオープンアクセスデータベースはがん研究の発展に寄与してきた。MPM は世界的にみても希少がんであるが、TCGA を用いることによって世界中より集められた MPM 患者由来のゲノム情報が取得可能である。著者は、MPM の発症および進行には、致死性のゲノム不安定性を修復する因子の発現増幅が不可欠であるとの仮説に基づき、発現量と生命予後悪化に相関がある DDR 因子を新規治療標的候補として見出すことが可能であると考えた。

本章では、POLDD1 が MPM に対する新規治療標的候補となり得るか明らかにすることを目的にオープンアクセスデータを用いて検討し、さらに、POLDD1 発現抑制が MPM 細胞の増殖を抑制するかを評価した。

第2節 実験方法

1. 公共データベースによる解析

MPM 患者組織由来 RNA-seq データは、The Cancer Genome Atlas (TCGA) mesothelioma (TCGA MESO) より参照した (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)。また、UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/>) を用い、TCGA MESO より抽出した 79 名の MPM 患者の mRNA 発現量を *POLD1-4* に関してそれぞれ高い順に並べ替え、*POLD1-4* すべてのターゲットにおいて偏りなく n 数を担保することができる中央値カットオフを用い、mRNA 発現量 High 群 (n=39) と Low 群 (n=40) に振り分けた。その後、全生存期間 (overall survival; OS) を Kaplan-Meier 法にて解析した。また、cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用い、TCGA MESO 収載患者の年齢、性別、UICC-TNM 病期分類に関する情報を抽出し、多変量解析を実施した。なお、MPM における病期分類は、壁側胸膜に腫瘍が限局する STAGE IA、臓側胸膜まで腫瘍が進展している STAGE IB、片側胸膜の腫瘍が横隔膜の筋層や肺に進展し、リンパ節転移や遠隔転移を認めない STAGE II、対側の胸膜に腫瘍が進展しており、リンパ節に転移があるが、切除可能である STAGE III、腫瘍が胸壁・縦隔・横隔膜下などに進展し、対側リンパ節や胸腔外に遠隔転移し切除不可である STAGE IV とした。転写産物の発現量を腫瘍組織と正常組織で比較するため、各腫瘍組織由来を RNA-seq データは TCGA より (n=6,634)、正常組織由来 RNA-seq データを Genotype-Tissue Expression (GTEx) (n=4,030) より抽出した。TCGA および GTEx より得られた RNA-seq データは、UCSC Xena を用いた Transcripts per million (TPM) 正規化法^{34,35}によって 100 万リードカウントあたりの転写産物長として補正し解析した。

2. 細胞培養

ヒト MPM 細胞株 MSTO-211H、NCI-H2052、NCI-H2452 細胞およびヒト肺線維芽細胞株 IMR-90、MRC-5 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) より購入した。また、ヒト MPM 細胞株 ACC-MESO-1、ACC-MESO-4、Y-MESO-14 細胞は RIKEN CELL BANK (茨城) より購入した。MPM 細胞株は、10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン) (FUJIFILM 和光純薬株式会社、大阪) を含む roswell park memorial institute (RPMI) 1640 (FUJIFILM 和光純薬株式会社) で培養した。ヒト肺線維芽細胞株は、10% 非働化 FBS (Thermo Fisher Scientific)、1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含む minimum essential medium α (MEM α) (FUJIFILM 和光純薬株式会社) で培養した。また、これらの細胞株は 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

3. ウェスタンブロット法による POLD1 タンパク質発現解析

培養したヒト MPM 細胞株およびヒト肺線維芽細胞株は Lysis 10 buffer で溶解 (4°C、20 分) した。溶解後、13000 × g、4°C で 20 分間遠心し、上清を whole lysate として回収した。回収したサンプルのタンパク質濃度を、Qubit Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific)、Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量し、2 µg/µL になるように Sample Buffer Solution

(FUJIFILM 和光純薬株式会社)、滅菌超純水と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。調製したサンプル 5 または 10 μ L を用いて、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) に 100 V、90 分間で転写した。非特異的結合を防止するため、PVDF 膜を 5% non-fat dry milk (NFDM; 雪印メグミルク株式会社、東京) でブロッキングした。なお、NFDM および BSA は tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (pH 8.0) で溶解した。その後、一次抗体および二次抗体を処置し、免疫反応性タンパク質に対応するバンドを ECL Western Blotting Detection Kit (Cytiva、東京) を用いて X 線フィルム (FUJIFILM) に感光させることにより検出した。二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギおよびマウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を使用した。内標準には GAPDH を用いた。なお、本実験では 1 次抗体として、anti-POLD1 (ab186407: abcam、Cambridge、UK)、anti-GAPDH (#2118: Cell Signaling Technology) を使用した。使用した 1 次抗体と 2 次抗体の情報については Table 1 に示した。

4. Small interfering RNA (siRNA) によるノックダウン

siRNA の非特異的なハイブリダイゼーションに起因するオフターゲット効果を考慮し、*POLD1* に対する siRNA は異なる 2 配列 (silencer select siRNA siPOLD1#1, #2) を使用して同様の表現型が得られることを確認した (Table 2)。ネガティブコントロール siRNA (siCtrl; #4390843) は Thermo Fisher Scientific 社より購入した。なお、siCtrl に関しては配列未公開である。購入した siRNA は Opti-MEM (Thermo fisher scientific) に溶解し、Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて最終濃度 5 nM となるようにフォワードトランスフェクションにて MPM 細胞株に処置した。siRNA を処置した MPM 細胞株は 48 時間後に回収し、mRNA およびタンパク質レベルでのノックダウン効率を、それぞれ quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法およびウェスタンブロット法によって評価した。

5. qRT-PCR によるノックダウン効率の評価

siPOLD1 および siCtrl を処置 48 時間後に NucleoSpin RNA kits (Macherey-Nagel, Dürer, Germany) を用いて全 RNA を抽出し、NanoDrop 2000 (Thermo fisher scientific) を用いて濃度測定を行った。続いて、ReverTra Ace qPCR RT kits (東洋紡、大阪) を用い、10 μ L 反応系に対して濃度測定した RNA 200 ng を鋳型 RNA として添加し、35°C、15 分の条件下で逆転写反応させ、complementary DNA (cDNA) を合成した。合成した cDNA を、Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR Master Mixes (Agilent, Santa Clara, CA, USA) および各プライマーと混合し、20 μ L 反応系にて Dice Real Time System II (タカラバイオ、滋賀) を用いて 40 サイクルの増幅反応を行った。*POLD1* 発現量は $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法によって定量し、内標準には *18S rRNA* を用いた。本実験で用いたプライマーの配列は Table 3 に示した。

6. WST-8 assay による siPOLDI の増殖抑制効果の検討

siRNA を用いて *POLD1* をノックダウンした際に得られる MPM 細胞に対する増殖抑制効果を評価するため、Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES, 熊本) を用いた WST-8 assay を実施した。ウェスタンブロット法により *POLD1* のノックダウンを確認した siRNA 処置後 48 時間時点にて、0.25w/v% トリプシン-1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 4Na 溶液 (FUJIFILM 和光純薬株式会社) で細胞を剥離し、96-well プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種しなおした。その際の播種濃度は、72 時間培養で WST-8 assay による吸光度に影響を与えない濃度を検討し、211H、MESO-1 および H2452 細胞は 500 cells/well、H2052 細胞は 800 cells/well、MESO-4 細胞は 1,000 cells/well、MESO-14 細胞は cells/well とした。その後、69 時間培養したのち、Cell Counting Kit-8 を 10 μ L/well で処置し、3 時間、37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。その後、マイクロプレートリーダー (GloMax: Promega, Madison, WI, USA) にて最大吸収波長 450 nm における吸光度を測定した。

7. 統計解析

TCGA MESO より抽出した MPM 患者における *POLD1-4* mRNA High 群および Low 群の生存曲線は Kaplan-Meier 法により作成し、Log rank 検定にて解析した。さらに、High 群および Low 群患者の年齢 (65 歳未満および 65 歳以上)、性別、病期分類に関して COX 比例ハザード回帰モデルを用いた多変量解析を実施した。正常組織および腫瘍組織における *POLD1* 発現量の比較は、Welch's *t*-test にて解析した。多重比較は一元配置分散分析 Bonferroni の多重比較検定を用いて行った。COX 比例ハザード回帰モデル解析は R version 4.3.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて行い、その他の統計解析は、GraphPad Prism 5 (Graphpad software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。なお、 $p < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

Table 1. Information of Antibody used for western blot.

Primary Ab	Primary Ab dilution	Secondary Ab	Secondary Ab dilution	Blocker	Molecular weight
anti-POLD1	1:3000	anti-rabbit IgG	1:5000	5% NFDM	124 kDa
anti-GAPDH	1:5000	anti-rabbit IgG	1:5000	5% NFDM	37 kDa

Table 2. Sequence information of siRNA.

Name	Sequences	
siPOLD1#1	Sense:	5'-AGAUGAUCGAGAAAACCAAtt-3'
	Antisense:	5'-UUGGUUUUCUGCAUCAUCUga-3'
siPOLD1#2	Sense:	5'-CCCUCAAGGUACAAACAUtt-3'
	Antisense:	5'-AAUGUUUGUACCUUGAGGGtc-3'

Table 3. Sequence information of primer used for qRT-PCR.

Target	Sequences	
<i>POLD1</i>	Forward:	5'-GTGAGCGCCAACTCCGTAT-3'
	Reverse:	5'-TCACCATACACCACCTTGGC-3'
<i>18S rRNA</i>	Forward:	5'-CCGATTGGATGGTTTAGTGAG-3'
	Reverse:	5'-AGTTCGACCGTCTTCTCAGC-3'

第3節 結果

1. 公共データベースによる Pol δ と悪性中皮腫患者の生命予後の相関解析

Pol δ における4つのサブユニット (p125; POLD1、p50; POLD2、p68; POLD3、p12; POLD4) の発現量と MPM 患者の生命予後に相関があるかを解析するために、TCGA に収載されている79名の MPM 患者の組織に由来する RNA-seq データセットを解析した (TCGA MESO)。データ解析には UCSC Xena (<https://xenabrowser.net/>) を用いて解析した結果、Pol δ の触媒サブユニットをコードする POLD1 の mRNA High 群の患者において有意に OS が短かった (OS 中央値: 385 日 vs 741 日, $p<0.001$)。一方、構造サブユニットをコードする POLD2 (OS 中央値: 434 日 vs 619 日, $p=0.076$) および POLD3 (OS 中央値: 536 日 vs 572 日, $p=0.83$) は発現量と OS の間に有意な相関はなかった。また、POLD4 に関しては mRNA Low 群において有意に OS が短かった (OS 中央値: 630 日 vs 469 日, $p=0.025$) (Figure 4)。

79名の TCGA MESO 収載患者が POLD1 High 群および Low 群で、性別、年齢 (65 歳未満/65 歳以上)、病期分類ごとにどのように分布しているかを明らかにするため、Table 4 にそれぞれの分類ごとの患者数を示した。COX 比例ハザード回帰モデルによって多変量解析を実施したところ、65 歳以上の高齢者、性別、ステージ分類はそれぞれ有意なリスク因子としては検出されなかった (Table 5)。

Table 4. Patient information included in TCGA MESO (n=79)

	Total (n=79)	<i>POLD1</i> expression	
		High (n=39)	Low (n=40)
≥ 65	38	22	24
<65	41	17	16
Male	65	34	31
Female	14	5	9
STAGE I	6	2	4
STAGE IA	2	1	1
STAGE IB	1	1	0
STAGE II	15	8	7
STAGE III	39	19	20
STAGE IV	16	8	8

Table 5. Multivariate analyses of risk factors contributing to shorter OS in MPM patients.

Characteristic	HR	95% CI	<i>p</i> -value
<i>POLD1</i> expression (Low/High)	0.39	0.23-0.66	<0.001
Age (≥ 65 / <65)	1.16	0.69-1.94	0.6
Sex (Male/Female)	0.69	0.35-1.36	0.3
STAGE (STAGE II/STAGE I)	0.56	0.21-1.54	0.3
(STAGE III/STAGE I)	0.57	0.23-1.46	0.2
(STAGE IV/STAGE I)	0.52	0.18-1.48	0.2

Multivariate analyses were performed using COX proportional hazards regression analysis. HR=Hazard Ratio, CI=Confidence interval.

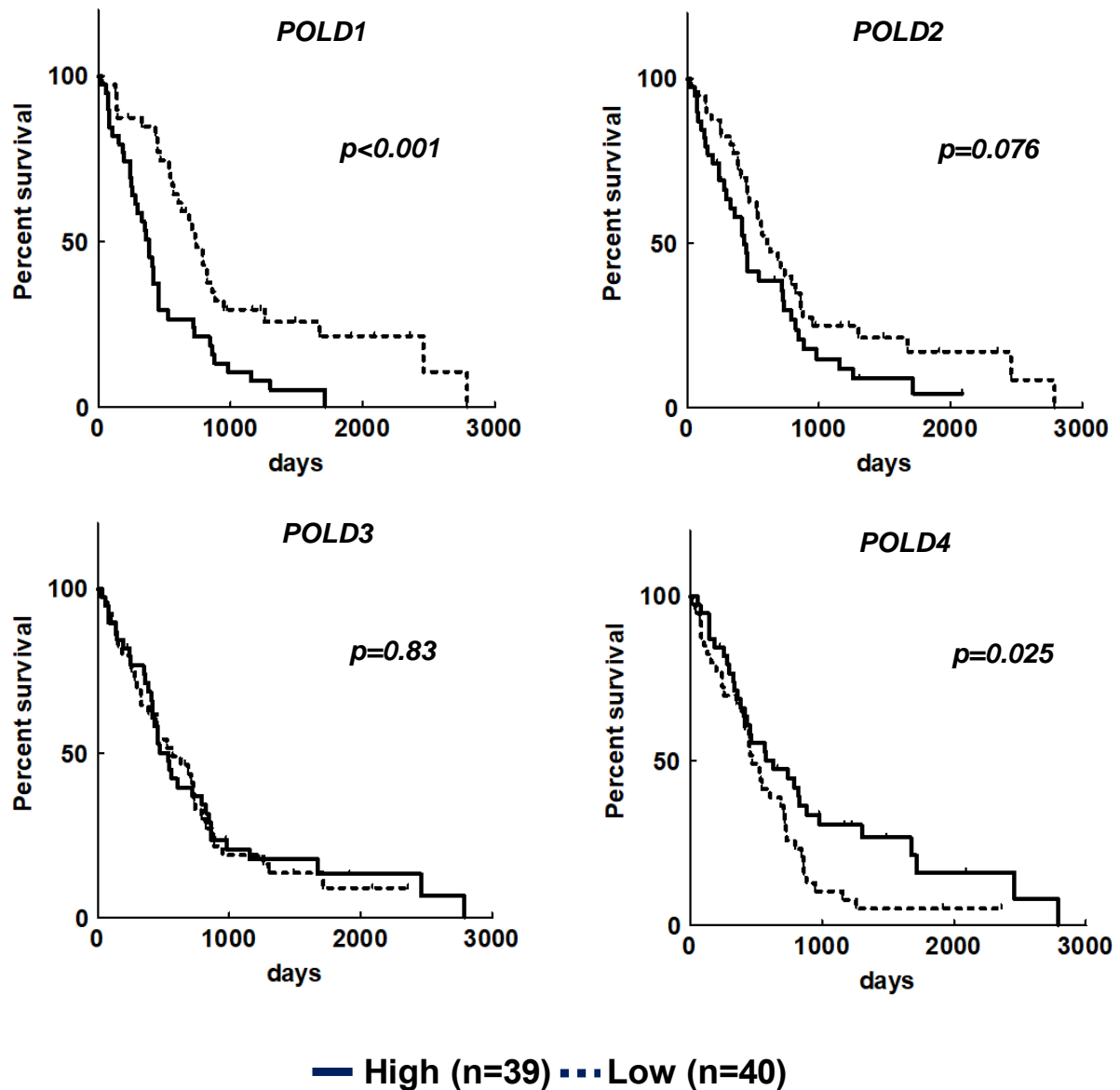


Figure 4. Kaplan-Meier survival analysis of the associations between the expression levels of *POLD1-4* and OS of mesothelioma patients.

To determine the clinical relevance of Pol δ , the potential association between *POLD1-4* expression levels and prognosis of patients with mesothelioma was assessed by Kaplan-Meier analysis. OS was found to be significantly lower in patients with high than low *POLD1* expression levels ($p < 0.001$, Log rank test)

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

2. 正常組織および腫瘍組織における *POLD1* 発現量比較

次に、TCGA に収載される 13 種類の固形腫瘍 (n=6,634) と GTEx に収載される正常組織 (n=4,030) における *POLD1* mRNA の発現量を比較した。その結果、前立腺および甲状腺を除くその他のすべての固形腫瘍において *POLD1* が高発現していることが明らかとなった (Figure 5)。

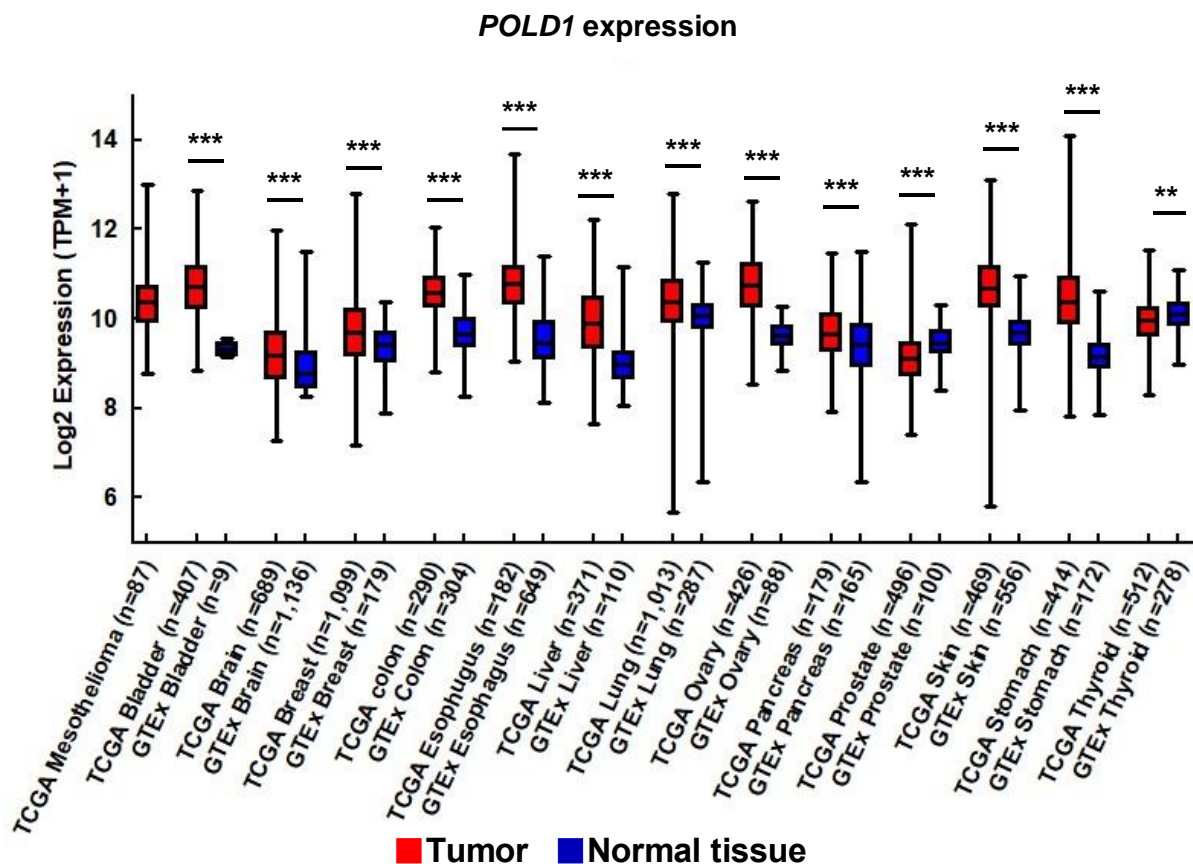


Figure 5. Comparison of *POLD1* mRNA expression levels in tumor samples and normal samples. *POLD1* expression levels were assessed using log2 (transcripts per million; TPM+1) and compared using Welch's *t*-test; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Shimizu, D., et al., *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

3. ウェスタンブロット法による正常細胞と MPM 細胞株の POLD1 発現量比較

続いて、正常細胞と MPM 細胞における POLD1 発現量を比較するため、正常肺繊維芽細胞 (IMR-90, MRC-5) と MPM 細胞株 6 株 (211H, H2052, MESO-1, H2452, MESO-4, MESO-14) よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法にて POLD1 タンパク質発現量を評価した。その結果、正常肺繊維芽細胞と比較し、MPM 細胞株において POLD1 を定義するバンドが顕著に濃く検出され、POLD1 が MPM 細胞株において過剰発現していることが示された。(Figure 6)

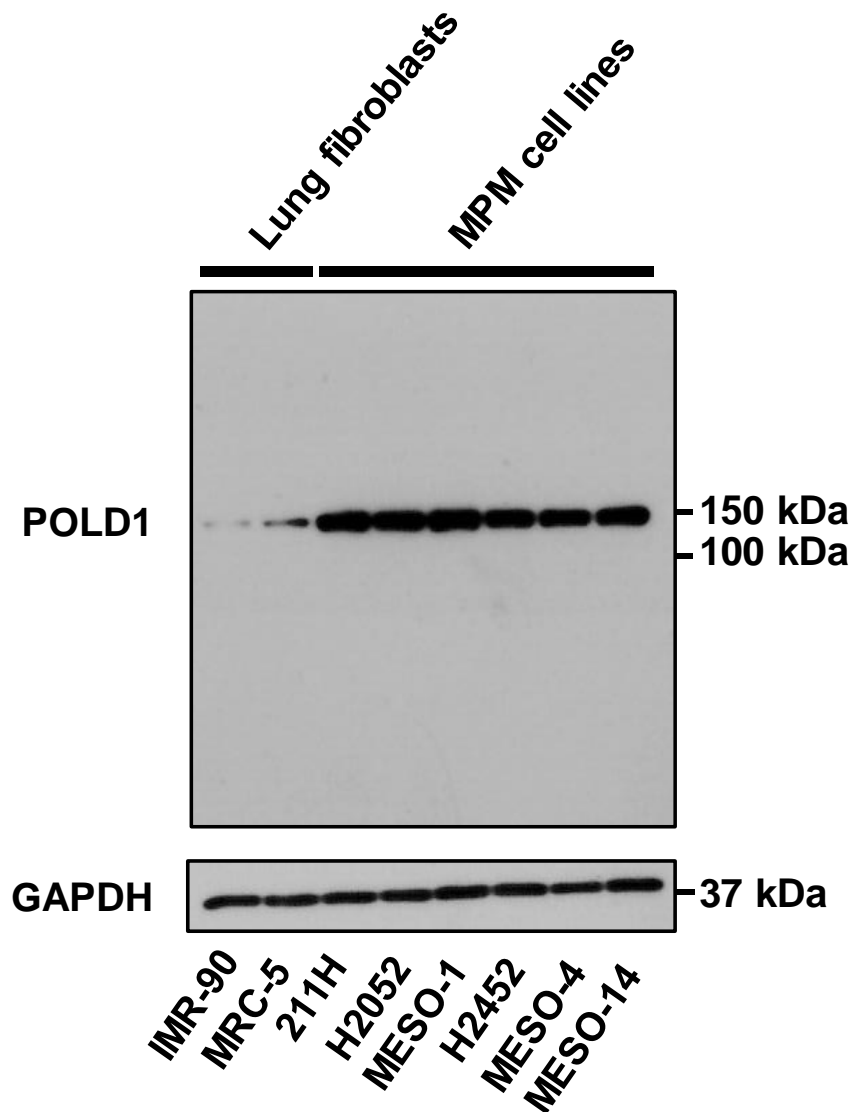


Figure 6. Comparison of POLD1 protein expression levels in normal lung fibroblast cells and MPM cell lines using western blotting.

Western blotting analysis showed that POLD1 levels were higher in MPM cell lines (211H, H2052, MESO-1, H2452, MESO-4, MESO-14) than in human normal lung fibroblasts (IMR-90, MRC-5).

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

4. siPOLDD1 によるノックダウン効率の検証

POLD1 発現抑制による MPM 細胞に対する増殖抑制効果を検討した。siPOLDD1 を 48 時間処置した MPM 細胞における *POLD1* mRNA 発現量は、いずれの細胞においても 30%未満であった (Figure 7A)。

また、タンパク質レベルにおいて POLD1 の発現量を評価したところ、siCtrl 群において検出された POLD1 に対応するバンドは、siPOLDD1#1 および#2 の 2 群のいずれにおいてもほぼ検出されなかった。これらことから、MPM 細胞に対して siPOLDD1 を処理することにより mRNA およびタンパク質レベルのいずれにおいても POLD1 の発現が十分にノックダウンされることが分かった (Figure 7B)。

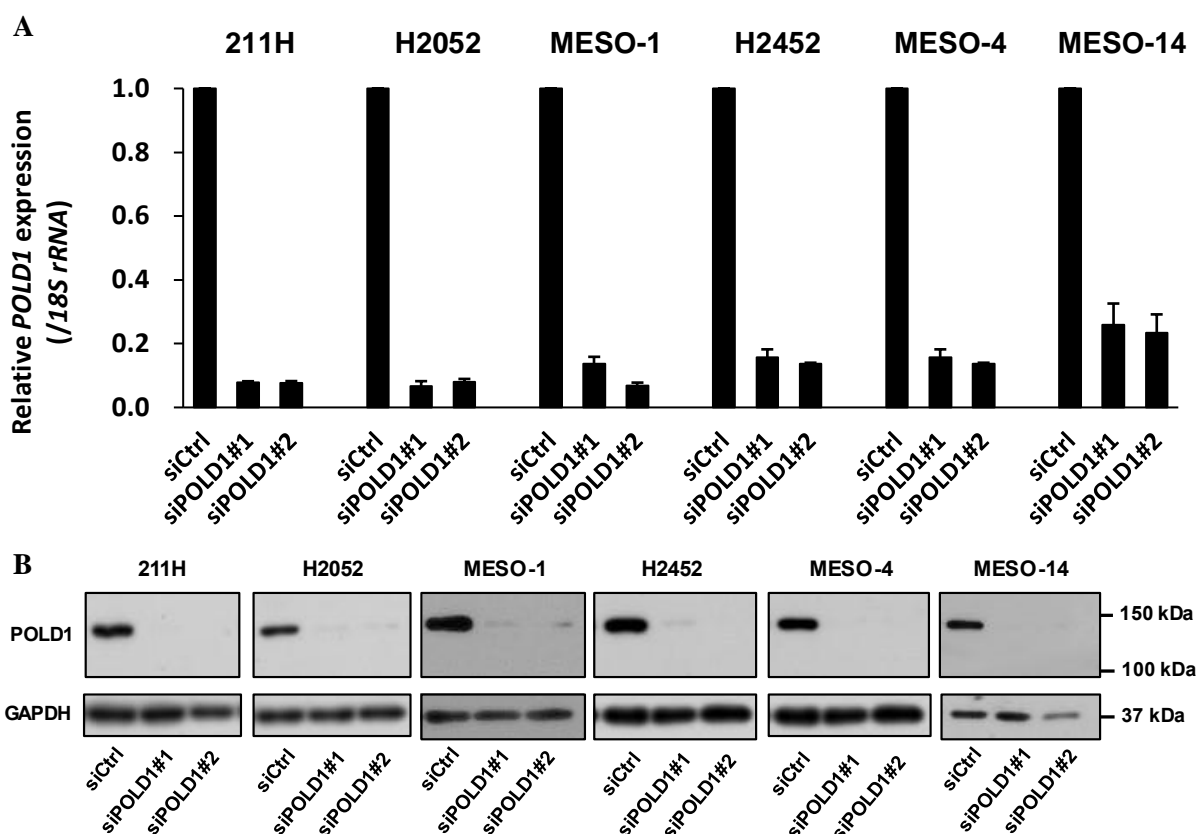


Figure 7. POLD1 knockdown using siRNA.

MPM cell lines were treated with 5 nM siRNA (siCtrl, siPOLDD1#1, or siPOLDD1#2) for 48 h. (A) Analysis of *POLD1* mRNA levels by qRT-PCR. *POLD1* expression was normalized to *18S rRNA* expression as an internal control, with relative expression levels calculated using $2^{-\Delta\Delta C_t}$ methods, and data are presented as mean+SE of three independent biological experiments, each with three technical replicate samples. (B) Analysis of POLD1 protein levels by western blotting. POLD1 levels were normalized to those of GAPDH. Results shown are representative of two independent biological experiments.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

5. POLD1 発現抑制による増殖抑制効果の検討 (WST-8 assay)

続いて、POLD1 発現抑制による MPM 細胞株 6 株に対する細胞増殖効果を評価した。その結果、siPOLD1 処置 120 時間後、211H、H2052、MESO-1、H2452 細胞株において siCtrl と比較し siPOLD1 または 2 のいずれの配列ともに細胞増殖率は有意に低かった (Figure 8)。一方、MESO-4 においては siPOLD1#1 のみ細胞増殖率が有意に低下し、MESO-14 においては siPOLD1 2 配列ともに siCtrl と比較して有意な変化はなかった。したがって、POLD1 は MPM 細胞の増殖に寄与することが明らかとなった。一方で、POLD1 発現抑制による増殖抑制に対する感受性は細胞株により異なること、さらに、siPOLD1 の配列の違いによっても増殖抑制効果には差異があることが明らかとなった。

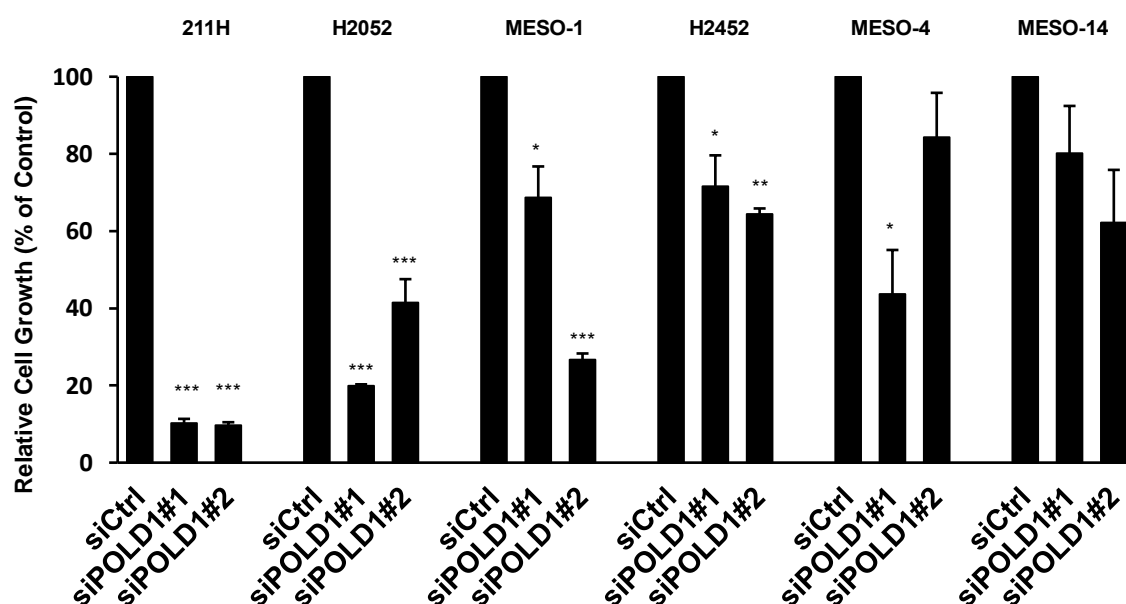


Figure 8. Cell proliferation assays on MPM cell lines using siRNA targeting POLD1.

Effect of siPOLD1 on the growth of MPM cells, as measured by WST-8 cell proliferation assays; results are presented as the growth rates of cells treated siPOLD1 relative to those of cells treated with siCtrl. WST-8 assay data are presented as mean + SE of three independent biological experiments, each with four technical replicate samples, and analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs siCtrl.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

第4節 考察

本章では、公共データベースを用いた解析によって、Pol δ の触媒サブユニットをコードする *POLD1* 高発現が MPM 患者の生命予後悪化と相関していることを明らかとした。さらに、MPM 細胞株では *POLD1* タンパク質が過剰発現し、*POLD1* を発現抑制することでいくつかの MPM 細胞株の増殖が抑制された。MPM を発症する中皮細胞は、アスベストが産生する ROS によって誘導される恒常的な DNA 損傷や、BAP1 をはじめとした多様な DNA 損傷修復因子の機能欠失型変異³⁶によって、DNA 複製ストレスが蓄積しやすい環境下にあると考えられる。アスベストによる ROS の産生は結果的に致死性の DNA 損傷を引き起こし、p53 や caspase-3/7 を介したアポトーシスが誘導される³⁷。しかしながら、アスベストによる恒常的な刺激を受けた中皮細胞においては変異やエピジェネティックな制御機構に変化が生じた細胞が存在し、DDR 因子の発現亢進によりゲノム不安定性に適応して生存／増殖するクローンが選択されることがある。第1章で明らかとした成績は、*POLD1* の過剰発現が、MPM の発症および進行に寄与していることを示唆するものである。

ヒトにおける Pol δ は触媒サブユニット *POLD1*/p125 と *POLD2*/p50 がコア構造を形成し、*POLD3*/p68 および *POLD4*/p12 が PCNA と相互作用する PIP-box を有し、酵素活性を上昇させる機能を有している³⁸⁻⁴⁰。したがって、Pol δ の機能維持にはコア構造として機能する触媒サブユニット *POLD1* が必須であり、*POLD1* による DNA 複製フォークの伸長および DNA 損傷修復機構の触媒機能が、TCGA MESO より得られた *POLD1* 高発現と MPM の予後悪化に寄与しているものと考えられる。一方、*POLD2* および *POLD3* の欠損は Pol δ 酵素活性を低下させ、さらに、S 期における DNA 鎖の切断部位を修復する機能が *POLD3* および *POLD4* のノックダウンによって減弱する^{41,42}。このような知見があるにも関わらず、TCGA による解析では *POLD2* および *POLD3* の発現と OS の短縮には有意な相関が認められなかった。したがって、MPM 細胞がアスベストや変異に起因する致死性の複製ストレスを回避し生存・増殖できるか決定づける要因として、*POLD2* および *POLD3* の発現量の寄与は *POLD1* と比較し少ないと考えられる。また、本研究では、*POLD4* の低発現が MPM 患者の生命予後を有意に短縮することが示された。ラギング鎖の伸長反応に *POLD4* は必ずしも必須ではないとされ、DNA 損傷応答によって *POLD4* は速やかにプロテアソーム分解され、Pol δ はヘテロ 3 量体として機能することが明らかとなっている^{43,44}。MPM 細胞集団において *POLD4* の発現が低く、細胞内のヘテロ 3 量体 Pol δ の割合が増加したクローンが、DNA 複製ストレスに対する耐性を示し、生存／増殖する可能性が示唆される。*POLD2-4* の発現量と MPM の悪性化への関与については未だ不明であり、今後 MPM における Pol δ の治療標的としての有効性を追究する上でさらなる検討が求められる。

本研究では、TCGA と GTEX の 2 つのオープンアクセスデータベースを用いた解析によって、*POLD1* が固形腫瘍において高頻度に発現増幅していることが明らかとなった。しかしながら、本解析は UCSC xena に収載されたゲノムプロファイルに基づき正規化した上での比較検討を実施したが、異なるデータベースからの RNA-seq データの比較はサンプルおよびデータの処理方法などの差異により、正確性に限界があることを加味しなければならない⁴⁵。さ

らに、GTEx をはじめとしたゲノムデータベースは、正常胸膜中皮細胞に関する情報が乏しいため、本研究では MPM 研究における正常細胞として使用される^{46,47} 肺線維芽細胞株 2 株 (IMR-90、MRC-5) を用いた評価を行った。今後、臨床検体を用いたさらなる情報の蓄積によって、正常中皮細胞に対する MPM 特異的な *POLD1* 発現制御機構について明らかとされることを期待する。

一方、The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) を用い、TCGA 収載の 17 のがん種について *POLD1* 発現と OS に関する横断的解析を実施したところ、MPM のほかに肝細胞癌も *POLD1* の高発現量が OS 短縮と有意に関連していた。肝細胞癌における研究ではすでに、細胞分裂における染色体分離に関与する centromere protein-F (CENPF) および FOX ファミリーに分類される転写因子である forkhead box M1 (FOXM1) が非腫瘍組織と比較して腫瘍組織においてもっとも上昇した遺伝子として挙げられ、これら遺伝子と共通して高発現する遺伝子として *POLD1* が見出されている⁴⁸。また、*POLD1* のプロモーター領域には p53 結合領域が存在し、p53 が *POLD1* の発現を抑制的に制御することが明らかとなっている⁴⁹ ほか、細胞周期制御において転写因子 E2F が *POLD1* の転写活性を促進することが明らかとなっている⁵⁰。本研究で使用した細胞株は MESO-14 を除く 5 株が *CDKN2A* を欠損しているため、*CDKN2A* がコードする p16^{INK4a} および p14^{ARF} 欠損による p53 の機能低下と E2F による転写活性が優位になったことが *POLD1* 過剰発現の要因の 1 つとして推察される。また *POLD1* は、DNA 損傷に応答しヒストンアルギニンメチルトランスフェラーゼの 1 種である protein arginine methyltransferase 7 (PRMT7) による抑制性の制御を受けることが認められているほか⁵¹、ヒストン脱アセチル化酵素である sirtuin 1 (SIRT1) によって発現上昇することが乳がん細胞において示されている⁵²。これらの知見より、エピジェネティックな制御機構が *POLD1* の過剰発現に関与していることが示唆される。*POLD1* の発現制御機構の解明によって、アスベストによる恒常的な刺激を受けた中皮細胞集団から MPM 細胞へとがん化する機序の解明や、MPM の予後悪化の要因を明らかとすることが期待される。また、*POLD1* 発現抑制に対する増殖抑制効果が MPM 細胞株によって差異があった。第 2 章において MPM 細胞株における *POLD1* の生理的機能について明らかとするとともに、*POLD1* 発現抑制に対する感受性に影響をおよぼす要因について考察を加える。

第 5 節 小括

本章では、公共データベースによる POLD1 の発現と MPM 患者の予後の相関解析および、POLD1 発現抑制による MPM 細胞の増殖抑制効果の検討によって、以下のような結果を得た。

1. MPM 患者における POLD1 高発現患者群は低発現患者群と比較して OS が有意に短かった。
2. 正常肺線維芽細胞と比較し MPM 細胞では POLD1 が過剰発現していた。
3. POLD1 発現抑制によって MPM 細胞株の増殖が抑制された。

以上のことから、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 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節 緒言

第1章では Pol δ の触媒サブユニットをコードする遺伝子である *POLD1* の高発現が MPM 患者の全生存期間 (OS) 短縮と有意に相関していることを明らかにした。さらに、*POLD1* 発現抑制が MPM 細胞に対して増殖抑制効果を示したことから、*POLD1* が MPM に対する新規治療標的候補となることが示唆された。

続く第2章では、*POLD1* 発現抑制が MPM に対する抗腫瘍効果を示すメカニズムについて解明する。Pol δ の触媒サブユニットである *POLD1* は、DNA 複製における伸長と修復の2つのプロセスにおいて重要な機能を有していることが明らかとなっている⁵³。一般的に、内因性の DNA 複製ストレスのほとんどは、1本鎖 DNA の切断カリボヌクレオシド 3 リン酸 (ribonucleotide triphosphate; rNTP) の誤取り込みに由来する。これらのエラーは、塩基除去修復、ヌクレオチド除去修復、DNA ミスマッチ修復によって修復される。損傷がさらに進行した場合、より致死性の高い DNA2 本鎖切断 (DNA double-strand break; DSB) が生じるが、この場合、相同組換え修復 (HR) か、姉妹 DNA 配列を必要としない即時的な修復機構である非相同末端結合 (NHEJ) によって修復される。これまでの機能的解明によって Pol δ はこれらの修復機構すべてに関与していることが明らかとなっている^{41,54}。したがって、*POLD1* 発現抑制による増殖抑制は、DNA 損傷修復の破綻に起因する細胞周期の停止と、細胞死の誘導を反映しているものと仮説を立てた。

DNA 複製時の DNA 損傷に対しては、ATM-Chk2 経路と ATR-Chk1 経路が DNA 複製ストレス応答経路として活性化し、細胞周期の停止や致死性の DNA 損傷に対するアポトーシスが誘導される。主に、DSB に対しては、ATM がセンサーとして機能し、下流の Chk2 および p53 のリン酸化カスケードを活性化することで細胞周期が G₁ 期または S 期のチェックポイントにて停止する⁵⁵。一方、1本鎖切断に対しては ATR-Chk1 経路優位のキナーゼが活性化し、細胞周期が G₂/M チェックポイントにて停止する。しかしながら、実際にはこれら双方の経路が複雑に相互作用することで損傷修復機構が活性化することが明らかとなっており⁵⁶、MPM における複製ストレス応答経路に関する知見は乏しいのが現状である。

本章では、*POLD1* 発現抑制が細胞増殖を抑制する機構として細胞周期およびアポトーシスに焦点をあて、MPM 細胞における *POLD1* の機能的解明を行う。さらに、DNA 損傷の蓄積および ATM-Chk2 経路の活性評価より得られた結果に基づき、*POLD1* 発現抑制が MPM 細胞の増殖および生存におよぼす影響および新規治療標的候補分子としての展望について考察し論述する。

第2節 実験方法

1. 細胞培養

第1章と同様のMPM細胞株(MSTO-211H、NCI-H2052、ACC-MESO-1、NCI-H2452、ACC-MESO-4、ACC-MESO-14)を用い、同条件下で培養した。

2. ヨウ化プロピジウム (PI) 染色法を用いた細胞周期解析

細胞周期への影響においては、ヨウ化プロピジウム(propidium iodide; PI, 富士フィルム和光純薬)を用いて染色を行い、flow cytometry (FCM) 法にて評価した。MPM細胞株を60 mm ディッシュに播種し、24時間培養した後に、siRNAを最終濃度5 nMとなるように処置した。48時間後に細胞を回収し、 Mg^{2+} および Ca^{2+} 不含のphosphate-buffered saline (PBS) (-)にて洗浄後、 $-20^{\circ}C$ に冷却した70%エタノール2 mLを用いて細胞固定し、 $-20^{\circ}C$ 冷凍庫で12時間以上保存した。FCM法による解析当日においては、70%エタノールを除去後、最終濃度20 ng/mL PIおよび100 μ g/mL RNase (Sigma Aldrich)を含むPBS (-)にて染色(室温、30分、遮光)し、BD FACSDiva software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を搭載したBD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)を使用して分析した。得られた結果は、FlowJo version 10 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA)にプログラムされたWatson Pragmatic アルゴリズム⁵⁷によってG₁期およびG₂/M期のピークを正規分布と仮定し、それぞれの平均値とピーク幅よりS期との境界点を近似することにより算出した。

3. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)パルス染色法を用いたS期細胞の検出

MPM細胞株を播種し、24時間培養した後に、siRNAを最終濃度5 nMとなるように処置した。47.5時間培養後、細胞を10 μ M BrdUで30分間標識し、70%エタノールで固定し、 $-20^{\circ}C$ で24時間以上保存した。細胞を2 M 塩酸で室温にて30分間処理し、続いて0.1 M 四ホウ酸ナトリウム pH8.5 で10分間処理した。その後、PBSで1回洗浄し、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗BrdU抗体(364103; BioLegend, San Diego, CA, USA)で30分間インキュベートし、1回洗浄した後、最終濃度5 μ g/mLのPIを含むPBS (-)に再懸濁しDNAを染色した。FITCおよびPIの蛍光強度は、第2節2項と同様にFCMで評価した。

4. Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci) 導入 H2052 細胞による細胞周期解析

G₁期特異的に発現するCdt1 (Cdc10 dependent transcript 1) およびS期からM期にかけて特異的に発現するGemininに対して、それぞれ緑色(monomeric Azami-Green1; mAG1)とオレンジ色(monomeric Kusabira-Orange2; mKO2) 蛍光タンパク質を融合し、それらを安定的に共発現させるベクター⁵⁸を導入したH2052細胞株(H2052-Fucci)を樹立した。H2052-Fucci細胞を60 mm ディッシュに播種し、24時間培養後、siRNAを最終濃度5 nMとなるように処置した。さらに24時間培養後、BD FACSJazz (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を用いてそれぞれのsiRNA処置群におけるGeminin非発現細胞を 5.0×10^4 個回収し、1500 rpmで遠心したのち、

10% FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有 RPMI-1640 に懸濁し、6-well プレート (Thermo Fisher Scientific) に播種しなおした。その後、6、12、18 時間培養したのち、再び BD FACSJazz™にて Cdt1 および Geminin の発現レベルを分析した。得られた結果は、FlowJo version 10 software を用いて解析した。

5. POLD1 発現抑制によるアポトーシス解析

siPOLD1 により誘導されるアポトーシスの解析は、eBioscience Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて FCM 法にて評価した。6-well プレートに、MPM 細胞株を播種し、24 時間後に siRNA を最終濃度 5 nM となるように処置した。120 時間後に細胞を回収し、PBS (-) にて洗浄後、本キットのプロトコルに従って染色し、BD FACSDiva software (BD Bioscience) を搭載した BD LSRFortessa を使用して第 2 節 2 項と同様に解析した。

6. ウェスタンブロット法による ATM-Chk2-p53 経路の活性評価

MPM 細胞株 (211H、H2052、MESO-1) を 60 mm ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に播種し、24 時間後に siRNA を最終濃度 5 nM となるように処置した。phospho-Histone H2A.X (γ H2A.X) の検出は 120 時間後に、ATM、Chk2、p53 の活性の評価には 24 時間後に Lysis 10 buffer で溶解 (4°C、20 分) したサンプルを使用した。調製したサンプルは、第 1 章第 2 節 3 項と同様に泳動、転写を行った。非特異的結合を防止するため、PVDF 膜を 5% NFDM、5% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA: FUJIFILM 和光純薬株式会社) または Blocking one-P (ナカライテスク) 中でブロッキングした。なお、NFDM および BSA は TBS-Tween 20 (pH 8.0) で溶解した。続いて、第 1 章第 2 節 3 項と同様の操作で X 線フィルムを用いてバンドを検出した。内標準には GAPDH および vinculin を用いた。この実験では 1 次抗体として、anti-POLD1 (ab186407: abcam)、anti-phospho histone H2A.X (05-636, Millipore Merck, Burlington, MA, USA)、anti-Vinculin (sc-73614: Santa Cruz Biotechnology)、anti-phospho ATM (Ser1981) (#5883: Cell Signaling Technology)、Anti-ATM (#2873: Cell Signaling Technology)、anti-phospho Chk2 (Thr68) (#2197: Cell Signaling Technology)、anti-Chk2 (sc-5278: Santa Cruz Biotechnology)、anti-phospho p53 (Ser20) (#9287: Cell Signaling Technology) および anti-p53 (sc-126: Santa Cruz Biotechnology) を使用した。なお、使用した 1 次抗体および 2 次抗体の情報は Table 6 に示した。

7. 統計解析

多重比較は一元配置分散分析 Bonferroni の多重比較検定を用いて行った。解析は、GraphPad Prism 5 を用いて行った。なお、 $p < 0.05$ を統計的に有意と判定した。

Table 6. Information of antibodies used for western blot.

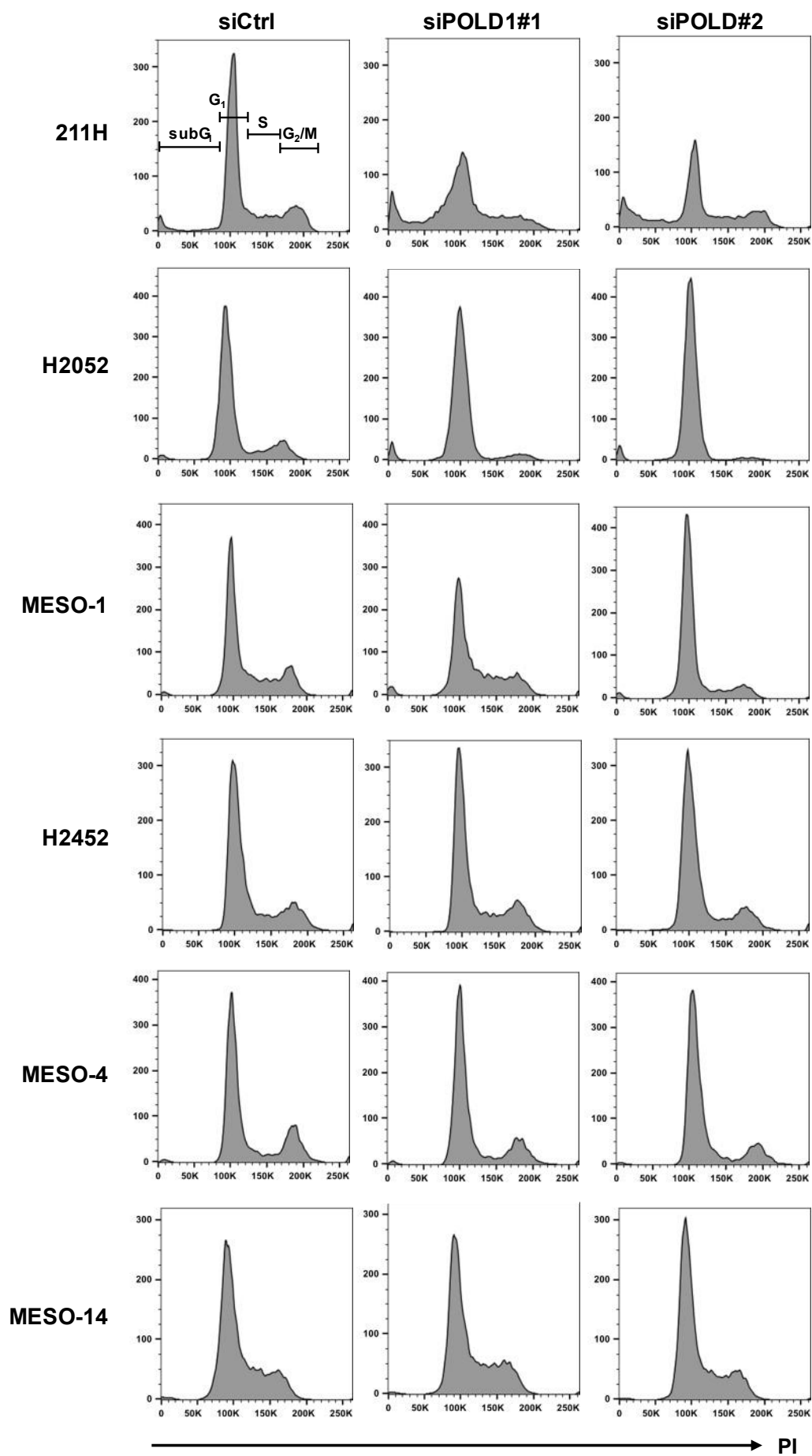
Primary Ab	Primary Ab dilution	Secondary Ab	Secondary Ab dilution	Blocker	Molecular weight
anti-POLD1	1:3000	anti-rabbit IgG	1:5000	5% NFDM	124 kDa
anti-phospho histone H2A.X (Ser139)	1:1000	anti-mouse IgG	1:10000	Blocking one-P	17 kDa
Anti-Vinculin	1:1000	anti-mouse IgG	1:5000	5% NFDM	117 kDa
Anti-phospho ATM (Ser1981)	1:1000	anti-rabbit IgG	1:2000	Blocking one-P	350 kDa
Anti-phospho ATM	1:1000	anti-rabbit IgG	1:5000	5% BSA	350 kDa
Anti-phospho Chk2 (Thr68)	1:1000	anti-rabbit IgG	1:10000	Blocking one-P	62 kDa
Chk2	1:500	anti-mouse IgG	1:5000	5% BSA	62 kDa
Anti-phospho p53 (Ser20)	1:1000	anti-rabbit IgG	1:10000	Blocking one-P	53 kDa
p53	1:1000	anti-mouse IgG	1:5000	5% NFDM	53 kDa
Anti-GAPDH	1:5000	anti-rabbit IgG	1:5000	5% NFDM	37 kDa

第3節 結果

1. ヨウ化プロピジウム (PI) 染色法を用いた細胞周期解析

第1章において、**POLD1** 発現抑制が **MPM** 細胞株の増殖を抑制することを明らかとしたことから、その機序を明らかとするため細胞周期解析を実施した。その結果、**siPOLD1** 処置された **211H** 細胞において **siPOLD1#1**、**#2** ともに **subG₁** 期の細胞割合が有意に増加した。一方で、**H2052** 細胞、**MESO-4** 細胞においては **siPOLD1#1**、**#2** 処置群ともに **G₁** 期の細胞割合が有意に増加し、**MESO-1** 細胞および **H2452** 細胞においては **siPOLD1#2** のみ有意な **G₁** 期細胞の蓄積が観察された (Figure 9A、B)。したがって、**MPM** 細胞では **POLD1** 発現抑制によって、細胞死または **G₁** 期細胞の蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、**siPOLD1** の配列によって、**G₁** 期細胞の蓄積割合には差異が生じた。

A



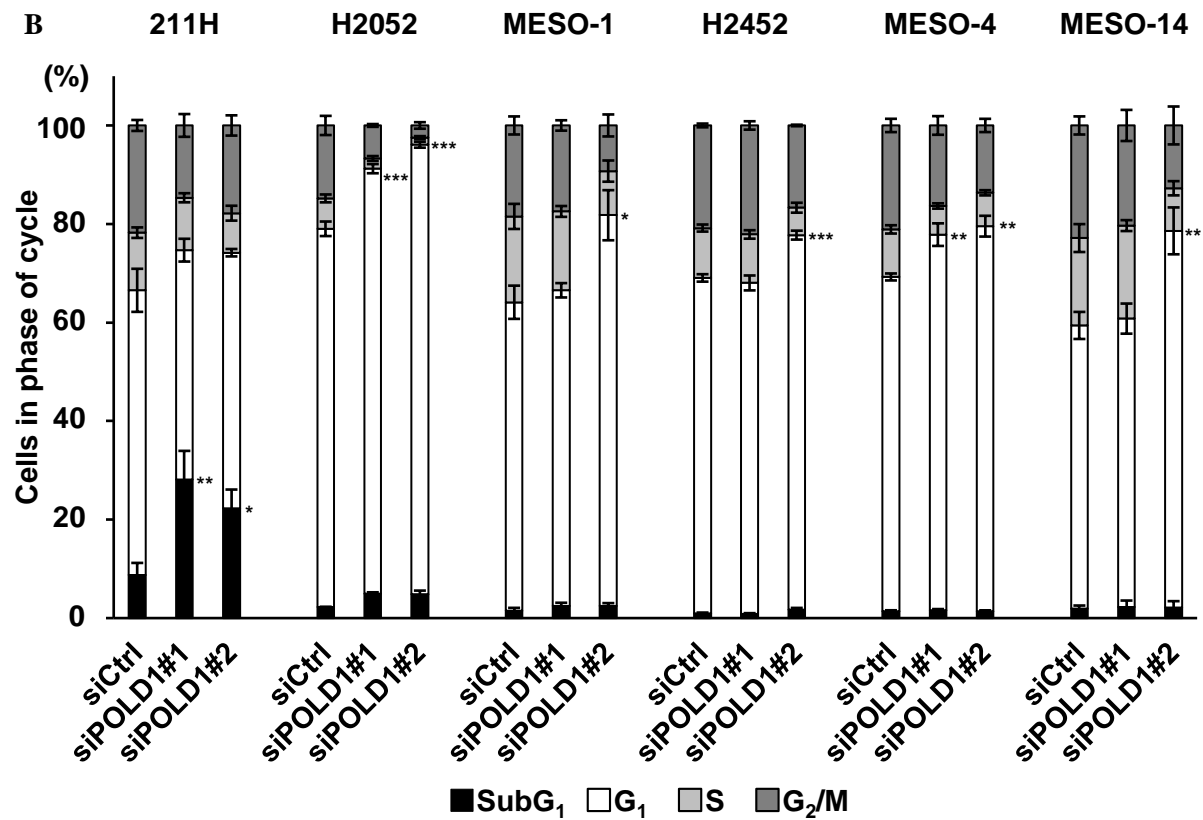


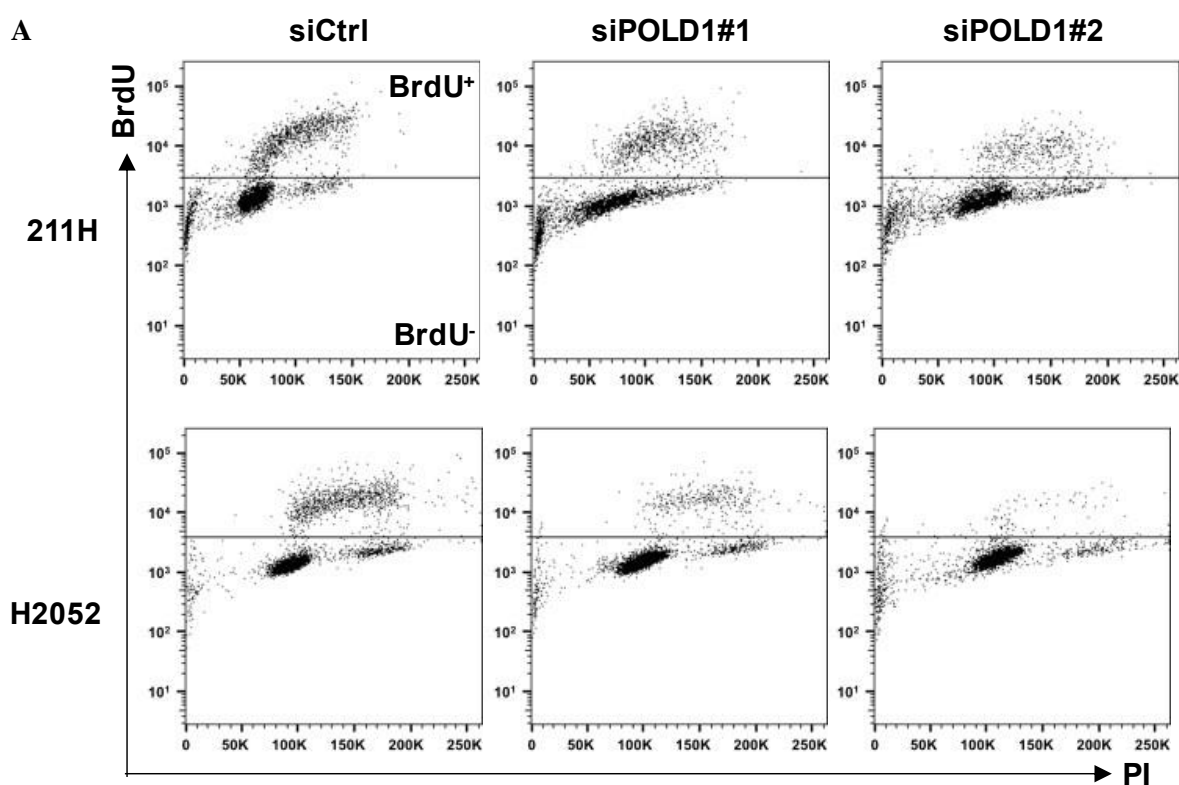
Figure 9. POLD1 depletion induces subG₁ and G₁ accumulation.

(A) Propidium iodide (PI) staining of MPM cells after treatment with siPOLD1 for 48 h. Histograms shown are representative of three independent biological experiments. (B) Quantitation of the numbers of cells in subG₁, G₁, S, and G₂/M phases of the cell cycle. Results are presented as the mean±SD of three independent biological experiments.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

2. BrdU パルス染色法を用いた S 期細胞の検出

PI 染色による細胞周期解析の結果、POLD1 発現抑制によって 211H 細胞株については subG₁ 期、その他の細胞株については G₁ 期の細胞が蓄積することが明らかとなった。続いて、単位時間あたりの S 期における DNA 複製反応の活性を評価するため、30 分間 BrdU パルス染色した 211H および H2052 細胞を FCM にて解析した。その結果、211H および H2052 細胞共に siPOLD1 処置群の BrdU 陽性細胞の割合が siCtrl 群と比して有意に少なく、POLD1 発現抑制によって S 期における DNA 複製反応が抑制されていることが示された (Figure 10A、B)。第 1 項で示したように、siPOLD1 処理によって G₁ 期細胞の有意な蓄積が検出されなかった 211H 細胞は、S 期における DNA 複製量の減少による増殖停止および細胞死が誘導されていることが示唆された。



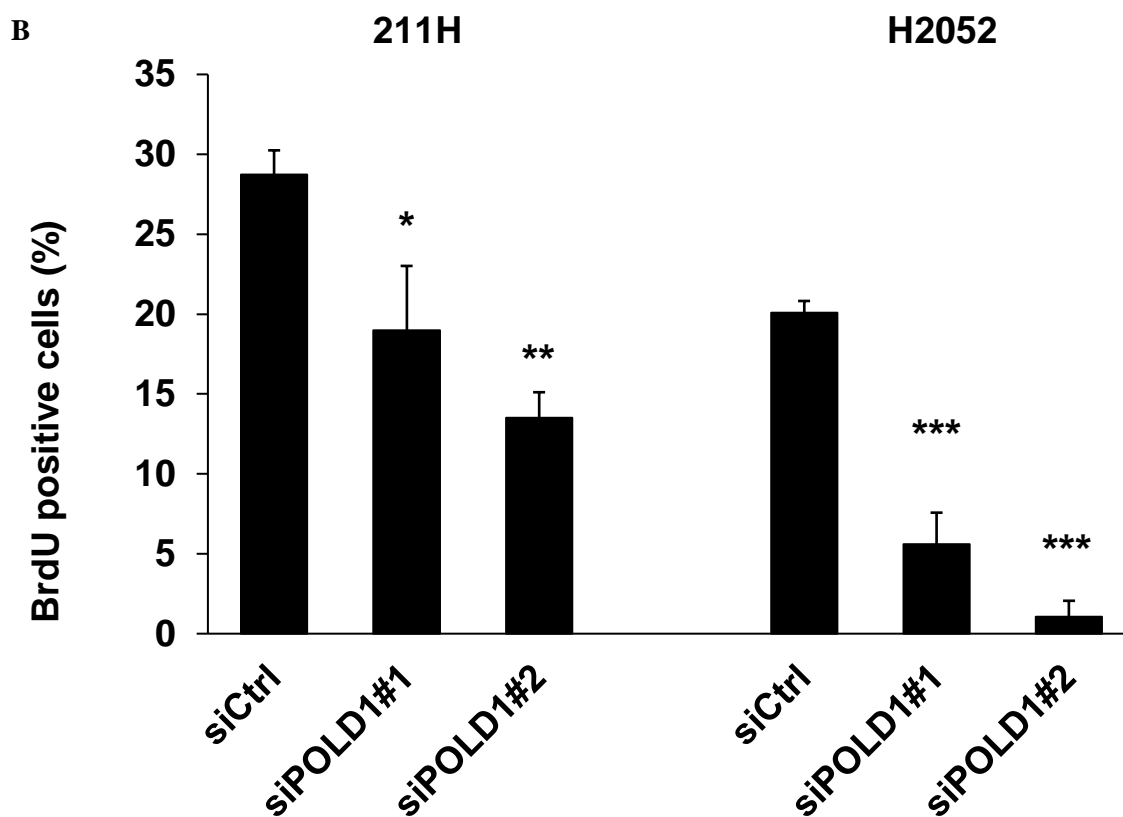


Figure 10. Flow cytometric analyses using BrdU labeled cells.

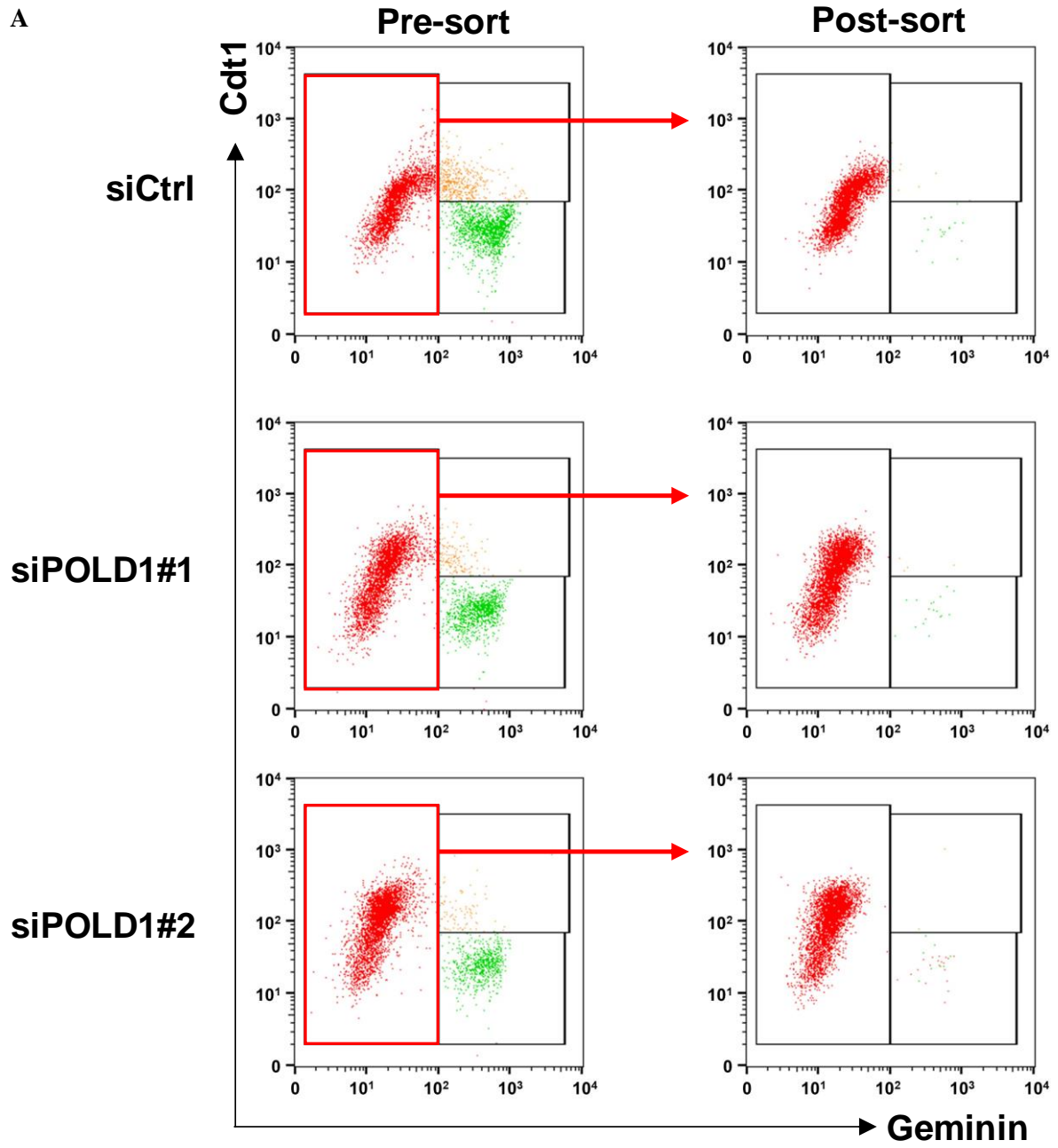
(A) Flow cytometric analysis of BrdU labeled cells, as determined by FITC-conjugated -BrdU mAb. BrdU positive cells were defined as cells above on the line shown in the dot-plot graphs. (B) Quantitation of the numbers of FITC positive cells. Results are presented as the mean + SD of three independent biological experiments and analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's correction; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs siCtrl.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

3. Fucci 導入 H2052 を用いた細胞周期解析

POLD1 発現抑制による細胞周期への影響が G₁ 期および S 期のどちらのチェックポイントに依存するのか H2052-Fucci 細胞株を用いて評価した。Cdt1 は、G₁ 期に複製開始点に局在し、一度複製された DNA が再複製されないように制御しており、S 期に入るとユビキチン-プロテアソーム系により分解される。Geminin は、S 期に一度複製が開始された配列への複製制御因子の再結合を阻害する機能を有しており、M 期から G₁ 期にかけてユビキチン-プロテアソーム系により分解される。したがって、Geminin 陰性細胞を S 期進行前の G₁ 期細胞、Cdt1 陽性/Geminin 陽性細胞を G₁ 期後半および S 期前半細胞、Cdt1 陰性/Geminin 陽性細胞を S 期後半から M 期細胞であると定義し、Geminin 陰性細胞をソーティングにて分取した (Figure 11A)。分取した細胞を培養 6、12、18 時間経過時点で解析した結果、siCtrl においては、ソーティング後 6 時間から 12 時間にかけて Geminin 陽性細胞が増加し、12 時間から 18 時間にかけて Cdt1 が減少するとともに Geminin 陰性分画に Cdt1 低発現の細胞集団が検出された。したがって、siCtrl 処置群は S 期に進行したことで複製制御因子である Geminin を発現した細胞が増加し、12 時間から 18 時間にかけて M 期の細胞分裂を経て再び G₁ 期に入った細胞が徐々に増加した。一方で、siPOLD1 処置細胞においては 2 配列いずれにおいても Geminin 陽性細胞が増加せずソーティング後 18 時間経過時点であっても Geminin 陰性/Cdt1 高発現の細胞集団が蓄積した。本結果は、複製開始に伴う Cdt1 のユビキチン-プロテアソーム系での分解が H2052 細胞では引き起こされなかったことを示しており、POLD1 の発現抑制によって H2052 細胞の G₁ 期での細胞周期停止が引き起こされることが明らかとなった (Figure 11B)。

A



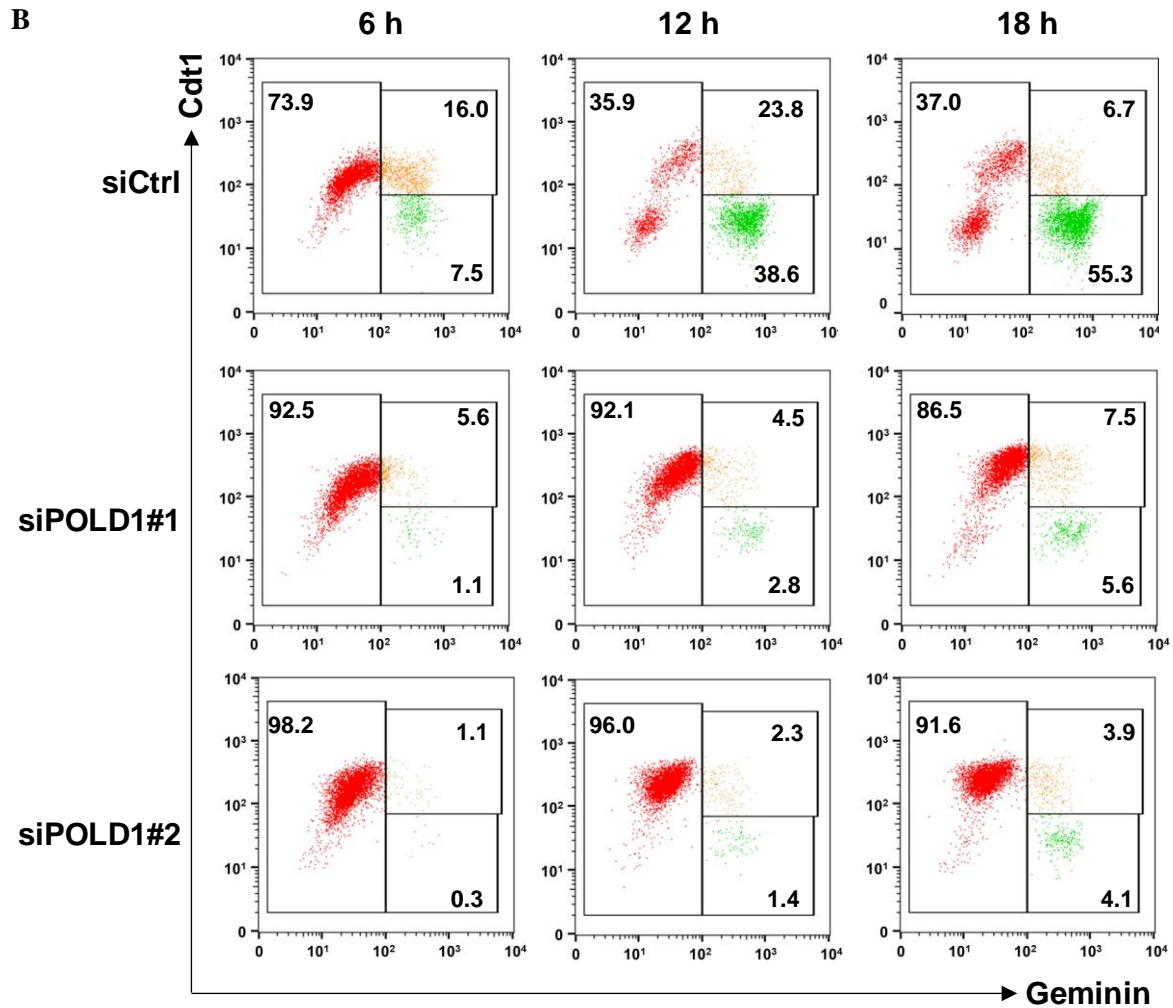


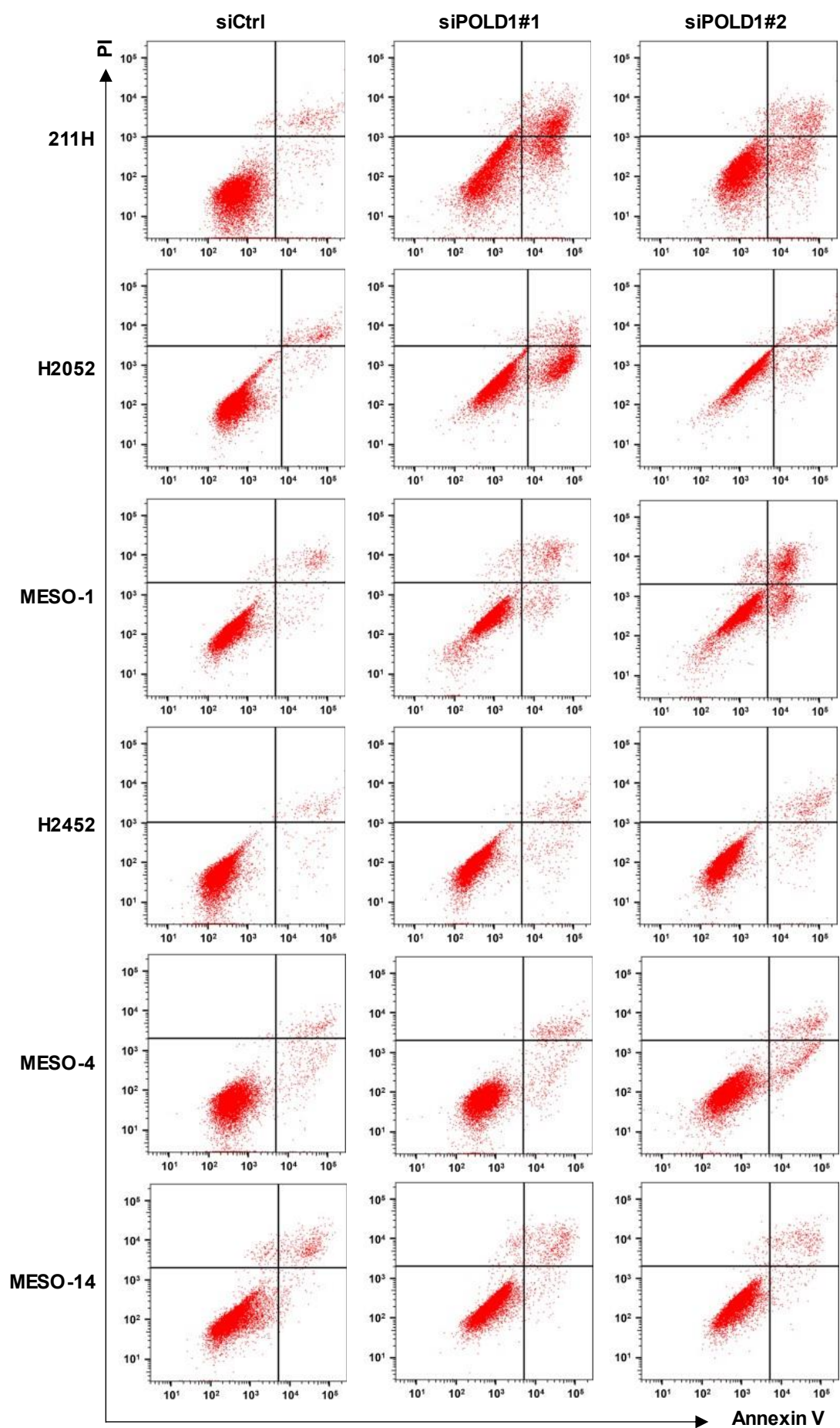
Figure 11. Cell cycle analysis using H2052-Fucci cell line.

Genimin negative fraction was defined as G₁ phase (shown as red dots), Genimin positive/Cdt1 positive fraction was defined as G₁ or early-S phase (shown as orange dots), and Genimin positive/Cdt1 negative fraction was defined as late-S or G₂/M phase (shown as green dots). (A) Genimin negative cells were sorted using FACSJazz™ after 24 h siRNA treatment. (B) siPOLD1 treatment resulted in noticeably decrease in cells from S phase to M phase. The numbers in the dot-plot graph present the frequency (%) of each fraction.

4. POLD1 発現抑制によるアポトーシス解析

ここまで、POLD1 の発現抑制が 48 時間までに 211H 細胞に細胞死を誘導し、その他の細胞株では G₁ 期における細胞周期停止の誘導を明らかとした (Figure 9)。続いて、siPOLD1 処置後さらに長時間培養した際のアポトーシス誘導作用について検討した。siPOLD1 処置後、死細胞が最も多く観察された siPOLD1 処置 120 時間後のアポトーシスを FCM にて解析した。その結果、早期アポトーシス細胞である Annexin V 陽性/PI 陰性分画 および後期アポトーシス細胞を含む Annexin V 陽性/PI 陽性分画が siCtrl と比較し、211H 細胞および MESO-1 細胞では 2 配列共に、H2052 細胞においては siPOLD1#1 のみ顕著に増加した (Figure 12A)。得られたドットプロットより早期アポトーシス細胞と後期アポトーシス細胞の総和 (%) について解析したところ、siCtrl と比較し 211H 細胞および MESO-1 細胞では 2 配列共に、H2052 細胞においては siPOLD1#1 のみ、MESO-4 細胞においては siPOLD#2 のみ、有意にアポトーシスが進行していることが示された。一方で、H2052 のように siPOLD1 の配列の違いによってアポトーシス誘導作用に差異が生じるとともに、H2452、MESO-14 のように有意なアポトーシス誘導が生じない MPM 細胞があることが明らかとなった (Figure 12B)。

A



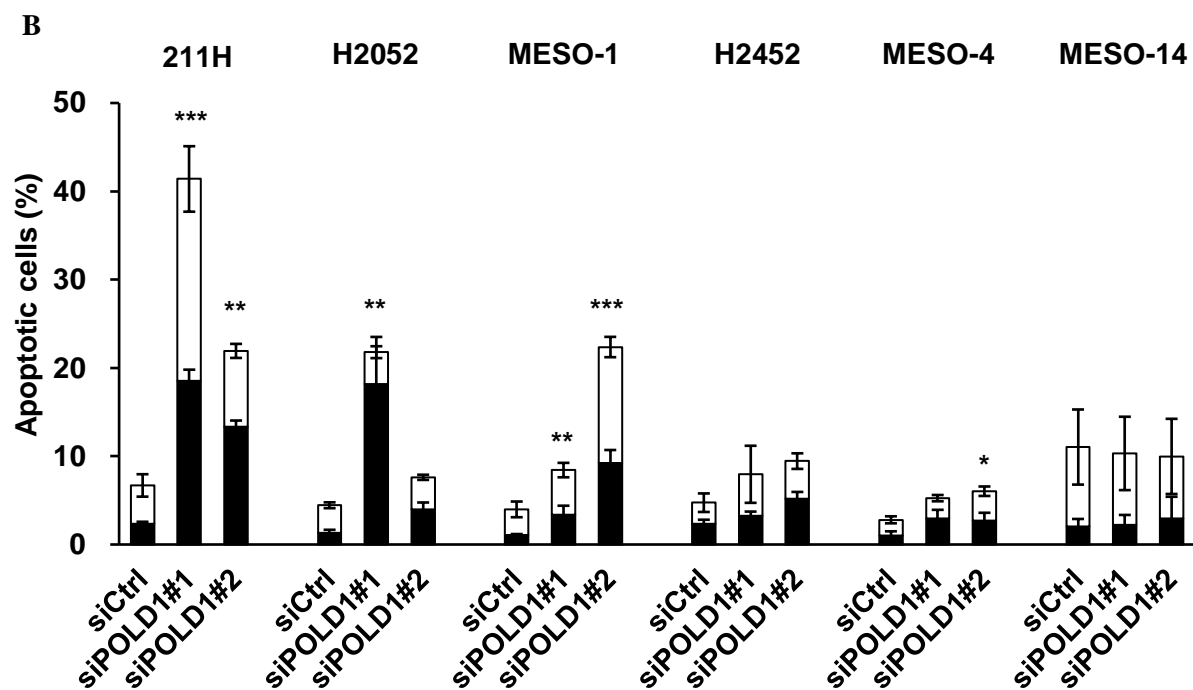


Figure 12. Cytotoxicity of siPOLD1, as determined by its effects on cell apoptosis.

(A) MPM cells were treated with siPOLD1 for 120 h, and cell apoptosis was determined by flow cytometry using annexin V-FITC and propidium iodide (PI) staining. (B) Black bars and open bars indicate early apoptotic cells (Annexin V⁺/PI⁻) and late apoptotic cells (Annexin V⁺/PI⁺), respectively. Data in (A) are presented as the mean±SD of three independent biological experiments, and sum of early apoptosis and late apoptosis were analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's correction; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs siCtrl.

Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

5. POLD1 発現抑制による DNA 損傷の定量解析

POLD1 を標的とする siRNA 処理 120 時間後にアポトーシスが誘導されたが、アポトーシスが DNA 損傷に起因するかどうかを、DSB マーカーであるリン酸化 Histone-H2A.X (γ H2A.X) (Ser139) を用いて評価した。その結果、siPOLD1#1 および#2 において有意なアポトーシス細胞の増加が誘導された 211H および MESO-1 細胞株において、2 配列共に siCtrl と比して著明に濃い γ H2A.X のバンドが検出された。一方で、siPOLD1#1 でのみ有意にアポトーシス細胞が増加した H2052 細胞においては siPOLD1#1 のみ γ H2A.X の増加が観察された (Figure 13)。したがって、MPM 細胞において POLD1 発現抑制は DNA 損傷マーカー γ H2A.X の蓄積を伴うアポトーシスを誘導することが示唆された。

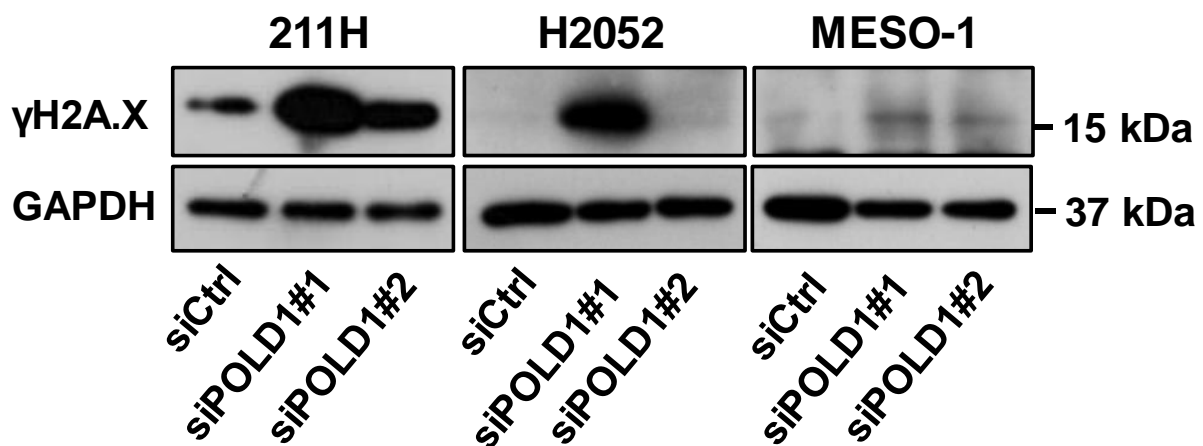


Figure 13. Western blotting analysis of phosphorylation of histone-H2A.X (γ H2A.X).

GAPDH were used as loading controls. Results shown are representative of two independent biological experiments.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

6. POLD1 発現抑制による ATM-Chk2-p53 経路の活性評価

最後に著者は、POLD1 発現抑制が DNA 複製ストレス応答経路におよぼす影響を検討した。DNA 複製ストレスは ATR-Chk1 経路および ATM-Chk2-p53 経路を活性化させるが、siPOLD1 の処置によって G₁/S 期で細胞周期が停止し、 γ H2A.X が標識する DSB が蓄積したことから、MPM 細胞の増殖抑制には ATM-Chk2-p53 経路の寄与が大きいものと考え評価を行った。その結果、siPOLD1 処置 24 時間後において、リン酸化 ATM (Ser1981)、Chk2 (Thr68)、p53 (Ser20) のバンドが siCtrl と比較して著明に濃かった (Figure 14)。よって、POLD1 発現抑制によって ATM をセンサーとした Chk2、p53 の活性化を介した G₁/S チェックポイントでの細胞周期抑制が生じていることが示唆された。

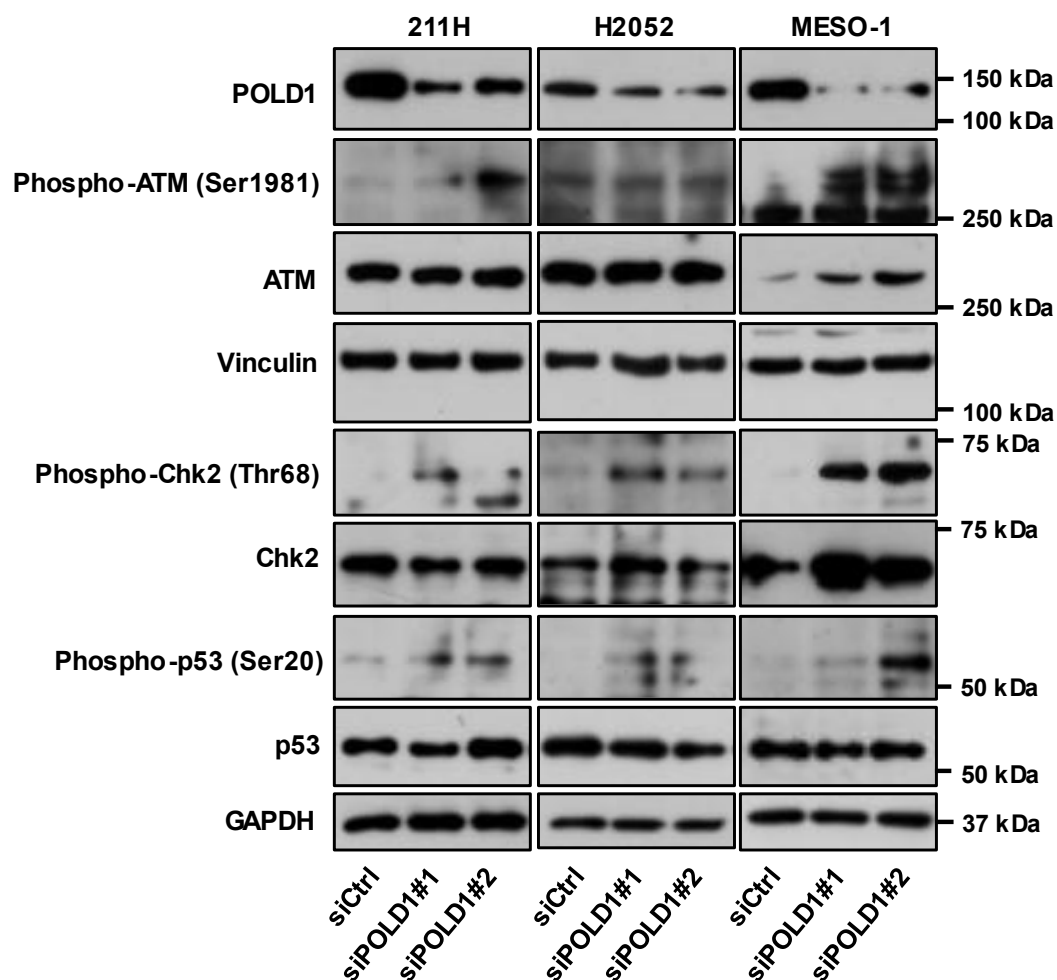


Figure 14. Western blotting analysis of phosphorylation of the ATM-Chk2-p53 pathway.

GAPDH and vinculin were used as loading controls. Results shown are representative of two independent biological experiments.

Modified from Shimizu, D., *et al.*, *Cancer Genomics Proteomics.*, **2024**, 21(2), 158-165.

第4節 考察

本章では、POLDD1 発現抑制が MPM 細胞の増殖抑制を引き起こすメカニズムを解明することを目的に実験的検証を実施した。まず、PI 染色を用いた細胞周期解析では、211H 細胞において subG₁ 期によって定義される細胞死が有意に増加し、その他の 5 株においては G₁ 期細胞が有意に増加した。したがって、211H 細胞を除く MPM 細胞株では、POLDD1 発現抑制による増殖抑制が、G₁ 期細胞の蓄積によって引き起こされることが示された。また、211H 細胞株および H2052 細胞では、POLDD1 発現抑制によって BrdU の取り込みが有意に抑制されたことから、DNA 複製の低下または S 期からの細胞死が誘導されている可能性が示唆される。211H 細胞においては、POLDD1 発現抑制から 48 時間後に細胞死が誘導されているため、致死性の DNA 損傷の蓄積が速やかに進行し、細胞周期停止よりもアポトーシス誘導の寄与が大きいと考えられる。一方、H2052-Fucci 細胞を用いた実験では、POLDD1 発現抑制によって G₁ 期細胞の蓄積が観察されたことから、H2052 細胞においては、POLDD1 発現抑制が S 期への進行を強力に阻害したことが明らかとなった。

続いて、POLDD1 発現抑制によってアポトーシスが誘導されるかを検討した結果、211H、H2052、MESO-1 細胞株におけるアポトーシス細胞が有意に増加した。アポトーシスが誘導された群において著明な DSB マーカーである γ H2A.X^{59,60} が蓄積していたのに対し、アポトーシスが誘導されなかった群においては γ H2A.X の蓄積は認められなかった。修復しきれない DNA 損傷が蓄積すると p53 の活性化を介した caspase-2/3 などのアポトーシス誘導性因子の活性化によるアポトーシスが惹起される^{61,62}。これらのことから、POLDD1 発現抑制によって蓄積した DNA2 本鎖切断の過剰蓄積がこれらのアポトーシス関連シグナルを活性化したものと考えられる。

ヒストン H2A.X は DNA 損傷に伴うクロマチン構造の変化に応答して ATM および ATR によってリン酸化される。この反応は、DNA 損傷応答の起点として機能し ATM-Chk2 および ATR-Chk1 経路の活性を介して細胞周期の停止およびアポトーシスを誘導する⁶³。DNA 損傷に応答する反応は細胞周期によって異なり、G₁ および S 期にある細胞は、姉妹染色分体 DNA を鋳型として利用できないため、これらの状態にある細胞の 2 本鎖修復は NHEJ 経路に依存する⁶⁴。このような G₁/S チェックポイントにおける修復制御は ATM-Chk2 経路によって速やかに触媒されることが明らかとなっている⁶⁵。また、活性化された Chk2 は cell division cycle 25 A (CDC25A) を阻害して細胞周期を S 期内チェックポイントにて細胞周期を停止させる^{66,67}。以上の知見から、POLDD1 発現抑制による細胞周期解析で得られた G₁ 期および S 期進行中での細胞周期の停止は、ATM-Chk2 経路の活性によって誘導されているものと仮説を立てた。実際に、POLDD1 の発現が抑制された 211H、H2052、MESO-1 細胞株において ATM、Chk2、p53 のリン酸化体の発現が高かった。したがって、POLDD1 発現抑制によって誘導される細胞周期の停止は ATM-Chk2-p53 経路の活性化によって誘導されていることが示唆された。

一方、本研究で用いた細胞株 6 株のうち、3 株では著明なアポトーシスが確認できたが、残りの 3 株 (H2452、MESO-4、MESO-14) は γ H2A.X 蓄積を伴わず、アポトーシスへ進行しなかった。細胞は DNA 損傷が起こると複数の DDR 経路を活性化させることによって損傷部位

を修復することから、DDR 関連因子の欠損や発現増幅は、DNA 損傷に対する感受性に変化をおよぼすことが分かっている。このように、POLD1 の発現抑制を補完する DDR 経路の活性によってアポトーシスへの誘導が制御されているのではないかと考えられる。DSB の修復には、meiotic recombination 11 (MRE11)、RAD50 および nijmegen breakage syndrome 1 (NEB1) からなる MRN 複合体が HR 進行の際に動員されるほか、NHEJ には DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-dependent protein kinase; DNA-PK) の触媒サブユニットが切断部位の結合に寄与している⁶⁸。このように、POLD1 と異なる経路で DDR に関与する分子の変異や発現変化が POLD1 発現抑制に対する感受性を決定づけている可能性がある。著者は DepMap portal (<https://depmap.org/portal/>) を用い、POLD1 発現抑制に対する感受性に影響する可能性のある DDR 因子の MPM 細胞株における変異について解析したところ、211H では BRCA1 に、H2052 および MESO-1 では BRCA2 に変異のあることが分かった。この変異情報は、BRCA と POLD1 の両方の機能が失われたことによって MPM 細胞の DSB 蓄積を伴うアポトーシスが誘導された可能性を示唆するものである。

2 つ以上の分子がそれぞれの機能を補完することで細胞が増殖・生存している場合、その両方の機能を欠損させたときにはじめて細胞死が誘導される現象を合成致死という^{69,70}。合成致死が臨床でがん治療に用いられている例として、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 阻害薬が BRCA1 または BRCA2 に生殖細胞系列変異を持つ乳がんや卵巣がん患者などに対して有効性を示すことが挙げられる。PARP は DNA 複製時に生じる 1 本鎖切断 (single strand break; SSB) の修復を触媒する酵素であり、BRCA1/2 の変異によって DSB 修復機構不全が生じているがん細胞に対し、PARP 阻害薬が SSB 修復を抑制することで DNA 損傷の蓄積を伴う細胞死が誘導される^{71,72}。また近年では、BRCA1/2 のみならず、ATM、ATR、PALB2 などの HR 関連 DSB 修復因子の体細胞性変異が PARP 阻害薬の感受性を向上させることが示されており^{73,74}、DDR 因子の遺伝子異常がその他の経路の阻害因子の感受性に影響をおよぼすと考えられる。本研究において POLD1 発現抑制が DSB の蓄積を誘導したことから、SSB を誘導する PARP 阻害薬は POLD1 発現抑制による増殖抑制効果を増大させる可能性があり、合成致死を狙った標的分子の一つとして今後の検討が期待される。このように、POLD1 の発現抑制による増殖抑制やアポトーシス誘導効果の差異は、MPM 細胞株の DDR 遺伝子の変異に起因している可能性が考えられ、合成致死を狙った治療戦略を立てるためには、POLD1 と相補的に作用する DDR 経路について検討する必要があると考える。

一方、POLD1 発現抑制によってアポトーシスが誘導されなかった細胞株 (H2452、MESO-4、MESO-14) の共通点として BAP1 欠損株であることが挙げられる。BAP1 は MPM 患者のおよそ 40% 程度で生殖細胞系列の欠損を認める脱ユビキチン化酵素であり、基質タンパク質の安定化を介し様々なシグナルを制御している。BAP1 の基質については明らかとされていない部分が多く、過去には BAP1 の欠損が放射線照射からの細胞の増殖開始を促進したとの報告がある⁷⁵。また、BAP1 は小胞体上 3 型イノシトール-1,4,5-3 リン酸受容体 (IP3 受容体) のユビキチン化を促進することが明らかとされている。IP3 受容体は小胞体から細胞質への Ca^{2+} の放出促進を介し、ミトコンドリアへ Ca^{2+} を流入させることで細胞をアポトーシスへ誘導する機能を有しており、BAP1 欠損によって IP3 受容体がユビキチン-プロテアソーム系で

分解され、アポトーシスが抑制されることが示された⁷⁶。一方で、BAP1はDNA損傷修復に関与しているため、BAP1野生型細胞におけるBAP1発現抑制はDNA損傷の蓄積を誘導し致死性に機能する⁷⁷。したがって、生殖細胞系列でBAP1が欠損した中皮細胞が、アスベストに起因する致死性の遺伝子変異に適応して生存／がん化するメカニズムは、BAP1野生型の中皮細胞がアスベストに曝露されてがん化する場合とは異なると考えられる。POLD1発現抑制による増殖抑制効果と、BAP1欠損細胞特異的なDNA複製ストレスから細胞死を回避する分子制御を考慮した上で合成致死を狙うことが可能ならBAP1欠損MPM選択的な治療戦略となりうるため、今後の検討に期待する。

さらに、本研究においてはオフターゲット効果を否定する目的で2配列のsiPOLD1を使用した。しかし、siPOLD1配列間にも感受性の差異が認められた。siRNAは標的細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれるとRNA-induced silencing complex (RISC)と複合体を形成し、標的mRNAを分解する。この、siRNA-RISC複合体の活性はsiRNAの塩基配列に依存しており⁷⁸、配列の異なるsiPOLD1#1および#2において、mRNA分解までに要する時間に差異があると考えられる。したがって、ノックダウンが速やかに進行した配列では表現型が強く現れ、一方で、ノックダウンまでに時間を要した配列は表現型が弱く現れたと考えられる。また、本実験で使用したMPM細胞株はすべてCDKN2Aを欠損し、無秩序なS期への進行が誘導されているため、細胞周期が停止しなかった配列は細胞周期測定時点において、POLD1発現抑制によるG₁期停止よりもS期への進行が優位であったことが示唆される。さらに、細胞内に取り込まれたsiRNAはRNA分解酵素による分解を受けるが、細胞内におけるsiRNAの安定性も塩基配列や修飾に依存している。siPOLD1#1、#2の細胞内安定性もそれぞれ異なると考えられ、アポトーシスが誘導されなかった配列は、致死性のDNA損傷が蓄積する前に細胞内で分解された可能性がある。また、mRNAにはスプライシングによって異なるアイソフォームが存在し、ターゲットエクソンの違いによって抗腫瘍効果に差異が生じることが報告されており^{79,80}、核酸医薬品の開発における障壁となっている。本研究においては、2配列いずれのsiPOLD1処理によってもPOLD1発現量がmRNAおよびタンパク質ともに著明に減少したことを確認したが、ターゲットエクソンの違いによるわずかなノックダウン効率の差異やオフターゲット効果が、増殖抑制効果に影響をおよぼした可能性は否定できない。2株以上の細胞にて表現型の相同性を確認しているものの、より厳密にオフターゲット効果を否定するため、配列を増やして検討するかsiRNA配列に対する耐性遺伝子発現細胞株を樹立しレスキュー実験を行う⁸¹などの方法も検討すべきである。

第 5 節 小括

本章では、POLD1 発現が抑制された MPM 細胞の細胞周期解析およびアポトーシス解析を実施し、以下のような知見を得た。

1. POLD1 発現抑制によって G₁ 期または S 期にて細胞周期の進行が抑制される。
2. POLD1 発現抑制によって DSB の蓄積を伴うアポトーシスが誘導される。
3. POLD1 発現抑制によって ATM-Chk2-p53 経路が活性化する。

総括

昨今の医学の発展に伴いがん患者の生命予後は改善しつつあるが、MPM 患者の 5 年生存率は未だ 10%未満で推移しており、MPM に対する新規治療標的を確立することはアンメット・メディカル・ニーズである。

本研究の生命予後解析によって POLD1 の高発現が MPM 患者の生命予後悪化に寄与することを見出した。さらに、MPM 細胞の POLD1 発現抑制によって、G₁ 期または S 期において細胞周期が停止し、さらに、DSB の蓄積によってアポトーシスが誘導されるとともに ATM-Chk2-p53 経路が活性化することを明らかとした (Figure 15)。これらの結果より、POLD1 が MPM 細胞における DSB 修復に寄与しており、POLD1 の発現抑制によって DSB が蓄積し、増殖抑制と細胞死を誘導することが示唆された。したがって、アスベストに起因や遺伝子変異に起因するゲノム不安定性が生じた中皮細胞のうち、POLD1 を過剰発現した細胞がさらなる致死性の遺伝子変異を回避することで MPM を発症すると考えられる。さらに、POLD 高発現によって増殖/生存シグナルが亢進した細胞が無秩序に増殖することで MPM 患者の予後を悪化させているのではないかと推察される。

以上の知見より、POLD1 が MPM に対する新規治療標的候補となりえることが見出され、今後は臨床への応用を見据えたさらなる検討が求められる。過去の報告では、大腸がんにおいて ATR 経路と POLD1 が相補的に DDR 経路を制御し、POLD1 ノックアウト株において ATR 阻害薬との合成致死が得られたことが報告されている⁸²。さらに、大腸がん患者においては POLD1 の家族性変異が多数報告されており、POLD1 の機能欠失型変異が ATR および Chk1 阻害薬の感受性を向上させたとの報告も得られている⁸³。以上の知見は、POLD1 と ATR 経路が DDR を相補的に担っていることを示唆しており、POLD1 が ATR 経路におよぼす影響を明らかとすることで、POLD1 発現抑制に対する MPM 細胞の感受性を決定する要因を解明するとともに、合成致死を視野に入れた併用療法につなげられるものとする。また、本研究では、POLD1 によって誘導される DNA 損傷が ATM-Chk2 経路の活性化を介して細胞周期を停止させることを見出したことから、ATM-Chk2 経路阻害と POLD1 抑制の合成致死戦略も期待される。

さらに、MPM に高頻度に認められる、BAP1 や BRCA1/2 などの DNA 損傷修復因子の変異による機能欠失変異も、正常細胞との相違点として興味深い。これらの遺伝子欠損に対して代償的に POLD1 が機能していることが明らかとなれば、DDR 関連遺伝子を標的とした POLD1 との合成致死誘導が期待され、MPM 腫瘍細胞選択的な細胞死/増殖抑制を誘導する可能性がある。今後、さらなる MPM 患者のゲノム情報の蓄積によって分子メカニズムの解明につながる新たな知見が得られることを期待する。また、POLD1 阻害が既存の治療薬に対する感受性におよぼす効果の検討も重要である。化学療法の第 1 選択であるシスプラチンおよびペメトレキセドは、それぞれ DNA2 本鎖の架橋およびヌクレオチド合成の阻害によって DNA 複製ストレスを増大させる薬剤である。これらの、DNA 複製ストレス誘導性薬剤と、DDR 因子として MPM 細胞の増殖に寄与する POLD1 の発現抑制は、効率的に細胞死を誘導するアプローチとして有効である可能性が高い。

本研究では新たに MPM における POLD1 高発現と生命予後悪化に相関があることを見出し、POLD1 発現抑制が ATM-Chk2 経路の活性化を介して MPM 細胞に対する抗腫瘍効果を誘導するという新規の知見を得た。本研究成果から合成致死を目指した併用療法へと発展させ、正常細胞に MPM に対する POLD1 発現抑制による選択性を高めることにより、生命予後が極めて悪く治療法の選択肢が限定的である MPM に対する新たな治療選択肢がもたらされることを期待する。

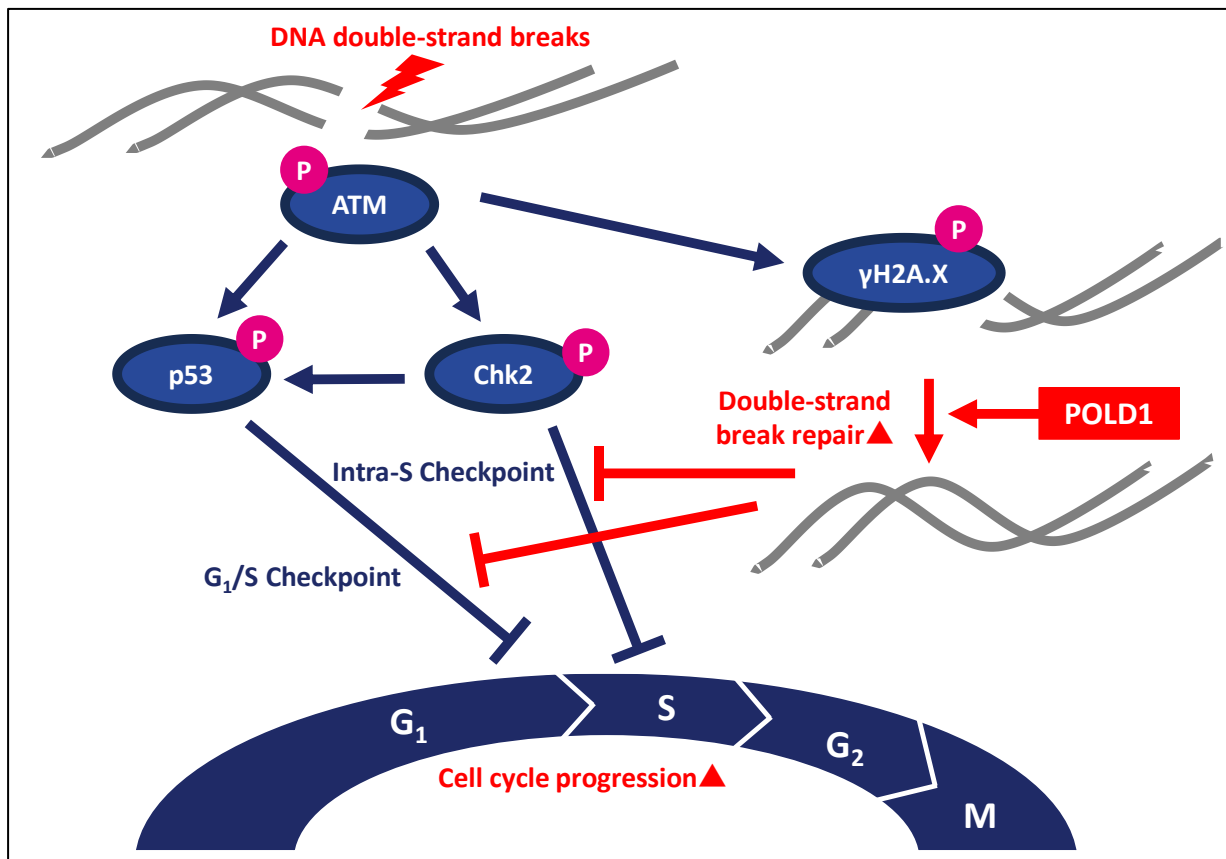


Figure 15. Conclusion of this study.

POLD1 repairs DNA double-strand breaks and promotes cell cycle progression at the G₁ or S checkpoint in MPM cells. POLD1 suppression causes cell cycle arrest through activation of the ATM-Chk2-p53 pathway and apoptosis including γH2A.X accumulation.

謝辞

本稿を終えるにあたり、厚いご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授、細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教に深甚なる謝意を表します。

本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学生化学分野 中山祐治 教授、同衛生化学分野 長澤一樹 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を推進するにあたり多大なるご支援を賜りました京都府立医科大学大学院医学研究科 呼吸器内科学 山田忠明 准教授に厚く御礼申し上げます。

本分野で過ごした大学院生活において、苦楽を共にし、支えてくださった宮下雅亜博士、黒田絵莉子博士、角陽子博士、若林亮介博士、甘利圭悟博士、友金眞光博士、今吉菜月博士、杉山雄輝博士、佐野友亮博士、石橋未来さん、および本分野に所属する大学院生・学部生の皆様にも心より御礼申し上げます。

最後に、この4年間の大学院生活を支えてくれた両親に深く感謝いたします。

引用文献

1. Janes, S. M.; Alrifai, D.; Fennell, D. A. Perspectives on the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 1207–1218.
2. Milano, M. T.; Zhang, H. Malignant Pleural Mesothelioma: A Population-Based Study of Survival. *J. Thorac. Oncol.* **2010**, *5*, 1841–1848.
3. Vogelzang, N. J.; Rusthoven, J. J.; Symanowski, J.; Denham, C.; Kaukel, E.; Ruffie, P.; Gatzemeier, U.; Boyer, M.; Emri, S.; Manegold, C.; Niyikiza, C.; Paoletti, P. Phase III Study of Pemetrexed in Combination with Cisplatin versus Cisplatin Alone in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 2636–2644.
4. Baas, P.; Scherpereel, A.; Nowak, A. K.; Fujimoto, N.; Peters, S.; Tsao, A. S.; Mansfield, A. S.; Popat, S.; Jahan, T.; Antonia, S.; Oulhouir, Y.; Bautista, Y.; Cornelissen, R.; Greillier, L.; Grossi, F.; Kowalski, D.; Rodríguez-Cid, J.; Aanur, P.; Oukessou, A.; Baudelet, C.; Zalcman, G. First-Line Nivolumab plus Ipilimumab in Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma (CheckMate 743): A Multicentre, Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet.* **2021**, *397*, 375–386.
5. Fennell, D. A.; Ewings, S.; Ottensmeier, C.; Califano, R.; Hanna, G. G.; Hill, K.; Danson, S.; Steele, N.; Nye, M.; Johnson, L.; Lord, J.; Middleton, C.; Szlosarek, P.; Chan, S.; Gaba, A.; Darlison, L.; Wells-Jordan, P.; Richards, C.; Poile, C.; Lester, J. F.; Griffiths, G.; Price, G.; Shaw, P.; Cave, J.; Naik, J.; Ford, A.; Geldhart, T.; Dancey, G.; Papadatos, D.; Polychronis, A.; Jankowska, P.; Scott, A.; Gardiner, J.; Cominos, M.; Campbell, L.; MacGregor, C.; Mullholand, L.; Chitnis, M.; Dougherty, G. Nivolumab versus Placebo in Patients with Relapsed Malignant Mesothelioma (CONFIRM): A Multicentre, Double-Blind, Randomised, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2021**, *22*, 1530–1540.
6. Choe, N.; Tanaka, S.; Kagan, E. Asbestos Fibers and Interleukin-1 Upregulate the Formation of Reactive Nitrogen Species in Rat Pleural Mesothelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1998**, *19*, 226–236.
7. Ghio, A. J.; Stewart, M.; Sangani, R. G.; Pavlisko, E. N.; Roggli, V. L. Asbestos and Iron. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12390.
8. Ganzinelli, M.; Guffanti, F.; Ianza, A.; Sobhani, N.; Crovella, S.; Zanconati, F.; Bottin, C.; Confalonieri, M.; Fumagalli, S.; Guglielmi, A.; Generali, D.; Damia, G. Epithelioid Mesothelioma Patients with Very Long Survival Display Defects in DNA Repair. *Cancers (Basel)*. **2023**, *15*, 4309.
9. Masclef, L.; Ahmed, O.; Estavoyer, B.; Larrivée, B.; Labrecque, N.; Nijnik, A.; Affar, E. B. Roles and Mechanisms of BAP1 Deubiquitinase in Tumor Suppression. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 606–625.
10. Ismail, I. H.; Davidson, R.; Gagné, J. P.; Xu, Z. Z.; Poirier, G. G.; Hendzel, M. J. Germline Mutations in BAP1 Impair Its Function in DNA Double-Strand Break Repair. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 4282–4294.
11. Perkail, S.; Andricovich, J.; Kai, Y.; Tzatsos, A. BAP1 Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor Linking Chronic Pancreatitis to Pancreatic Cancer in Mice. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3018.

12. Betti, M.; Casalone, E.; Ferrante, D.; Aspesi, A.; Morleo, G.; Biasi, A.; Sculco, M.; Mancuso, G.; Guarrera, S.; Righi, L.; Grosso, F.; Libener, R.; Pavesi, M.; Mariani, N.; Casadio, C.; Boldorini, R.; Mirabelli, D.; Pasini, B.; Magnani, C.; Matullo, G.; Dianzani, I. Germline Mutations in DNA Repair Genes Predispose Asbestos-Exposed Patients to Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Lett.* **2017**, *405*, 38–45.
13. Beroukhi, R.; Mermel, C. H.; Porter, D.; Wei, G.; Raychaudhuri, S.; Donovan, J.; Barretina, J.; Boehm, J. S.; Dobson, J.; Urashima, M.; McHenry, K. T.; Pinchback, R. M.; Ligon, A. H.; Cho, Y. J.; Haery, L.; Greulich, H.; Reich, M.; Winckler, W.; Lawrence, M. S.; Weir, B. A.; Tanaka, K. E.; Chiang, D. Y.; Bass, A. J.; Loo, A.; Hoffman, C.; Prensner, J.; Liefeld, T.; Gao, Q.; Yecies, D.; Signoretti, S.; Maher, E.; Kaye, F. J.; Sasaki, H.; Tepper, J. E.; Fletcher, J. A.; Tabernero, J.; Baselga, J.; Tsao, M. S.; Demichelis, F.; Rubin, M. A.; Janne, P. A.; Daly, M. J.; Nucera, C.; Levine, R. L.; Ebert, B. L.; Gabriele, S.; Rustgi, A. K.; Antonescu, C. R.; Ladanyi, M.; Letai, A.; Garraway, L. A.; Loda, M.; Beer, D. G.; True, L. D.; Okamoto, A.; Pomeroy, S. L.; Singer, S.; Golub, T. R.; Lander, E. S.; Getz, G.; Sellers, W. R.; Meyerson, M. The Landscape of Somatic Copy-Number Alteration across Human Cancers. *Nature.* **2010**, *463*, 899–905.
14. Cheng, Y. Y.; Rath, E. M.; Linton, A.; Yuen, M. L.; Takahashi, K.; Lee, K. The Current Understanding of Asbestos-Induced Epigenetic Changes Associated with Lung Cancer. *Lung Cancer (Auckl).* **2020**, *11*, 1–11.
15. Ito, F.; Yanatori, I.; Maeda, Y.; Nimura, K.; Ito, S.; Hirayama, T.; Nagasawa, H.; Kohyama, N.; Okazaki, Y.; Akatsuka, S.; Toyokuni, S. Asbestos Conceives Fe(II)-Dependent Mutagenic Stromal Milieu through Ceaseless Macrophage Ferroptosis and β -Catenin Induction in Mesothelium. *Redox Biol.* **2020**, *36*, 101616.
16. Trassl, L.; Stathopoulos, G. T. KRAS Pathway Alterations in Malignant Pleural Mesothelioma: An Underestimated Player. *Cancers (Basel).* **2022**, *14*, 4303.
17. Tort, F.; Bartkova, J.; Sehested, M.; Ørntoft, T.; Lukas, J.; Bartek, J. Retinoblastoma Pathway Defects Show Differential Ability to Activate the Constitutive DNA Damage Response in Human Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10258–10263.
18. Bates, S.; Phillips, A. C.; Clark, P. A.; Stott, F.; Peters, G.; Ludwig, R. L.; Vousden, K. H. P14ARF Links the Tumour Suppressors RB and P53. *Nature.* **1998**, *395*, 124–125.
19. Fouad, S.; Hauton, D.; D'Angiolella, V. E2F1: Cause and Consequence of DNA Replication Stress. *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *7*, 599332.
20. Yang, C. T.; You, L.; Yeh, C. C.; Chang, J. W. C.; Zhang, F.; McCormick, F.; Jablons, D. M. Adenovirus-Mediated P14ARF Gene Transfer in Human Mesothelioma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 636–641.
21. Grabocka, E.; Comisso, C.; Bar-Sagi, D. Molecular Pathways Molecular Pathways: Targeting the Dependence of Mutant RAS Cancers on the DNA Damage Response. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *21*, 1243–1247.
22. Igarashi, T.; Mazevet, M.; Yasuhara, T.; Yano, K.; Mochizuki, A.; Nishino, M.; Yoshida, T.; Yoshida, Y.; Takamatsu, N.; Yoshimi, A.; Shiraishi, K.; Horinouchi, H.; Kohno, T.; Hamamoto,

- R.; Adachi, J.; Zou, L.; Shiotani, B. An ATR-PrimPol Pathway Confers Tolerance to Oncogenic KRAS-Induced and Heterochromatin-Associated Replication Stress. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 4991.
23. Lee, M. Y. W. T.; Zhang, S.; Wang, X.; Chao, H. H.; Zhao, H.; Darzynkiewicz, Z.; Zhang, Z.; Lee, E. Y. C. Two Forms of Human DNA Polymerase δ : Who Does What and Why? *DNA Repair (Amst)*. **2019**, *81*, 102656.
 24. Donnianni, R. A.; Zhou, Z. X.; Lujan, S. A.; Al-Zain, A.; Garcia, V.; Glancy, E.; Burkholder, A. B.; Kunkel, T. A.; Symington, L. S. DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during Break-Induced Replication. *Mol. Cell*. **2019**, *76*, 371–381.
 25. Fuchs, J.; Cheblal, A.; Gasser, S. M. Underappreciated Roles of DNA Polymerase δ in Replication Stress Survival. *Trends in Genet.* **2021**, *37*, 476–487.
 26. Tomczak, K.; Czerwińska, P.; Wiznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): An Immeasurable Source of Knowledge. *Contemp. Oncol (Pozn)*. **2015**, *19*, 68–77.
 27. Ardlie, K. G.; DeLuca, D. S.; Segrè, A. V.; Sullivan, T. J.; Young, T. R.; Gelfand, E. T.; Trowbridge, C. A.; Maller, J. B.; Tukiainen, T.; Lek, M.; Ward, L. D.; Kheradpour, P.; Iriarte, B.; Meng, Y.; Palmer, C. D.; Esko, T.; Winckler, W.; Hirschhorn, J. N.; Kellis, M.; MacArthur, D. G.; Getz, G.; Shabalina, A. A.; Li, G.; Zhou, Y. H.; Nobel, A. B.; Rusyn, I.; Wright, F. A.; Lappalainen, T.; Ferreira, P. G.; Ongen, H.; Rivas, M. A.; Battle, A.; Mostafavi, S.; Monlong, J.; Sammeth, M.; Melé, M.; Reverter, F.; Goldmann, J. M.; Koller, D.; Guigó, R.; McCarthy, M. I.; Dermitzakis, E. T.; Gamazon, E. R.; Im, H. K.; Konkashbaev, A.; Nicolae, D. L.; Cox, N. J.; Flutre, T.; Wen, X.; Stephens, M.; Pritchard, J. K.; Tu, Z.; Zhang, B.; Huang, T.; Long, Q.; Lin, L.; Yang, J.; Zhu, J.; Liu, J.; Brown, A.; Mestichelli, B.; Tidwell, D.; Lo, E.; Salvatore, M.; Shad, S.; Thomas, J. A.; Lonsdale, J. T.; Moser, M. T.; Gillard, B. M.; Karasik, E.; Ramsey, K.; Choi, C.; Foster, B. A.; Syron, J.; Fleming, J.; Magazine, H.; Hasz, R.; Walters, G. D.; Bridge, J. P.; Miklos, M.; Sullivan, S.; Barker, L. K.; Traino, H. M.; Mosavel, M.; Siminoff, L. A.; Valley, D. R.; Rohrer, D. C.; Jewell, S. D.; Branton, P. A.; Sobin, L. H.; Barcus, M.; Qi, L.; McLean, J.; Hariharan, P.; Um, K. S.; Wu, S.; Tabor, D.; Shive, C.; Smith, A. M.; Buia, S. A.; Undale, A. H.; Robinson, K. L.; Roche, N.; Valentino, K. M.; Britton, A.; Burges, R.; Bradbury, D.; Hambright, K. W.; Seleski, J.; Korzeniewski, G. E.; Erickson, K.; Marcus, Y.; Tejada, J.; Taherian, M.; Lu, C.; Basile, M.; Mash, D. C.; Volpi, S.; Struwing, J. P.; Temple, G. F.; Boyer, J.; Colantuoni, D.; Little, R.; Koester, S.; Carithers, L. J.; Moore, H. M.; Guan, P.; Compton, C.; Sawyer, S. J.; Demchok, J. P.; Vaught, J. B.; Rabiner, C. A.; Lockhart. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Pilot Analysis: Multitissue Gene Regulation in Humans. *Science*. **2015**, *348*, 648–660.
 28. Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O, Robertson AG, Noushmehr H, Laird PW, Cherniack AD, Akbani R, Huse JT, Ciriello G, Poisson LM, Barnholtz-Sloan JS, Berger MS, Brennan C, Colen RR, Colman H, Flanders AE, Giannini C, Grifford M, Iavarone A, Jain R, Joseph I, Kim J, Kasaian K, Mikkelsen T, Murray BA, O'Neill BP, Pachter L, Parsons DW, Sougnez C, Sulman EP, Vandenberg SR, Van Meir EG, von Deimling A, Zhang H, Crain D, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton T, Sherman M, Yena P, Black A, Bowen J, Dicostanzo K, Gastier-Foster J, Leraas KM,

- Lichtenberg TM, Pierson CR, Ramirez NC, Taylor C, Weaver S, Wise L, Zmuda E, Davidsen T, Demchok JA, Eley G, Ferguson ML, Hutter CM, Mills Shaw KR, Ozenberger BA, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Ayala B, Baboud J, Chudamani S, Jensen MA, Liu J, Pihl T, Raman R, Wan Y, Wu Y, Ally A, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, Baylin SB, Beroukhi R, Bootwalla MS, Bowlby R, Bristow CA, Brooks D, Butterfield Y, Carlsen R, Carter S, Chin L, Chu A, Chuah E, Cibulskis K, Clarke A, Coetzee SG, Dhalla N, Fennell T, Fisher S, Gabriel S, Getz G, Gibbs R, Guin R, Hadjipanayis A, Hayes DN, Hinoue T, Hoadley K, Holt RA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones S, Jones CD, Kucherlapati R, Lai PH, Lander E, Lee S, Lichtenstein L, Ma Y, Maglinte DT, Mahadeshwar HS, Marra MA, Mayo M, Meng S, Meyerson ML, Mieczkowski PA, Moore RA, Mose LE, Mungall AJ, Pantazi A, Parfenov M, Park PJ, Parker JS, Perou CM, Protopopov A, Ren X, Roach J, Sabedot TS, Schein J, Schumacher SE, Seidman JG, Seth S, Shen H, Simons JV, Sipahimalani P, Soloway MG, Song X, Sun H, Tabak B, Tam A, Tan D, Tang J, Thiessen N, Triche T Jr, Van Den Berg DJ, Veluvolu U, Waring S, Weisenberger DJ, Wilkerson MD, Wong T, Wu J, Xi L, Xu AW, Yang L, Zack TI, Zhang J, Aksoy BA, Arachchi H, Benz C, Bernard B, Carlin D, Cho J, DiCara D, Frazer S, Fuller GN, Gao J, Gehlenborg N, Haussler D, Heiman DI, Iype L, Jacobsen A, Ju Z, Katzman S, Kim H, Knijnenburg T, Kreisberg RB, Lawrence MS, Lee W, Leinonen K, Lin P, Ling S, Liu W, Liu Y, Liu Y, Lu Y, Mills G, Ng S, Noble MS, Paull E, Rao A, Reynolds S, Saksena G, Sanborn Z, Sander C, Schultz N, Senbabaoglu Y, Shen R, Shmulevich I, Sinha R, Stuart J, Sumer SO, Sun Y, Tasman N, Taylor BS, Voet D, Weinhold N, Weinstein JN, Yang D, Yoshihara K, Zheng S, Zhang W, Zou L, Abel T, Sadeghi S, Cohen ML, Eschbacher J, Hattab EM, Raghunathan A, Schniederjan MJ, Aziz D, Barnett G, Barrett W, Bigner DD, Boice L, Brewer C, Calatozzolo C, Campos B, Carlotti CG Jr, Chan TA, Cuppini L, Curley E, Cuzzubbo S, Devine K, DiMeco F, Duell R, Elder JB, Fehrenbach A, Finocchiaro G, Friedman W, Fulop J, Gardner J, Hermes B, Herold-Mende C, Jungk C, Kendler A, Lehman NL, Lipp E, Liu O, Mandt R, McGraw M, McLendon R, McPherson C, Neder L, Nguyen P, Noss A, Nunziata R, Ostrom QT, Palmer C, Perin A, Pollo B, Potapov A, Potapova O, Rathmell WK, Rotin D, Scarpace L, Schilero C, Senecal K, Shimmel K, Shurkhay V, Sifri S, Singh R, Sloan AE, Smolenski K, Staugaitis SM, Steele R, Thorne L, Tirapelli DP, Unterberg A, Vallurupalli M, Wang Y, Warnick R, Williams F, Wolinsky Y, Bell S, Rosenberg M, Stewart C, Huang F, Grimsby JL, Radenbaugh AJ, Zhang J. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 372, 2481–2498.
29. Louis, D. N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W. K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Kleihues, P.; Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta. Neuropathol.* **2016**, 131, 803–820.
 30. Bass, A. J.; Thorsson, V.; Shmulevich, I.; Reynolds, S. M.; Miller, M.; Bernard, B.; Hinoue, T.; Laird, P. W.; Curtis, C.; Shen, H.; Weisenberger, D. J.; Schultz, N.; Shen, R.; Weinhold, N.; Kelsen, D. P.; Bowlby, R.; Chu, A.; Kasaian, K.; Mungall, A. J.; Robertson, A. G.; Sipahimalani, P.; Cherniack, A. D.; Getz, G.; Liu, Y.; Noble, M. S.; Pedamallu, C.; Sougnez, C.; Taylor-Weiner, A.;

- Akbani, R.; Lee, J. S.; Liu, W.; Mills, G. B.; Yang, D.; Zhang, W.; Pantazi, A.; Parfenov, M.; Gulley, M.; Piazuelo, M. B.; Schneider, B. G.; Kim, J.; Boussioutas, A.; Sheth, M.; Demchok, J. A.; Rabkin, C. S.; Willis, J. E.; Ng, S.; Garman, K.; Beer, D. G.; Pennathur, A.; Raphael, B. J.; Wu, H. T.; Odze, R.; Kim, H. K.; Bowen, J.; Leraas, K. M.; Lichtenberg, T. M.; Weaver, S.; McLellan, M.; Wiznerowicz, M.; Sakai, R.; Lawrence, M. S.; Cibulskis, K.; Lichtenstein, L.; Fisher, S.; Gabriel, S. B.; Lander, E. S.; Ding, L.; Niu, B.; Ally, A.; Balasundaram, M.; Birol, I.; Brooks, D.; Butterfield, Y. S. N.; Carlsen, R.; Chu, J.; Chuah, E.; Chun, H. J. E.; Clarke, A.; Dhalla, N.; Guin, R.; Holt, R. A.; Jones, S. J. M.; Lee, D.; Li, H. A.; Lim, E.; Ma, Y.; Marra, M. A.; Mayo, M.; Moore, R. A.; Mungall, K. L.; Nip, K. M.; Schein, J. E.; Tam, A.; Thiessen, N.; Beroukhi, R.; Carter, S. L.; Cho, J.; DiCara, D.; Frazer, S.; Gehlenborg, N.; Heiman, D. I.; Jung, J.; Kim, J.; Lin, P.; Meyerson, M.; Ojesina, A. I.; Peadarallu, C. S.; Saksena, G.; Schumacher, S. E.; Stojanov, P.; Tabak, B.; Voet, D.; Rosenberg, M.; Zack, T. I.; Zhang, H.; Zou, L.; Protopopov, A.; Santoso, N.; Lee, S.; Zhang, J.; Mahadeshwar, H. S.; Tang, J.; Ren, X.; Seth, S.; Yang, L.; Xu, A. W.; Song, X.; Xi, R.; Bristow, C. A.; Hadjipanayis, A.; Seidman, J.; Chin, L.; Park, P. J.; Kucherlapati, R.; Ling, S.; Rao, A.; Weinstein, J. N.; Kim, S. B.; Lu, Y.; Bootwalla, M. S.; Lai, P. H.; Triche, T.; Van Den Berg, D. J.; Baylin, S. B.; Herman, J. G.; Murray, B. A.; Askoy, B. A.; Ciriello, G.; Dresdner, G.; Gao, J.; Gross, B.; Jacobsen, A.; Lee, W.; Ramirez, R.; Sander, C.; Senbabaoglu, Y.; Sinha, R.; Sumer, S. O.; Sun, Y.; Iype, L.; Kramer, R. W.; Kreisberg, R.; Rovira, H.; Tasman, N.; Haussler, D.; Stuart, J. M.; Verhaak, R. G. W.; Leiserson, M. D. M.; Taylor, B. S.; Black, A. D.; Carney, J. A.; Gastier-Foster, J. M.; Helsel, C.; McAllister, C.; Ramirez, N. C.; Tabler, T. R.; Wise, L.; Zmuda, E.; Penny, R.; Crain, D.; Gardner, J.; Lau, K.; Curely, E.; Mallery, D.; Morris, S.; Paulauskis, J.; Shelton, T.; Shelton, C.; Sherman, M.; Benz, C.; Lee, J. H.; Fedosenko, K.; Manikhas, G.; Potapova, O.; Voronina, O.; Belyaev, D.; Dolzhansky, O.; Rathmell, W. K.; Brzezinski, J.; Ibbs, M.; Korski, K.; Kycler, W.; Łażniak, R.; Leporowska, E.; Mackiewicz, A.; Murawa, D.; Murawa, P.; Spychała, A.; Suchorska, W. M.; Tatka, H.; Teresiak, M.; Abdel-Misih, R.; Bennett, J.; Brown, J.; Iacocca, M.; Rabeno, B.; Kwon, S. Y.; Kemkes, A.; Curley, E.; Alexopoulou, I.; Engel, J.; Bartlett, J.; Albert, M.; Park, D. Y.; Dhir, R.; Luketich, J.; Landreneau, R.; Janjigian, Y. Y.; Cho, E.; Ladanyi, M.; Tang, L.; McCall, S. J.; Park, Y. S.; Cheong, J. H.; Ajani, J.; Camargo, M. C.; Alonso, S.; Ayala, B.; Jensen, M. A.; Pihl, T.; Raman, R.; Walton, J.; Wan, Y.; Eley, G.; Shaw, K. R. M.; Tarnuzzer, R.; Wang, Z.; Yang, L.; Zenklusen, J. C.; Davidsen, T.; Hutter, C. M.; Sofia, H. J.; Burton, R.; Chudamani, S.; Liu, J. Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma. *Nature*. **2014**, 513, 202–209.
31. Janjigian, Y. Y.; Shitara, K.; Moehler, M.; Garrido, M.; Salman, P.; Shen, L.; Wyrwicz, L.; Yamaguchi, K.; Skoczylas, T.; Campos Bragagnoli, A.; Liu, T.; Schenker, M.; Yanez, P.; Tehfe, M.; Kowalyszyn, R.; Karamouzis, M. V.; Bruges, R.; Zander, T.; Pazo-Cid, R.; Hitre, E.; Feeney, K.; Cleary, J. M.; Poulart, V.; Cullen, D.; Lei, M.; Xiao, H.; Kondo, K.; Li, M.; Ajani, J. A. First-Line Nivolumab plus Chemotherapy versus Chemotherapy Alone for Advanced Gastric, Gastro-Oesophageal Junction, and Oesophageal Adenocarcinoma (CheckMate 649): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet*. **2021**, 398, 27–40.

32. Smyth, E. C.; Nilsson, M.; Grabsch, H. I.; van Grieken, N. C.; Lordick, F. Gastric Cancer. *Lancet*. **2020**, 396, 635–648.
33. Nam, S.; Lee, Y.; Kim, J. H. RHOA Protein Expression Correlates with Clinical Features in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMC Cancer*. **2022**, 22, 798.
34. Bonelli, P.; Borrelli, A.; Tuccillo, F. M.; Silvestro, L.; Palaia, R.; Buonaguro, F. M. Precision Medicine in Gastric Cancer. *World J. Gastrointest Oncol*. **2019**, 11, 804–829.
35. Zoabi, Y.; Shomron, N. Processing and Analysis of RNA-Seq Data from Public Resources. *Methods Mol. Biol*. **2021**, 2243, 81–94.
36. Li, B.; Ruotti, V.; Stewart, R. M.; Thomson, J. A.; Dewey, C. N. RNA-Seq Gene Expression Estimation with Read Mapping Uncertainty. *Bioinformatics*. **2010**, 26, 493–500.
37. Belcaid, L.; Bertelsen, B.; Wadt, K.; Tuxen, I.; Spanggaard, I.; Højgaard, M.; Benn Sørensen, J.; Ravn, J.; Lassen, U.; Cilius Nielsen, F.; Rohrberg, K.; Westmose Yde, C. New Pathogenic Germline Variants Identified in Mesothelioma. *Lung Cancer*. **2023**, 179, 107172.
38. Upadhyay, D.; Kamp, D. W. Asbestos-Induced Pulmonary Toxicity: Role of DNA Damage and Apoptosis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **2003**, 228, 650–659.
39. Lee, M. Y. W. T.; Wang, X.; Zhang, S.; Zhang, Z.; Lee, E. Y. C. Regulation and Modulation of Human DNA Polymerase δ Activity and Function. *Genes (Basel)*. **2017**, 8, 190.
40. Acharya, N.; Klassen, R.; Johnson, R. E.; Prakash, L.; Prakash, S. PCNA Binding Domains in All Three Subunits of Yeast DNA Polymerase δ Modulate Its Function in DNA Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **2011**, 108, 17927-17932.
41. Zhou, Y.; Meng, X.; Zhang, S.; Lee, E. Y. C.; Lee, M. Y. W. T. Characterization of Human DNA Polymerase Delta and Its Subassemblies Reconstituted by Expression in the Multibac System. *PLoS One*. **2012**, 7, 39156.
42. Lee, M. Y. W. T.; Wang, X.; Zhang, S.; Zhang, Z.; Lee, E. Y. C. Regulation and Modulation of Human Dna Polymerase δ Activity and Function. *Genes (Basel)*. **2017**, 8, 190.
43. Donnianni, R. A.; Zhou, Z. X.; Lujan, S. A.; Al-Zain, A.; Garcia, V.; Glancy, E.; Burkholder, A. B.; Kunkel, T. A.; Symington, L. S. DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during Break-Induced Replication. *Mol. Cell*. **2019**, 76, 371-381.
44. Costantino, L.; Sotiriou, S. K.; Rantala, J. K.; Magin, S.; Mladenov, E.; Helleday, T.; Haber, J. E.; Iliakis, G.; Kallioniemi, O. P.; Halazonetis, T. D. Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science*. **2014**, 343, 88-91.
45. Wang, Q.; Armenia, J.; Zhang, C.; Penson, A. V.; Reznik, E.; Zhang, L.; Minet, T.; Ochoa, A.; Gross, B. E.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Betel, D.; Taylor, B. S.; Gao, J.; Schultz, N. Data Descriptor: Unifying Cancer and Normal RNA Sequencing Data from Different Sources. *Sci. Data*. **2018**, 5, 180061.
46. Borchert, S.; Suckrau, P. M.; Walter, R. F. H.; Wessolly, M.; Mairinger, E.; Steinborn, J.; Hegedus, B.; Hager, T.; Herold, T.; Eberhardt, W. E. E.; Wohlschlaeger, J.; Aigner, C.; Bankfalvi, A.; Schmid, K. W.; Mairinger, F. D. Impact of Metallothionein-Knockdown on Cisplatin Resistance in Malignant Pleural Mesothelioma. *Sci. Rep*. **2020**, 10, 18677.

47. Mathilakathu, A.; Wessolly, M.; Mairinger, E.; Uebner, H.; Kreidt, D.; Brcic, L.; Steinborn, J.; Greimelmaier, K.; Wohlschlaeger, J.; Schmid, K. W.; Mairinger, F. D.; Borchert, S. Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Kinase Activity in Mesothelioma Cell Lines via Paracrine Signaling and Thereby Dictate Cell Faith and Behavior. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3278.
48. Ho, D. W. H.; Lam, W. L. M.; Chan, L. K.; Ng, I. O. L. Investigation of Functional Synergism of CENPF and FOXM1 Identifies POLD1 as Downstream Target in Hepatocellular Carcinoma. *Front. Med. (Lausanne)*. **2022**, *9*.
49. Zhang, L.; Yang, W.; Zhu, X.; Wei, C. P53 Inhibits the Expression of P125 and the Methylation of POLD1 Gene Promoter by Downregulating the Sp1-Induced DNMT1 Activities in Breast Cancer. *Onco. Targets Ther.* **2016**, *9*, 1351–1360.
50. Nicolas, E.; Golemis, E. A.; Arora, S. POLD1: Central Mediator of DNA Replication and Repair, and Implication in Cancer and Other Pathologies. *Gene*. **2016**, *590*, 128–141.
51. Karkhanis, V.; Wang, L.; Tae, S.; Hu, Y. J.; Imbalzano, A. N.; Sif, S. Protein Arginine Methyltransferase 7 Regulates Cellular Response to DNA Damage by Methylating Promoter Histones H2A and H4 of the Polymerase δ Catalytic Subunit Gene, POLD1. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29801–29814.
52. Xu, Y.; Qin, Q.; Chen, R.; Wei, C.; Mo, Q. SIRT1 Promotes Proliferation, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cell Line MCF-7 by Upregulating DNA Polymerase Delta1 (POLD1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *502*, 351–357.
53. Tumini, E.; Barroso, S.; Pérez-Calero, C.; Aguilera, A. Roles of Human POLD1 and POLD3 in Genome Stability. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13.
54. Tubbs, A.; Nussenzweig, A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell*. **2017**, *169*, 644–656.
55. Matsuoka, S.; Ballif, B. A.; Smogorzewska, A.; Robert, E.; Iii, M.; Hurov, K. E.; Luo, J.; Corey, ; Bakalarski, E.; Zhao, Z.; Solimini, N.; Lerenthal, Y.; Shiloh, Y.; Gygi, S. P.; Elledge, S. J. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science*. **2007**, *316*, 1160–1166.
56. Blackford, A. N.; Jackson, S. P. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell*. **2017**, *66*, 801–817.
57. Watson, J. V.; Chambers, S. H.; Smith, P. J. A Pragmatic Approach to the Analysis of DNA Histograms with a Definable G1 Peak. *Cytometry*. **1987**, *8*, 1–8.
58. Sakaue-Sawano, A.; Kurokawa, H.; Morimura, T.; Hanyu, A.; Hama, H.; Osawa, H.; Kashiwagi, S.; Fukami, K.; Miyata, T.; Miyoshi, H.; Imamura, T.; Ogawa, M.; Masai, H.; Miyawaki, A. Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*. **2008**, *132*, 487–498.
59. Mah, L.; Karagiannis, T. C. gammaH2AX : A Sensitive Molecular Marker of DNA Damage and Repair. *Leukemia*. **2010**, *24*, 679–686.

60. Azzarà, A.; Chiaramonte, A.; Filomeni, E.; Pinto, B.; Mazzoni, S.; Piaggi, S.; Guzzardi, M.; Bruschi, F.; Iozzo, P.; Scarpato, R. Increased Level of DNA Damage in Some Organs of Obese Zucker Rats by C-H2AX Analysis Alessia. *Environ. Mol. Mutagen.* **2010**, 405, 391–405.
61. Lim, Y.; Dorstyn, L.; Kumar, S. The P53-Caspase-2 Axis in the Cell Cycle and DNA Damage Response. *Exp. Mol. Med.* **2021**, 53, 517–527.
62. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S. A.; Abrams, J. M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E. S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D. W.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Antonov, A. V.; Arama, E.; Baehrecke, E. H.; Barlev, N. A.; Bazan, N. G.; Bernassola, F.; Bertrand, M. J. M.; Bianchi, K.; Blagosklonny, M. V.; Blomgren, K.; Borner, C.; Boya, P.; Brenner, C.; Campanella, M.; Candi, E.; Carmona-Gutierrez, D.; Cecconi, F.; Chan, F. K. M.; Chandel, N. S.; Cheng, E. H.; Chipuk, J. E.; Cidlowski, J. A.; Ciechanover, A.; Cohen, G. M.; Conrad, M.; Cubillos-Ruiz, J. R.; Czabotar, P. E.; D'Angiolella, V.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; De Laurenzi, V.; De Maria, R.; Debatin, K. M.; Deberardinis, R. J.; Deshmukh, M.; Di Daniele, N.; Di Virgilio, F.; Dixit, V. M.; Dixon, S. J.; Duckett, C. S.; Dynlacht, B. D.; El-Deiry, W. S.; Elrod, J. W.; Fimia, G. M.; Fulda, S.; García-Sáez, A. J.; Garg, A. D.; Garrido, C.; Gavathiotis, E.; Golstein, P.; Gottlieb, E.; Green, D. R.; Greene, L. A.; Gronemeyer, H.; Gross, A.; Hajnoczky, G.; Hardwick, J. M.; Harris, I. S.; Hengartner, M. O.; Hetz, C.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Joseph, B.; Jost, P. J.; Juin, P. P.; Kaiser, W. J.; Karin, M.; Kaufmann, T.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Kitsis, R. N.; Klionsky, D. J.; Knight, R. A.; Kumar, S.; Lee, S. W.; Lemasters, J. J.; Levine, B.; Linkermann, A.; Lipton, S. A.; Lockshin, R. A.; López-Otín, C.; Lowe, S. W.; Luedde, T.; Lugli, E.; MacFarlane, M.; Madeo, F.; Malewicz, M.; Malorni, W.; Manic, G.; Marine, J. C.; Martin, S. J.; Martinou, J. C.; Medema, J. P.; Mehlen, P.; Meier, P.; Melino, S.; Miao, E. A.; Molkentin, J. D.; Moll, U. M.; Muñoz-Pinedo, C.; Nagata, S.; Nuñez, G.; Oberst, A.; Oren, M.; Overholtzer, M.; Pagano, M.; Panaretakis, T.; Pasparakis, M.; Penninger, J. M.; Pereira, D. M.; Pervaiz, S.; Peter, M. E.; Piacentini, M.; Pinton, P.; Prehn, J. H. M.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G. A.; Rehm, M.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C. M. P.; Rubinsztein, D. C.; Rudel, T.; Ryan, K. M.; Sayan, E.; Scorrano, L.; Shao, F.; Shi, Y.; Silke, J.; Simon, H. U.; Sistigu, A.; Stockwell, B. R.; Strasser, A.; Szabadkai, G.; Tait, S. W. G.; Tang, D.; Tavernarakis, N.; Thorburn, A.; Tsujimoto, Y.; Turk, B.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P.; Vander Heiden, M. G.; Villunger, A.; Virgin, H. W.; Vousden, K. H.; Vucic, D.; Wagner, E. F.; Walczak, H.; Wallach, D.; Wang, Y.; Wells, J. A.; Wood, W.; Yuan, J.; Zakeri, Z.; Zhivotovsky, B.; Zitvogel, L.; Melino, G.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, 25, 486–541.
63. Jackson, S. P.; Bartek, J. The DNA-Damage Response in Human Biology and Disease. *Nature.* **2009**, 461, 1071–1078.
64. Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Andreau, K.; Medema, R.; Kroemer, G. Cell Death by Mitotic Catastrophe: A Molecular Definition. *Oncogene.* **2004**, 23, 2825–2837.
65. O'Connor, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Mol. Cell.* **2015**, 60, 547–560.
66. Visconti, R.; Della Monica, R.; Grieco, D. Cell Cycle Checkpoint in Cancer: A Therapeutically Targetable Double-Edged Sword. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, 35, 153

67. Rai, R.; Peng, G.; Li, K.; Lin, S. Y. DNA Damage Response: The Players, the Network and the Role in Tumor Suppression. *Cancer Genomics Proteomics*. **2007**, *4*, 99–106.
68. Tan, J.; Sun, X.; Zhao, H.; Guan, H.; Gao, S.; Zhou, P. K. Double-Strand DNA Break Repair: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *MedComm*. **2023**, *4*, 388.
69. Huang, A.; Garraway, L. A.; Ashworth, A.; Weber, B. Synthetic Lethality as an Engine for Cancer Drug Target Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2020**, *19*, 23–38.
70. O’Neil, N. J.; Bailey, M. L.; Hieter, P. Synthetic Lethality and Cancer. *Nat. Rev. Genet*. **2017**, *18*, 613–623.
71. Lord, C. J.; Ashworth, A. PARP Inhibitors: Synthetic Lethality in the Clinic. *Science*. **2017**, *355*, 1152–1158.
72. Satoh, M. S.; Lindahl, T. Role of Poly (ADP-Ribose) Formation in DNA Repair. *Nature*. **1992**, *356*, 356–358.
73. Mateo, J.; Carreira, S.; Sandhu, S.; Miranda, S.; Mossop, H.; Perez-Lopez, R.; Nava Rodrigues, D.; Robinson, D.; Omlin, A.; Tunariu, N.; Boysen, G.; Porta, N.; Flohr, P.; Gillman, A.; Figueiredo, I.; Paulding, C.; Seed, G.; Jain, S.; Ralph, C.; Protheroe, A.; Hussain, S.; Jones, R.; Elliott, T.; McGovern, U.; Bianchini, D.; Goodall, J.; Zafeiriou, Z.; Williamson, C. T.; Ferraldeschi, R.; Riisnaes, R.; Ebbs, B.; Fowler, G.; Roda, D.; Yuan, W.; Wu, Y.-M.; Cao, X.; Brough, R.; Pemberton, H.; A’Hern, R.; Swain, A.; Kunju, L. P.; Eeles, R.; Attard, G.; Lord, C. J.; Ashworth, A.; Rubin, M. A.; Knudsen, K. E.; Feng, F. Y.; Chinnaiyan, A. M.; Hall, E.; de Bono, J. S. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med*. **2015**, *373*, 1697–1708.
74. McCabe, N.; Turner, N. C.; Lord, C. J.; Kluzek, K.; Białkowska, A.; Swift, S.; Giavara, S.; O’Connor, M. J.; Tutt, A. N.; Zdzienicka, M. Z.; Smith, G. C. M.; Ashworth, A. Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination and Sensitivity to Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Res*. **2006**, *66*, 8109–8115.
75. Hakiri, S.; Osada, H.; Ishiguro, F.; Murakami, H.; Murakami-Tonami, Y.; Yokoi, K.; Sekido, Y. Functional Differences between Wild-Type and Mutant-Type BRCA1-Associated Protein 1 Tumor Suppressor against Malignant Mesothelioma Cells. *Cancer Sci*. **2015**, *106*, 990–999.
76. Bononi, A.; Giorgi, C.; Patergnani, S.; Larson, D.; Verbruggen, K.; Tanji, M.; Pellegrini, L.; Signorato, V.; Olivetto, F.; Pastorino, S.; Nasu, M.; Napolitano, A.; Gaudino, G.; Morris, P.; Sakamoto, G.; Ferris, L. K.; Danese, A.; Raimondi, A.; Tacchetti, C.; Kuchay, S.; Pass, H. I.; Affar, E. B.; Yang, H.; Pinton, P.; Carbone, M. BAP1 Regulates IP3R3-Mediated Ca²⁺ Flux to Mitochondria Suppressing Cell Transformation. *Nature*, **2017**, *546*, 549–553.
77. Kwon, J.; Lee, D.; Lee, S. A. BAP1 as a Guardian of Genome Stability: Implications in Human Cancer. *Exp. Mol. Med*. **2023**, *55*, 745–754.
78. Iwakawa, H. oki; Tomari, Y. Life of RISC: Formation, Action, and Degradation of RNA-Induced Silencing Complex. *Mol. Cell*. **2022**, *82*, 30–43.
79. Lares, M. R.; Rossi, J. J.; Ouellet, D. L. RNAi and Small Interfering RNAs in Human Disease Therapeutic Applications. *Trends Biotechnol*. **2010**, *28*, 570–579.

80. Rocco, G. Di; Verdina, A.; Gatti, V.; Virdia, I.; Toietta, G.; Todaro, M.; Stassi, G.; Soddu, S. Apoptosis Induced by a HIPK2 Full-Length-Specific SiRNA Is Due to off-Target Effects Rather than Prevalence of HIPK2- Δ e8 Isoform. *Oncotarget*. **2016**, 7, 1675–1686.
81. Fath, S.; Bauer, A. P.; Liss, M.; Spriestersbach, A.; Maertens, B.; Hahn, P.; Ludwig, C.; Schäfer, F.; Graf, M.; Wagner, R. Multiparameter RNA and Codon Optimization: A Standardized Tool to Assess and Enhance Autologous Mammalian Gene Expression. *PLoS One*. **2011**, 6, 17596.
82. Hocke, S.; Guo, Y.; Job, A.; Orth, M.; Ziesch, A.; Lauber, K.; De Toni, E. N.; Gress, T. M.; Herbst, A.; Göke, B.; Gallmeier, E. A Synthetic Lethal Screen Identifies ATR-Inhibition as a Novel Therapeutic Approach for POLD1-Deficient Cancers. *Oncotarget*. **2016**, 7, 7080-7095
83. Job, A.; Tatura, M.; Schäfer, C.; Lutz, V.; Schneider, H.; Lankat-Buttgereit, B.; Zielinski, A.; Borgmann, K.; Bauer, C.; Gress, T. M.; Buchholz, M.; Gallmeier, E. The POLD1R689W Variant Increases the Sensitivity of Colorectal Cancer Cells to ATR and CHK1 Inhibitors. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 18924.