The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PRIMA-1 induces p53-mediated apoptosis by upregulating Noxa in esophageal squamous cell carcinoma with TP53 missense mutation
Author(s)	古川, 陽菜
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69429
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　古川　陽菜

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	土岐 祐一郎
	副　査	大阪大学教授	奥山 宏臣
	副　査	大阪大学教授	猪股 雅史

論文審査の結果の要旨

本論文は，食道扁平上皮癌における変異p53機能回復薬PRIMA-1の抗腫瘍効果および作用機序についてin vitroおよびin vivoにおける抗腫瘍効果およびメカニズムについて検討した論文である．In vitroにおいて，PRIMA-1はmissense変異を有する食道癌細胞株に特異的に抗腫瘍効果およびApoptosisを誘導し，そのApoptosis誘導にはp53下流遺伝子のNoxaが主に関与していることが示された．また，p53 missense変異株の皮下腫瘍モデルにおけるPRIMA-1単独においてプラセボ群と比較して有意な抗腫瘍効果が示された．本研究で，PRIMA-1の食道扁平上皮癌細胞株に対するin vitroおよびin vivoの双方における抗腫瘍効果とそのメカニズムが明らかとなり，難治性で予後不良な食道扁平上皮癌おける新規治療薬の可能性が示唆されるものであり，学位に値するものと認める．

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	古川　陽菜
論文題名 Title	PRIMA-1 induces p53-mediated apoptosis by upregulating Noxa in esophageal squamous cell carcinoma with TP53 missense mutation (PRIMA-1はp53missense変異型食道扁平上皮癌においてNoxaを介したapoptosisを誘導する)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

食道扁平上皮癌は消化器癌の中でも難治性で予後不良なため，有効な新規治療薬の開発が期待されている．TP53はヒト染色体17p13.1に位置する癌抑制遺伝子で，細胞が遺伝的毒性を伴うストレスを受けた場合にDNA修復や細胞周期の停止，apoptosis誘導など腫瘍抑制性の転写因子として働く．p53はヒト腫瘍において50％以上に変異を認め悪性度，治療効果や予後に関連するとされるが，なかでも食道扁平上皮癌における変異頻度は90％以上と極めて高い．近年，変異p53を発現する細胞を用いた化合物ライブラリーのスクリーニングにより同定されたPRIMA-1 (p53 re-activation and induction of massive apoptosis)は，変異p53の構造変化を起こすことで機能回復させp53標的遺伝子の転写を促進しapoptosisを誘導すると言われている．現在，一部の癌種ではPRIMA-1の臨床試験が進行中であるが，PRIMA-1の詳細な作用機序や消化器癌における有効性についてはいまだ明らかにされていない．本研究では，食道扁平上皮癌におけるPRIMA-1の抗腫瘍効果およびその作用機序について検討した．

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

食道扁平上皮癌細胞株11株(TE1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 14, KYSE410, 960)のp53 statusをDirect sequence法で同定したところ，全11株中7株がmissense変異，1株がframeshift変異，1株がnonsense変異株であり，残りの2株はwild type株であった．次に食道扁平上皮癌細胞株にPRIMA-1の単独投与を行ったところ，p53 missense変異株においてはその他の細胞株(wild type株・frameshift/nonsense変異株)と比較して著明な抗腫瘍効果を示した(missense変異株 vs その他; MTT assayによる平均IC_{50}値 16.2 vs 73.6 μM, $P < 0.001$)．またapoptosis assayでもp53 missense変異株はその他の株と比較し著明なapoptosisが誘導された(PRIMA投与濃度50μMでのmissense変異株TE1 vs wild type株KYSE410のapoptosis割合 79.1 vs 8.1%)．続いてPRIMA-1の作用分子機序の検討として，apoptosisに関連するp53標的遺伝子(p21, Noxa, Bax)についてWestern blottingを行ったところ，PRIMA-1投与(濃度：50μM)でp53 missense変異株(TE1, 8, 10) において共通してcleaved PARPおよびNoxaの発現上昇が見られたが，p53 wild type株およびframeshift/nonsense変異株ではそれらの発現上昇は認めなかった．次にp53 missense変異株においてsiRNAによりp53をknockdownすると，PRIMA-1投与によるcleaved PARPおよびNoxaの発現上昇は認めなくなった．これらの結果から，PRIMA-1は主にNoxaを介してapoptosisを誘導すると推測し，p53 missense変異株においてsiRNAによりNoxaをknockdownするとPRIMA-1投与によるcleaved PARPの発現上昇が抑制され，apoptosis assayおよびMTT assayにおいてもapoptosis誘導および細胞増殖が抑制された．また，p53 missense変異株においてsiRNAによりp53をknockdownすると，Noxaをknockdownした際と同程度のapoptosis誘導の抑制が認められた．さらにin vivoにて，p53 missense変異株(TE8)を用いたXenograft mouseに対して，PRIMA-1の投与(50mg/kg/day 10日間投与)を行った．PRIMA-1投与群では，プラセボ群と比較し有意な抗腫瘍効果を認め(Day10での腫瘍体積 898.7 vs 523.3mm^3, P =0.036)，摘出腫瘍の免疫染色およびWestern blottingによりプラセボ群と比較して有意なapoptosisの誘導が確認された．

〔総　括(Conclusion)〕

PRIMA-1はp53 missense変異を有する食道扁平上皮癌細胞株に対して，in vitroおよびin vivoの双方において著明な抗腫瘍効果を示し，これには主にNoxaを介したapoptosisの誘導が関連していた．したがってその高いp53 missense変異率からも，食道扁平上皮癌においてPRIMA-1が有効な治療薬のひとつとなる可能性が示唆された．