

Title	APR-246 induces apoptosis and enhances chemo-sensitivity via activation of ROS and TAp73-Noxa signal in oesophageal squamous cell cancer with TP53 missense mutation
Author(s)	小林, 照之
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/87722">https://hdl.handle.net/11094/87722</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	小林 照之
論文題名 Title	<b>APR-246 induces apoptosis and enhances chemo-sensitivity via activation of ROS and TAp73-Noxa signal in oesophageal squamous cell cancer with TP53 missense mutation</b> (APR-246はp53ミスセンス変異を有する食道扁平上皮癌においてROS、TAp73-Noxa経路の活性を介したアポトーシスを誘導し化学療法感受性を増強する)
論文内容の要旨	
<p>〔目的 (Purpose)〕 食道扁平上皮癌はp53遺伝子の変異頻度が約9割と極めて高く、その大部分はミスセンス変異が占める。p53遺伝子変異は癌の悪性度や治療抵抗性に関わるとされ、重要な治療標的となり得る。本研究では食道扁平上皮癌に対する変異 p53機能回復薬APR-246の作用機序および化学療法との併用効果について検討した。</p> <p>〔方法 (Methods)〕 In vitroでは異なったp53 statusの食道扁平上皮癌細胞株 (p53野生株: KYSE410 KYSE960、p53ミスセンス変異株: TE1, 4, 5, 8, 10、p53フレームシフト変異株: TE9、p53ナンセンス変異株: TE14) を用いてAPR-246投与によるcell viability/apoptosisアッセイ、ROS評価、p53 family (p63/73) やapoptosis関連シグナル (Western Blot) を評価した。さらに、APR-246と化学療法 (DTX、5-FU、CDDP) との併用投与による抗腫瘍効果 (isobologram法) および関連シグナルの発現解析を行った。In vivoでは、食道扁平上皮癌細胞株 (KYSE410、TE8) を用いた皮下腫瘍モデル、食道扁平上皮癌患者の腫瘍組織由来のPatient Derived Xenograft (PDX) モデルを用いたAPR-246の抗腫瘍効果をそれぞれ評価した。</p> <p>〔成績 (Results)〕 食道扁平上皮癌細胞株に対するAPR-246単剤のIC<sub>50</sub>はp53ミスセンス変異株で低く (TE1/4/5/8/10 = 10.5/9.9/14.3/7.9/11.7 μmol/L)、それ以外のp53フレームシフト・ナンセンス、野生株では概ね高値であった (IC<sub>50</sub>: TE9/14 = 34.6/24.3, KYSE410/960 = 31.6/20.8 μmol/L)。p53ミスセンス変異株においては、APR-246単剤投与によりp73、とくにTAp73およびNoxa発現、ROS活性の上昇を認め、apoptosisの指標となる cleaved PARPが強く誘導された。これらの現象はN-アセチルシステインをAPR-246と併用投与することでキャンセルされた。さらに、NoxaのsiRNAによるknock down下ではAPR-246投与によるapoptosis誘導、cleaved PARP発現上昇は減弱し、またp73のsiRNAによるknock down下ではAPR-246投与によるNoxa・cleaved PARP上昇がそれぞれ抑制され、apoptosis誘導が減弱した。一方で、p53野生株ではNoxaまたはp73のsiRNAによるknock down下でもこれらの現象は認めなかったことから、食道扁平上皮癌に対するAPR-246単剤の作用機序としてp53ミスセンス変異株に選択的なROS活性の上昇およびp73・Noxa発現上昇によるapoptosis誘導が重要であると考えられた。化学療法との併用効果に関しては、とくにp53ミスセンス変異株において相加または相乗効果を認めたが、とくに5-FUとの併用で顕著であった [Combination Index = 0.58-0.72 (0.8以下で相乗効果)]。これは、APR-246と5-FUとの併用投与でAPR-246によるROS活性の誘導がさらに増強し、p73-Noxa経路を介したapoptosis誘導が一段と高まったことが寄与した。in vivoにおいても、p53ミスセンス変異株 (TE8) の皮下腫瘍モデルでのみAPR-246と5-FUの併用効果 (腫瘍volume: 5FU/APR-246/APR-246+5FU = 358/330/99mm<sup>3</sup>) がみられ、腫瘍組織ではROS活性の誘導およびp73・Noxa発現上昇によるapoptosisの増強を認めた。さらにexon5, 7のミスセンス変異を伴う食道扁平上皮癌患者由来腫瘍を用いたPDXモデルにおいても同様にAPR-246+5-FUの併用効果 (腫瘍volume: 5FU/APR-246/APR-246+5FU = 358/274/104mm<sup>3</sup>) を認め、腫瘍組織においてROS活性の増強、p73/Noxa発現上昇およびapoptosisが誘導されていた。</p> <p>〔総括 (Conclusion)〕 食道扁平上皮癌に対するAPR-246は、p53ミスセンス変異株特異的なROS産生を介したp73-Noxa上昇によるapoptosis誘導が主な作用機序であり、化学療法でもとくに5-FUと併用することで抗腫瘍効果およびこれらのシグナル変化が一層増強されることが示唆された。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小林 照之	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 土岐 祐一郎
	副 査 大阪大学教授 猪俣 寿典
	副 査 大阪大学教授 岩島 晴彦
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>食道扁平上皮癌はp53遺伝子の変異頻度が約9割と極めて高く、その大部分はミスセンス変異が占める。p53遺伝子変異は癌の治療抵抗性に関わるとされ、重要な治療標的となり得る。本研究では食道扁平上皮癌に対する変異 p53機能回復薬APR-246の作用機序および化学療法との併用効果について示すものである。p53ミスセンス変異株を用いた検討においては、APR-246単剤投与によりp73、Noxa発現、ROS活性の上昇を認め、apoptosisが強く誘導された。これらの現象はROS阻害剤をAPR-246と併用投与することでキャンセルされた。さらに、Noxaのknock down下ではAPR-246投与によるapoptosis誘導は減弱し、p73のknock down下ではAPR-246投与によるNoxa上昇が抑制され、apoptosis誘導が減弱した。化学療法との併用効果に関しては、p53ミスセンス変異株において相加以上の効果を認め、とくに5-FU併用で相乗効果を多く認めた。in vivoにおいて、皮下腫瘍モデル、食道扁平上皮癌患者由来腫瘍を用いたPDXモデルにおいても同様にAPR-246と5-FUとの併用効果を認め、腫瘍組織においてROS活性の増強、p73/Noxa発現上昇およびapoptosisが誘導されていた。本研究の結果は、食道扁平上皮癌に対する新規治療薬としての可能性について示唆するものであり、学位の授与に値すると考えられた。</p>	