

ライフサイエンス～医療系大学～ 新技術説明会

$\Delta Np63\alpha$ ノックダウンによる 放射線抵抗細胞のアポトーシス亢進

福島県立医科大学 医学部 放射線生命科学講座

助教 工藤健一

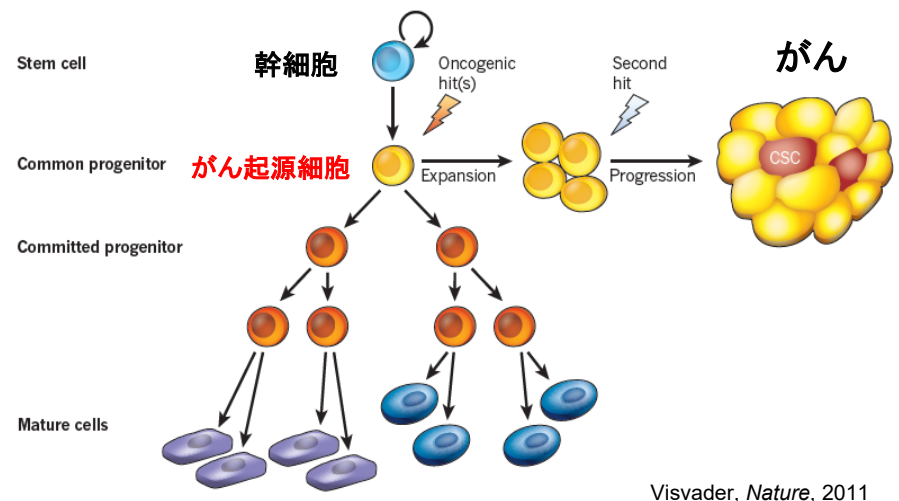
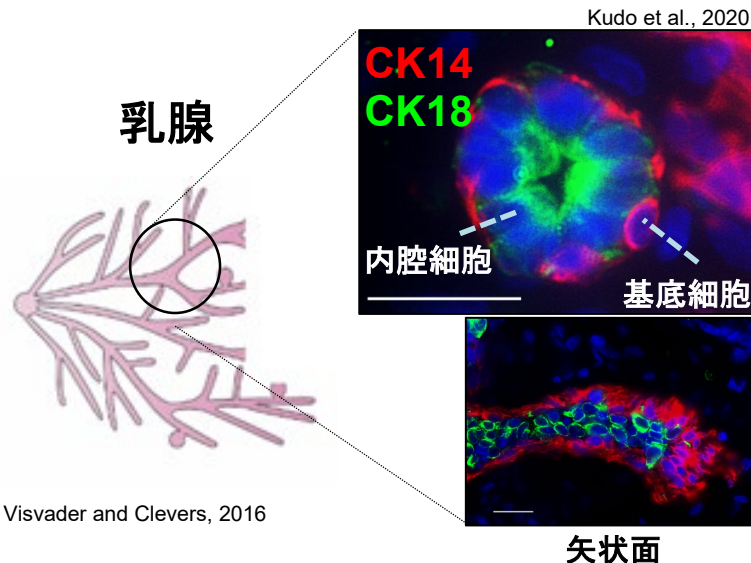
2022年12月8日

発表の概要

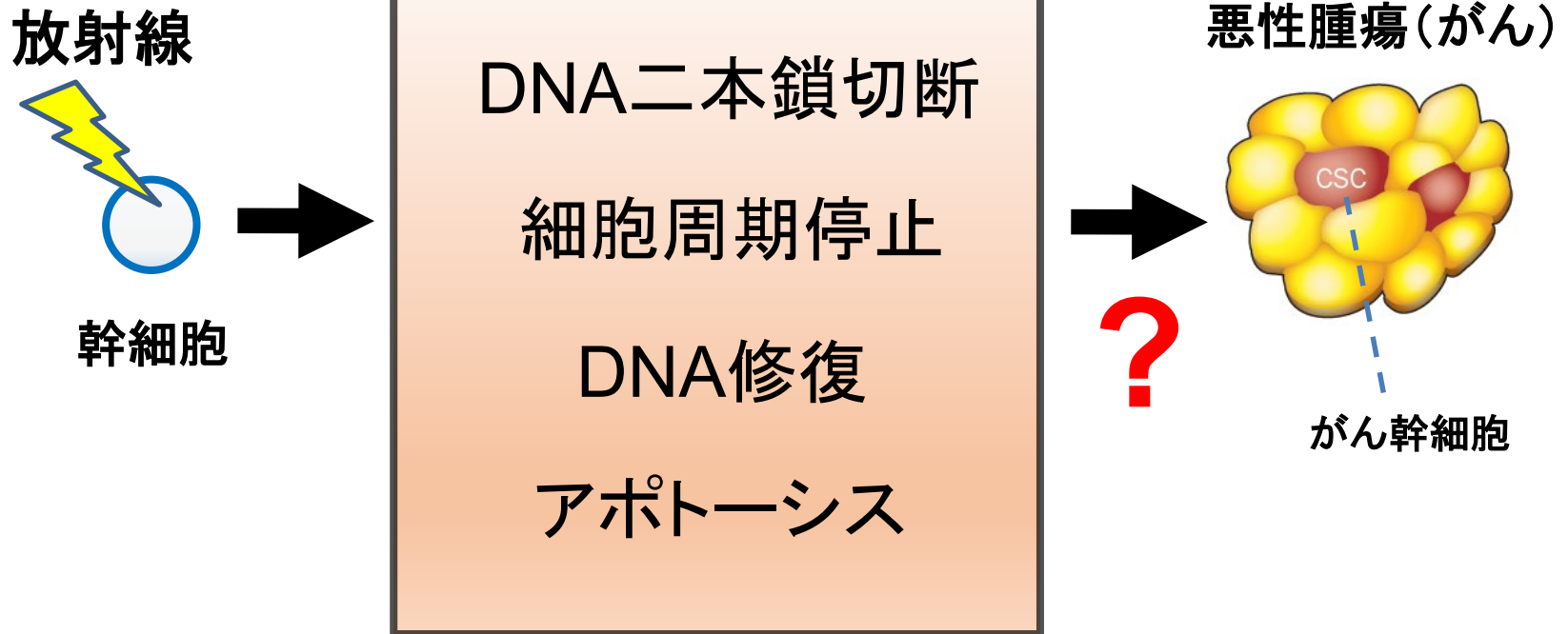
1. 出願者は思春期ラット雌の初代乳腺細胞をフローサイトメリー解析などの手法で分析し、乳腺上皮の基底細胞は内腔細胞に比べて放射線に著しく抵抗性であることを明らかにした (Kudoら, *Radiat. Res.* 2020)
2. 出願者は、さらに $\Delta Np63\alpha$ を発現するヒト乳腺上皮細胞を用いてノックダウン実験を行い、その放射線抵抗性の原因を $\Delta Np63\alpha$ がDNA損傷応答時p53の働きを転写的に阻害するためと結論付けた (Kudoら, *Radiat. Oncol.* 2022)
3. これにより、扁平上皮がんのような $\Delta Np63\alpha$ を高発現するがん組織に対し、 $\Delta Np63\alpha$ ノックダウンによって効果的な放射線治療および化学療法を行うことが期待できる

私の研究課題： 放射線誘発乳がん

- 放射線影響研究所が実施した原爆被爆者コホート調査により、乳腺が放射線誘発がんに対して感受性であることがわかった (Prestonら, 2007)
- 発癌中心である乳腺上皮は基底細胞と内腔細胞から構成される。このうち幹細胞は基底細胞に含まれる (Stinglら, 2006)
- 幹細胞は長い時間をかけて他の細胞へ分化していく。その過程で遺伝子変異が蓄積し、癌起源細胞へ変異すると言われている (Visvader 2011)

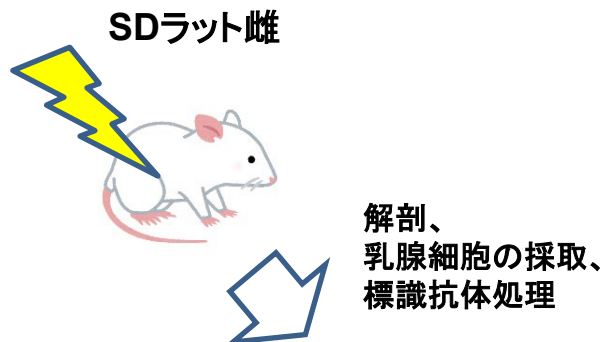


DNA損傷応答



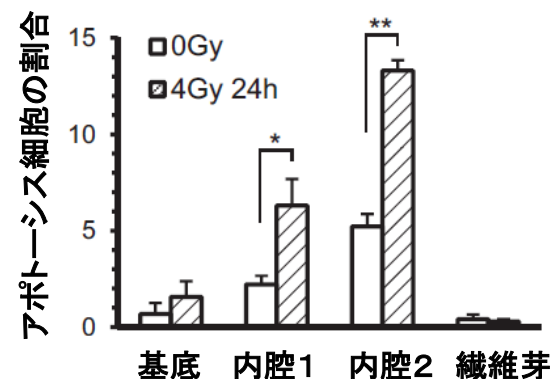
核心をなす学術的問い: 放射線誘発がんの発生は照射後に起こる幹細胞のDNA損傷応答異常に起因するのではないか?

ラット乳腺を対象とした放射線誘発アポトーシスの解析

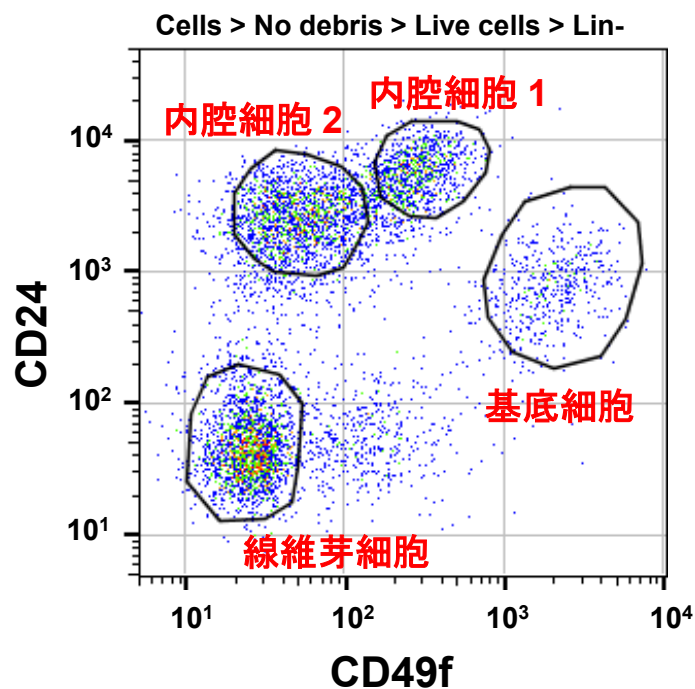


*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

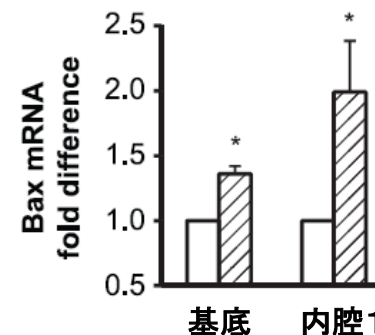
・フローサイトメトリー解析



アポトーシス解析

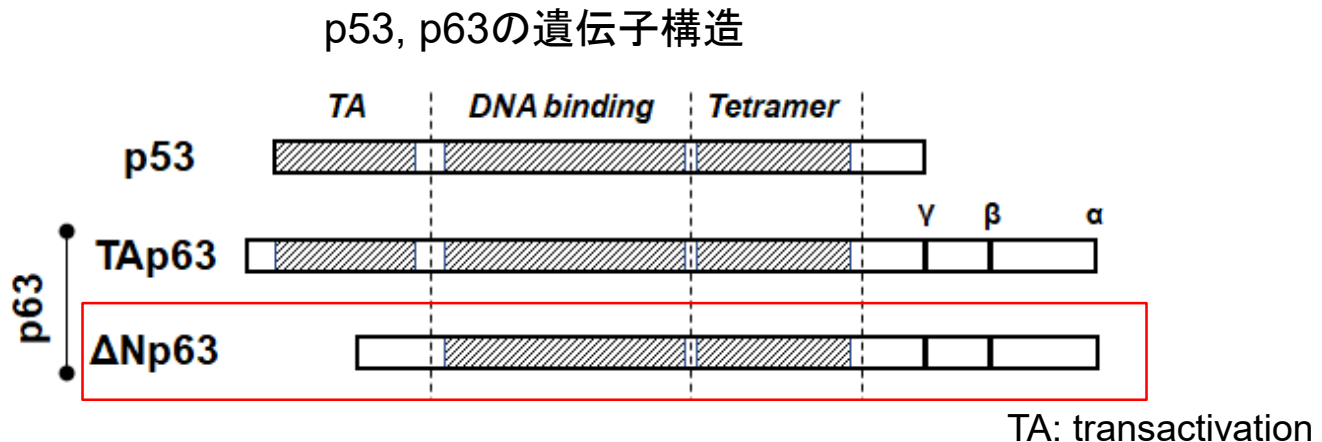


・RT-qPCR



$\Delta Np63\alpha$ について

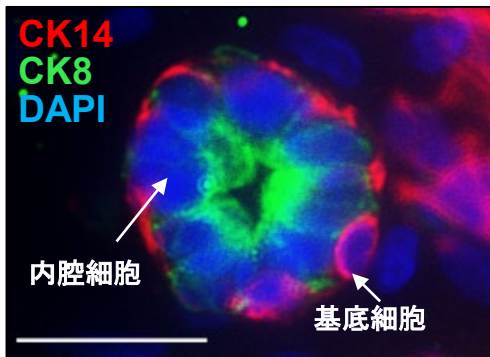
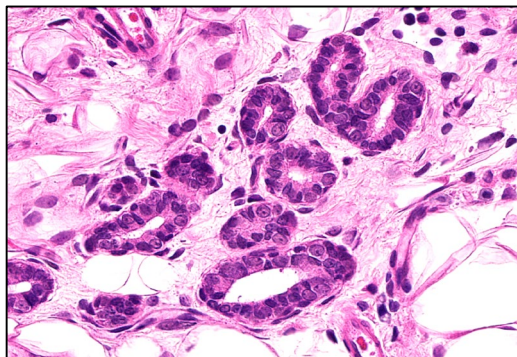
- $TP63$ は $TP53$ のスーパーファミリー遺伝子の一つとして発見された (Yangら, 1998; Osadaら, 1998)
- $TP63$ は複数のスプライシングバリエントを持つ。 $\Delta Np63\alpha$ は ΔN 型の全長であり、乳腺・皮膚・肺など上皮組織の基底細胞に常時発現している



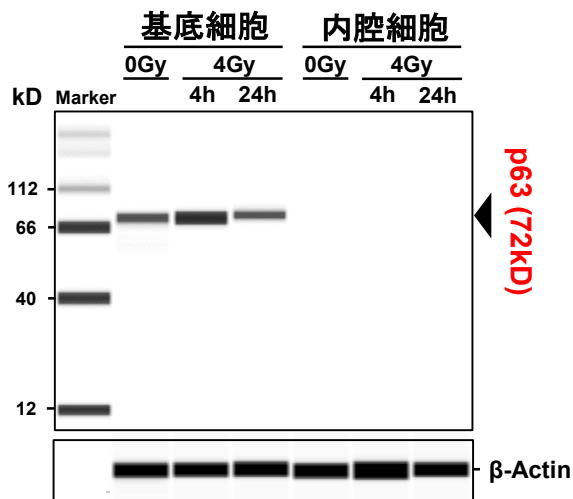
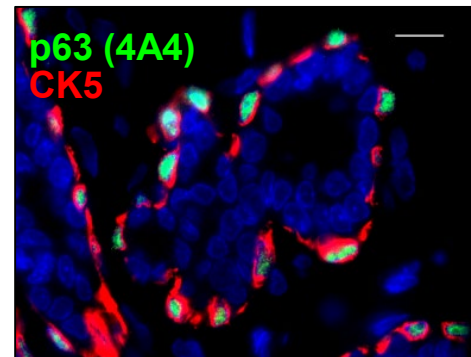
- ΔN 型は活性化部位(TA)が欠如している
- p53とDNA結合部位の相同性が高い

乳腺基底細胞のみ $\Delta Np63\alpha$ を発現している

HE染色

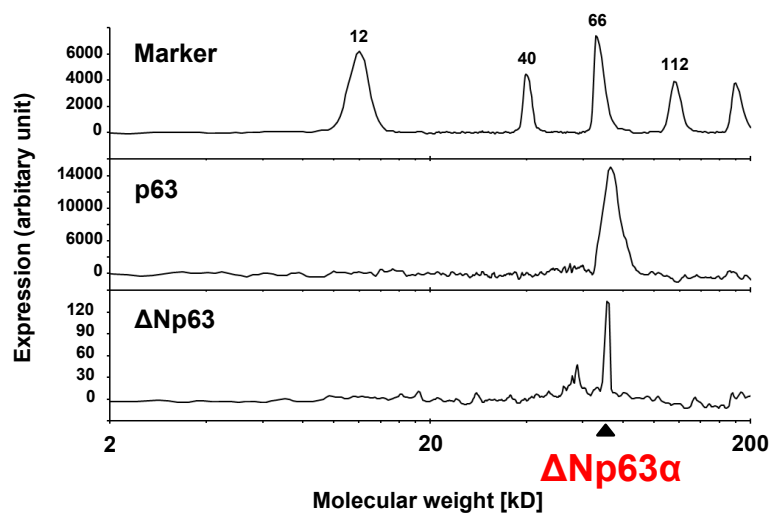


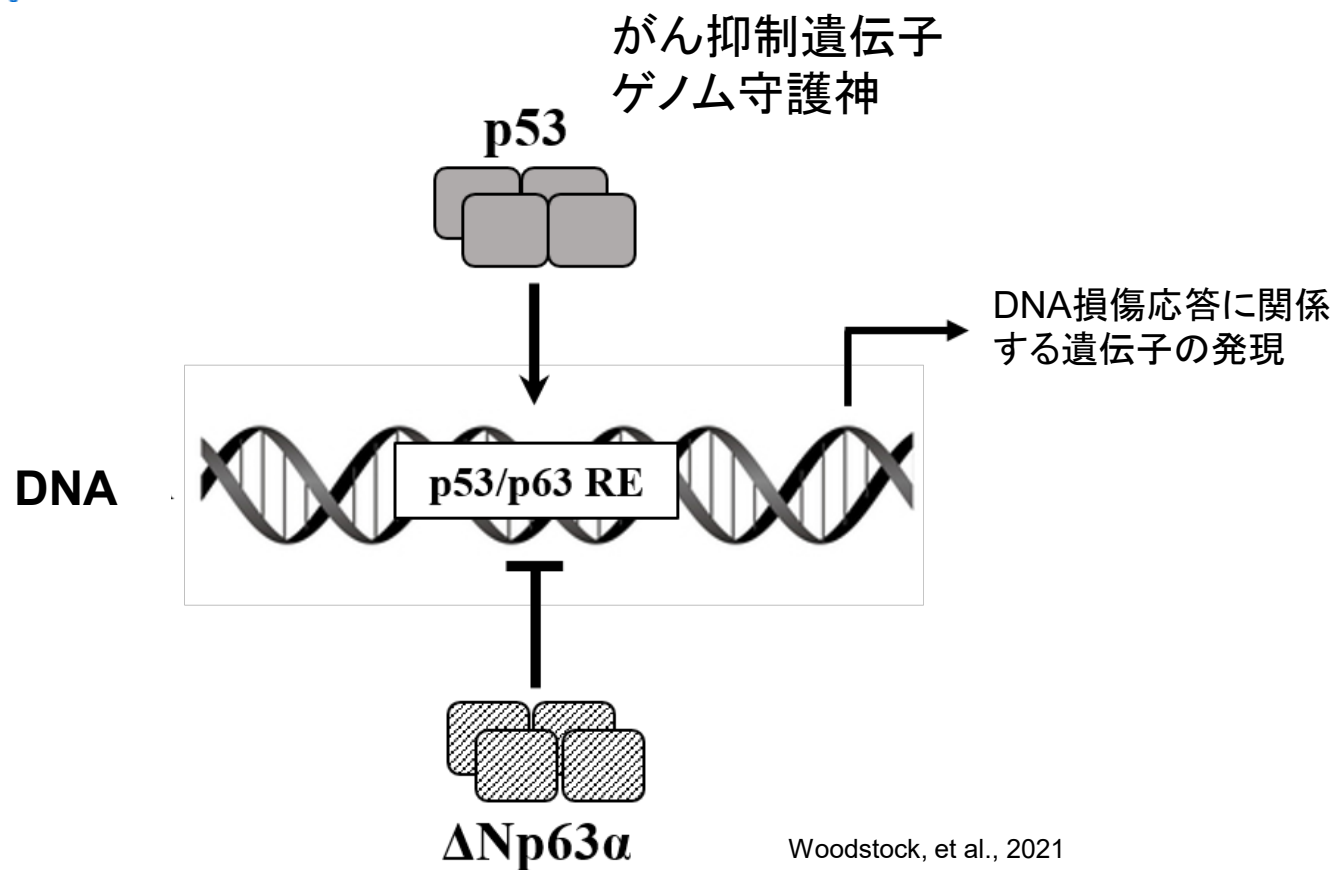
基底細胞でp63が発現している



Simple westernによるタンパク質分析

分子量とマーカから $\Delta Np63\alpha$ と認められた



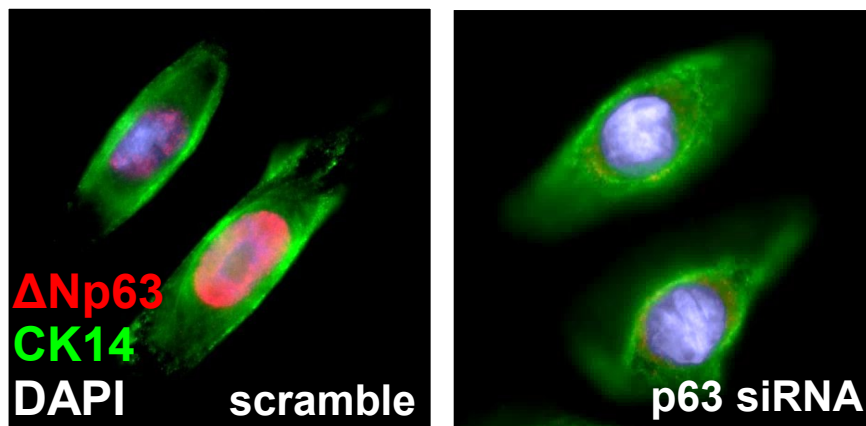


Woodstock, et al., 2021

DNA結合部位の相同性が高いことから、発見時よりΔN型は
p53の働きを競合的に阻害すると言われてきた (Westfallら, 2003など)

ヒト乳腺上皮細胞(HMECs)を用いたp63ノックダウン実験

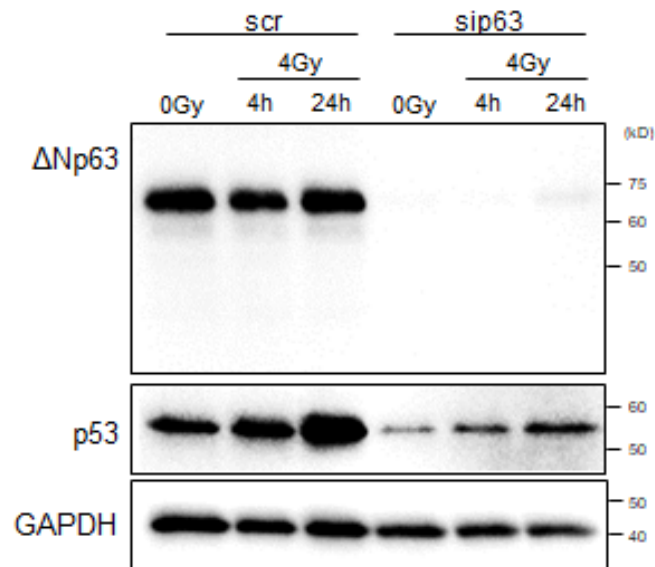
siRNAによる Δ Np63の発現抑制



Δ Np63減少は48時間程度まで持続した

HMEC (ThermoFisher Scientificより購入)

- Adult Human (30代女性)
- Mammary epithelial cells
- Single donor
- Passage 6 th (購入時)

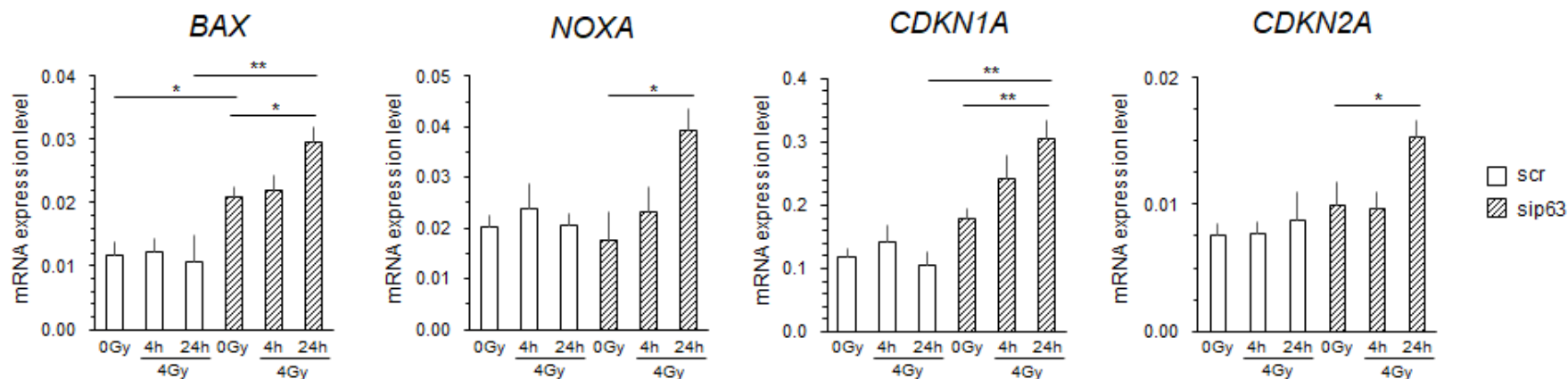


scr: scramble siRNA処理群

sip63: p63 siRNA処理群

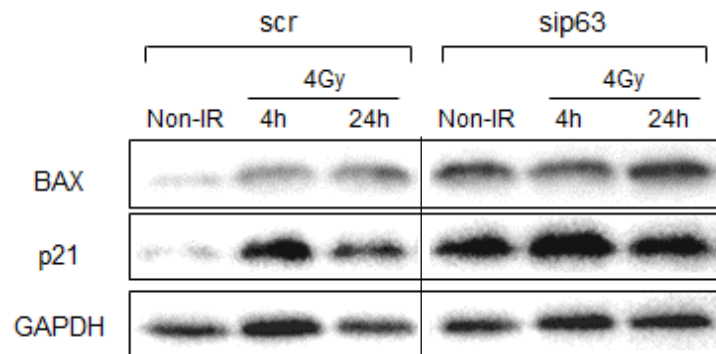
コントロール群とノックダウン群の両方で放射線照射後のp63発現変化は見られなかった
(実験中のp63発現量の安定性を確認した)

1. RT-qPCR



** : P<0.01, * : P<0.05

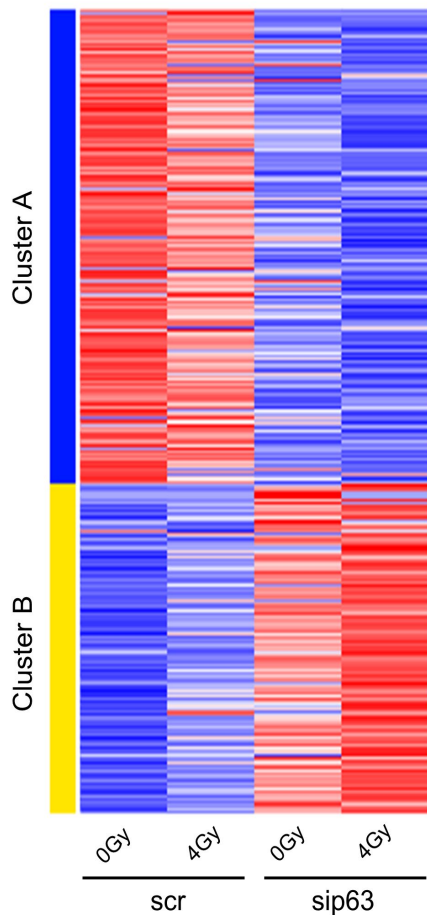
2. Western blotting



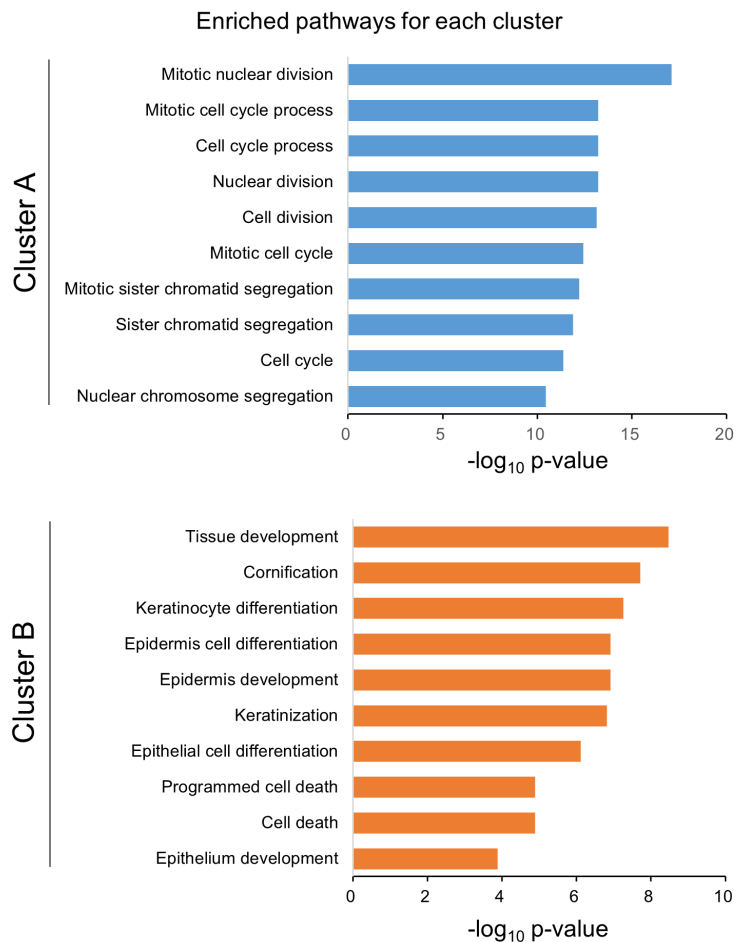
Δ Np63 α は放射線応答時、p53下流遺伝子を転写阻害し、発現を抑制している

3. RNA-seq解析

K-means clustering heatmaps



Gene Ontology Analysis



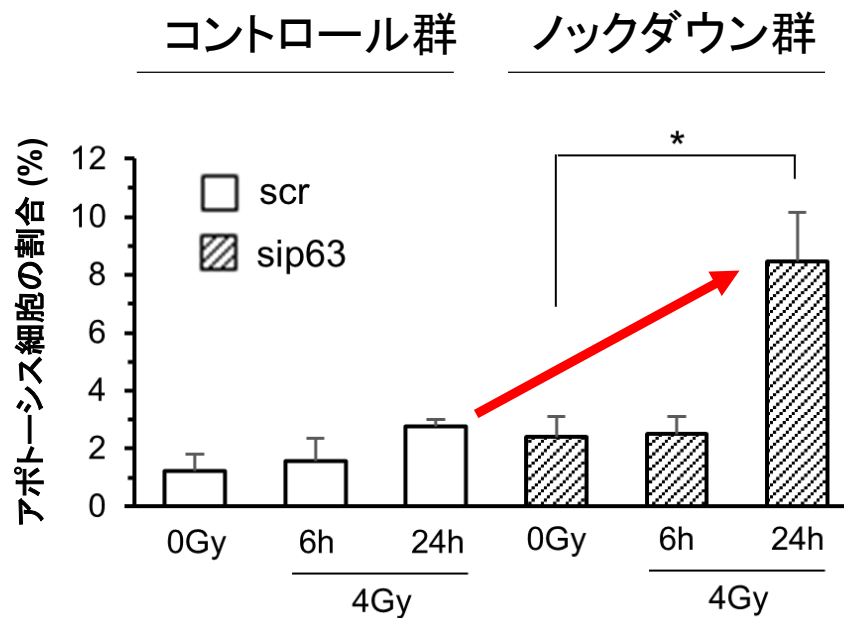
Δ Np63 α をノックダウンすることにより...

細胞周期や細胞増殖に関する遺伝子発現が減少

アポトーシスや細胞の分化に関する遺伝子発現が増加

Δ Np63 α は幹細胞性を保持して細胞増殖を促進し、アポトーシスを抑制する

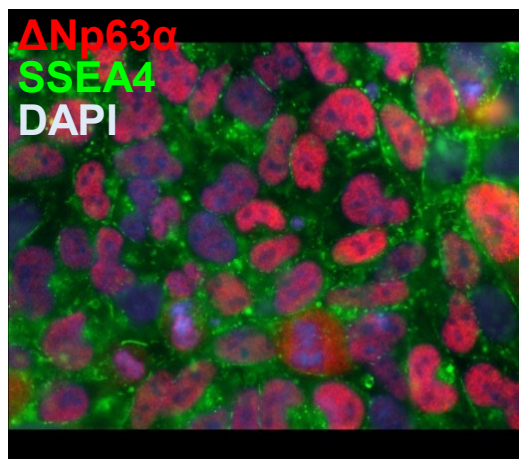
4. アポトーシス細胞の検出



ΔNp63αノックダウンによって
放射線誘発アポトーシスの割合が大幅に増加

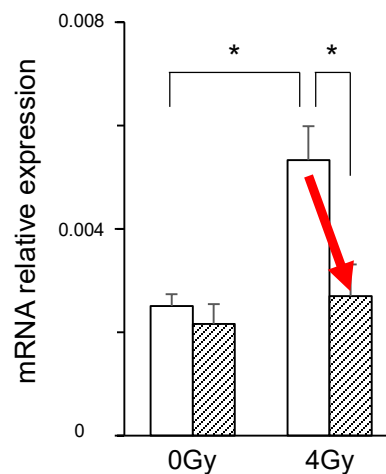
5. ヒトiPS細胞に対する異所性発現解析

Δ Np63 α の導入

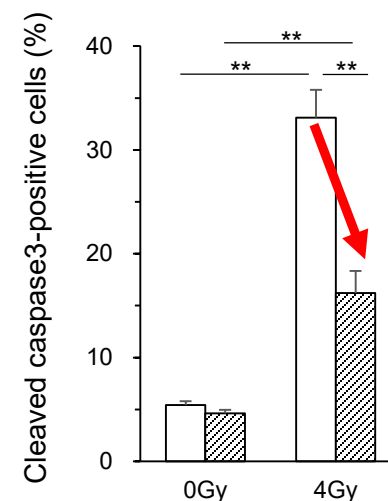


Δ Np63 α -expressing iPS cells

BAX発現解析



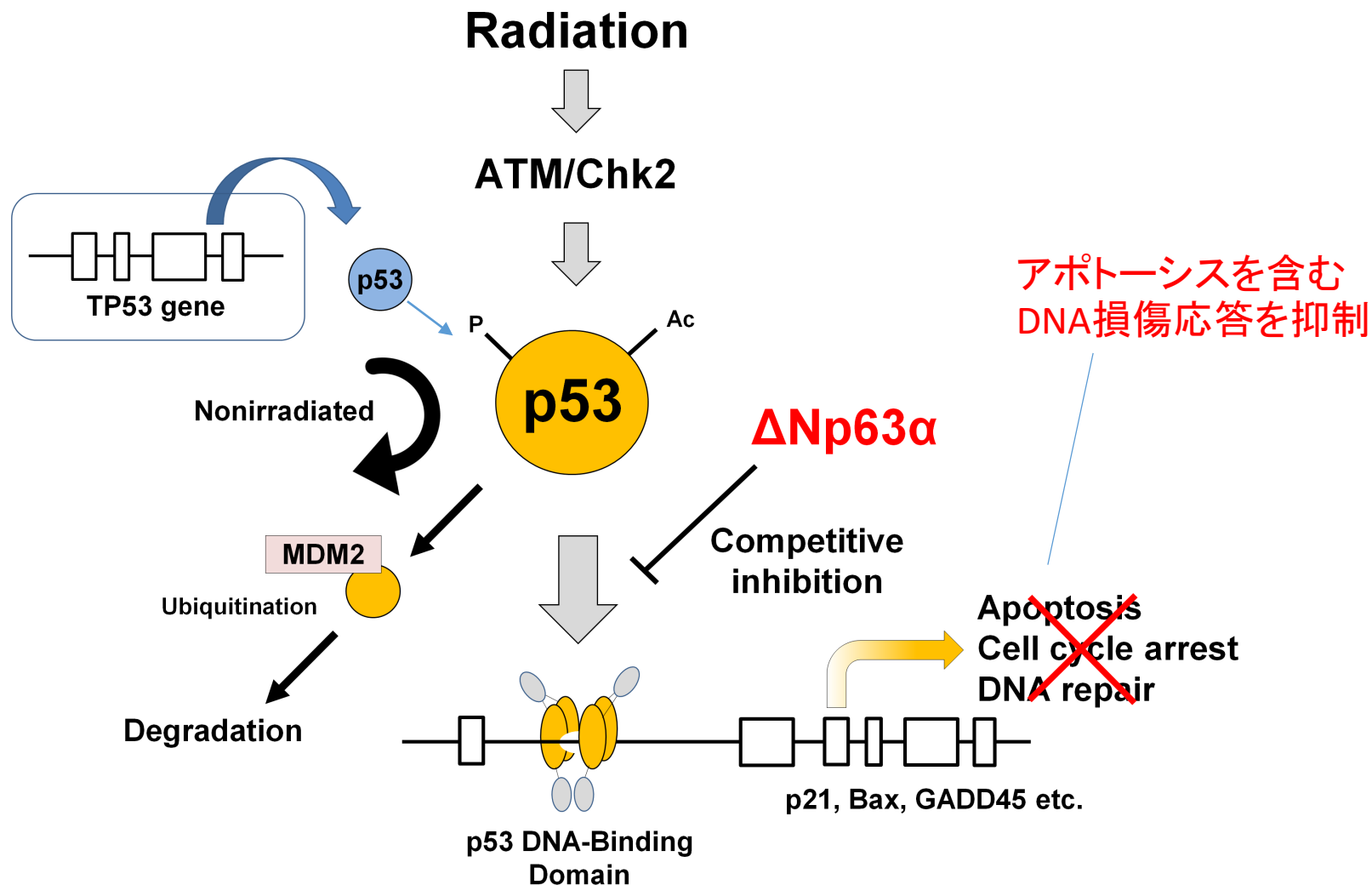
アポトーシス細胞の検出



- Δ Np63 α 非発現細胞
- ▨ Δ Np63 α 発現細胞

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$

Δ Np63 α 発現によってBAX発現が抑制され、放射線誘発アポトーシスが阻害された



新技術の特徴・想定される用途

1. 肺扁平上皮がんのような90%以上が Δ Np63 α に陽性であるがんに対し、ノックダウン処理後に放射線および薬剤によってDNA損傷を引き起こすことでアポトーシスを亢進する効果的な治療法を開発することが期待できる。また、その Δ Np63 α ノックダウンによって癌細胞の増殖活性を著しく下げることが期待できる。これにより、放射線治療に要する総線量を下げ、治療期間の短縮とともに正常組織への障害を防ぐことが期待できる
2. Δ Np63 α は四肢などの発生に関わるが臓器が完成すると役割はほとんどないためノックダウンのターゲットとしてより安全であると見なせる

企業への期待

1. $\Delta Np63\alpha$ はCRL4^{CRBN}によるユビキチン分解のターゲット分子であり、すでにサリドマイドによってノックダウン可能であることが確認されている(Asatsuma-Okumuraら, 2019)。現在、多発性骨髄腫の治療薬としてサリドマイド誘導体が開発されているので、企業の既存技術を用いて創薬開発が可能と考えられる
2. 今年、DNA脱メチル化剤によって $\Delta Np63\alpha$ がp53と類似した働きをするTAp63 α へスイッチ可能であることが発見された(Pokornaら, 2022)。したがって5-dAzaなどDNA脱メチル化剤から癌組織の $\Delta Np63\alpha$ をノックダウンする戦略も考えられる
3. ほかにヒストン脱アセチル化剤によるノックダウンも報告されており、多様な創薬開発が可能と考えられる

本技術に関する知的財産権

- ・発明の名称 : がん治療のための放射線増感剤
- ・出願番号 : 特願2022-142009
- ・出願人 : 福島県立医科大学
- ・発明者 : 工藤 健一

お問い合わせ先

**公立大学法人 福島県立医科大学
医療研究推進課 佐藤 浩樹**

T E L 024-547-1791

F A X 024-581-5163

e-mail bluebird@fmu.ac.jp