

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	病態制御科学領域 消化器内科学教育研究分野 氏名 村井 康久
<p>(論文題目)</p> <p>SLFN11 inactivation induces proteotoxic stress and sensitizes cancer cells to ubiquitin activating enzyme inhibitor TAK-243 (SLFN11 の不活性化はタンパク毒性によるストレスを生じ、ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 に対する腫瘍細胞の感受性を高める)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【背景・目的】</b>  <i>Schlafen</i> (SLFN ; シュラーフェン) は、眠る”to sleep”というドイツ語に由来しており、そのファミリー遺伝子は哺乳類にのみ発現し細胞増殖や細胞周期の調節、ウイルス感染に対する自然免疫応答等に関与している。複数の癌細胞株のデータベースより、SLFN11 はトポイソメラーゼ阻害薬、DNA 合成阻害薬、アルキル化剤、PARP 阻害剤等の DNA 障害性抗癌剤に対する感受性遺伝子として同定された。癌細胞株並び臨床腫瘍組織の約 50%において <i>SLFN11</i> は不活性化されており、癌化学療法への抵抗性をもたらすことが報告されている。それ故、<i>SLFN11</i> 陰性腫瘍に対する治療戦略の開発が喫緊の課題である。本研究では、<i>SLFN11</i> 陰性腫瘍に対して単剤で有効である抗癌剤を探索し、更にはその機序を解明することで SLFN11 の分子生物学を発展させることを目的としている。</p> <p><b>【方法】</b>  ヒト急性リンパ性白血病株 CCRF-CEM 並びに MOLTA、前立腺癌株 DU145、肺小細胞癌株 DMS 114、肝細胞癌株 Li-7 の野生型 (WT) は <i>SLFN11</i> 陽性細胞株であり、CRISPR-Cas9 を用いてこれらの <i>SLFN11</i> ノックアウト (KO) 細胞株を作製した。National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) の 1978 種類の薬物・化合物ライブラリーを使用して、CCRF-CEM の <i>SLFN11</i>-WT と <i>SLFN11</i>-KO 細胞に対して薬物感受性スクリーニングを実施した。<i>SLFN11</i>-KO 細胞に対してより細胞障害を示す候補薬剤を抽出し、<i>in vitro</i> で細胞生存率等を評価した。分子生物学的なアプローチとして、薬剤曝露時の DNA 複製は 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 取り込みを FACS 並びに蛍光免疫染色にて解析した。更に、分子レベルの複製フォーク評価は DNA combing assay を用いた。各細胞株における DNA 損傷、ユビキチン化、小胞体 (ER) ストレス、異常タンパク応答 (UPR) の変化は、Western blotting (WB) にて評価した。細胞内における不良凝集タンパク並びに新規合成タンパクは FACS を用いて定量した。SLFN11 とタンパク恒常性維持機構との関連を検討するため、HEK293 細胞に <i>SLFN11</i>-<i>BioID2</i> 融合遺伝子を組み入れ、ビオチン化タンパクを質量分析法にて解析した。最終的に、SLFN11 と標的分子の近接性を pull down assay 並びに proximity ligation assay (PLA) にて確認した。免疫染色、WB 等のデータは ImageJ<sup>®</sup>にて定量し、細胞生存率試験並びに WB では独立した複数回のデータを収集して GraphPad Prism9.0<sup>®</sup>にて統計解析を行った。</p>	

## 【結果】

CCRF-CEM *SLFN11*-WT と *SLFN11*-KO における NCATS 薬物スクリーニングにて、TAK-243 (MLN7243)が *SLFN11*-KO 細胞において有意に細胞増殖を抑制することが見いだされた。TAK-243 はユビキチン活性化酵素 UBA1 (UBE1) 阻害剤である。ATP 活性による細胞生存率並びにコロニー形成アッセイにより、DU145、Li-7、MOLT4 の複数の細胞株で *SLFN11*-KO 細胞がより高い感受性を示した。

EdU 取り込みによる DNA 複製評価においても、TAK-243 曝露ありの *SLFN11*-KO 細胞群において有意に EdU 核内シグナル低下を認めた。分子レベルでの DNA 複製評価では、複製フォークの伸長反応が *SLFN11*-KO 細胞で抑制されるだけでなく、新規の複製起点形成も抑制されることで DNA 複製障害を生じることが示された。

次に、DNA 複製障害の機序解明のため DNA 損傷応答経路について検討を行った。一般的にトポイソメラーゼI阻害薬などの DNA 障害性抗癌剤では RPA、 $\gamma$ -H2AX、ATR を介した CHK1 のリン酸化を認めるが、TAK-243 では RPA、 $\gamma$ -H2AX、ATR 非依存的に Claspin を介して CHK1 がリン酸化されることが明らかとなった。

TAK-243 は遊離ユビキチンと結合し不可逆的に複合体を形成することで、ユビキチン-プロテアソーム経路を停止させ、ER ストレス並びに過剰な UPR を誘発して細胞死が生じる。UPR が Claspin を介して CHK1 リン酸化するとの既報もあり、TAK-243 による UPR の差異を検証した。*SLFN11*-KO 細胞では *SLFN11*-WT 細胞と比べ定常状態でタンパクのユビキチン化、ER ストレス、UPR が亢進しており、TAK-243 により UPR の PERK-eIF2 $\alpha$ -ATF4、IRE1、ATF6 の 3 経路が更に活性化されることを確認した。また、*SLFN11*-KO 細胞では TAK-243 による不良タンパク凝集と short-lived protein 蓄積を有意に認めた。

ビオチン化タンパク質量分析によるプロテオミクス解析では、SLFN11 と translation initiation factors (EIF3A, EIF3B, EIF3D, EIF3E, EIF3F, EIF3H, EIF3L, EIF3M, EIF4B, EIF4G1) 並びに protein folding related molecules (TCP1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8)との物理的および機能的相互作用が示された。更に、pull down assay と PLA により SLFN11 との近接性を確認した。

## 【考察】

本研究では、SLFN11 のタンパク質恒常性維持への関与が示唆された。SLFN11 の不活性化は ER ストレス並びに過剰な UPR を引き起こすことにより、TAK-243 への感受性を上昇させると考えられた。DNA 複製が停止する機序としては、UPR 活性化が Claspin を介して CHK1 をリン酸化する経路が示唆された。この経路は未だ TAK-243 での報告はなく、新知見である。

既報では、*SLFN11* 陽性細胞に対する DNA 障害性抗癌剤の有用性が示されているが、*SLFN11* 陰性腫瘍に対する有用な単剤療法の報告はない。現在、進行固形癌並びに造血器腫瘍に対する TAK-243 の第I相臨床試験が行われており、腫瘍組織における SLFN11 発現の有無は TAK-243 の治療効果を予測するマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、実臨床において SLFN11 欠乏がバイオマーカーとして機能するか、ER ストレスやタンパク毒性を標的とした他の抗癌剤に対しても有用な指標となるかは、*in vivo* モデルを含めた更なる研究が必要である。

## 【結語】

SLFN11 の不活性化はタンパク毒性、ER ストレスを引き起こし、TAK-243 に対する腫瘍細胞の感受性を高めることが明らかとなった。SLFN11 発現の有無は抗癌剤の選択に応用できる可能性がある。