

京都大学	博士 (医学)	氏 名	山 本 (服 部) 悦 子
論文題目	A RUNX-targeted gene switch-off approach modulates the BIRC5/PIF1-p21 pathway and reduces glioblastoma growth in mice (RUNX を標的とした遺伝子スイッチオフ法はBIRC5/PIF1-p21 経路を介してマウスの膠芽腫の増殖を抑制する)		
(論文内容の要旨)			
<p>【背景・目的】 膠芽腫は頻度の高い悪性脳腫瘍であるが、根治的な治療法が確立していない。膠芽腫の悪性転化やその維持機構には様々な転写因子が関与し、転写因子 RUNX ファミリーの関与が示唆されていた。RUNX ファミリーは、共通の DNA コンセンサス配列 (5'-TGTGGT-3') に結合し、標的遺伝子の転写を調整する。この DNA コンセンサス配列を認識するピロール・イミダゾール ポリアミド-クロラムブシル複合体(Chb-M')は、RUNX 結合を阻害し、その転写活性を抑制する。本研究では、Chb-M'による RUNX のスイッチオフ法による標的遺伝子発現の修飾を用いて膠芽腫の悪性度維持に関与する経路を明らかにし、新規治療法を開発することを目的とした。</p> <p>【方法】 膠芽腫における RUNX ファミリーの関与を同定するために、The Cancer Genome Atlas (TCGA)の膠芽腫データセットを用いてその発現量と生存率の関係を解析した。Chb-M'、RUNX ノックダウン処理を用いて膠芽腫細胞に対する RUNX の作用、RUNX 標的遺伝子の発現、それらの関係を解析した。マウス膠芽腫モデルを用いて膠芽腫に対する Chb-M'の作用を評価した。</p> <p>【結果】 TCGA データセット解析では、RUNX1 高発現の膠芽腫患者群は低発現患者群と比較して生存率が有意に低下していた。しかし、RUNX2、RUNX3の発現量と生存率に有意な差を認めなかった。そこで、RUNX1 に注目して解析を進めた。Chb-M'投与、RUNX1 ノックダウン処理は、膠芽腫細胞にアポトーシスと G2/M 期細胞周期停止を介して増殖を抑制した。アポトーシスアレイ、mRNA マイクロアレイ解析では、Chb-M'投与は BIRC5 と PIF1 の発現を減少し、p21 の発現を増加した。クロマチン免疫沈降解析、レポーター解析では、RUNX1 が BIRC5、PIF1 の発現を直接制御していた。BIRC5 ノックダウン処理は膠芽腫細胞の増殖を抑制し、p21 発現を増加した。RUNX1 ノックダウン細胞に BIRC5 を過剰発現すること、RUNX1 と BIRC5 ノックダウン細胞に p21 ノックダウン処理することは、それぞれ増殖抑制を障害した。これらの結果から膠芽腫の細胞増殖維持に RUNX1-BIRC5-p21 経路が存在することを示した。一方で、PIF1 ノックダウン処理は膠芽腫細胞の増殖を抑制し、p21 発現を増加したことから、RUNX1-PIF1-p21 経路も膠芽腫の細胞増殖維持に関与することを示した。マウス膠芽腫モデルによる解析では、Chb-M' は腫瘍特異的に集積し、Chb-M'投与は腫瘍縮小から生存期間を延長した。</p> <p>【結語】 RUNX1 が RUNX1-BIRC5-p21 経路を介して膠芽腫細胞の増殖維持に働くこと、さらに RUNX1-PIF1-p21 経路の関与もあることを明らかにし、本経路が膠芽腫の治療標的となることを示した。Chb-M'による RUNX のスイッチオフ法がマウス膠芽腫モデルの生存期間を延長したことから、Chb-M'の創薬の可能性を示した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

転写因子 RUNX は様々な悪性腫瘍の悪性維持に関与しており、RUNX のコンセンサス配列に結合する化合物 Chb-M'がその転写活性を抑制することが先行研究で示されている。しかし、悪性脳腫瘍である膠芽腫において RUNX の役割や Chb-M'の効果は明らかになっていない。本研究では、RUNX に関連する膠芽腫の悪性維持機構の解明と Chb-M'の新規治療薬としての可能性を検討することを目的とした。

Chb-M'投与及び RUNX1 ノックダウン処理 (KD)にて、膠芽腫細胞の増殖が抑制された。機序探索のため Chb-M'投与の mRNA マイクロアレイ解析、RUNX1 KD のタンパク発現解析を行ったところ、BIRC5、PIF1 は減少、p21 は増加していた。RUNX1 が BIRC5、PIF1 のプロモーター領域に結合することをクロマチン免疫沈降解析にて示した。また BIRC5 KD や PIF1 KD にて p21 発現が増加することから、p21 がこれらの下流に存在することを示した。マウス膠芽腫モデルにて、Chb-M'により腫瘍増大が抑制され、生存期間が延長した。

以上から、膠芽腫の細胞増殖維持に RUNX1-BIRC5/PIF1-p21 経路が関与することを示した。今後 Chb-M'のこの経路への直接作用が示せば、新規治療薬として臨床応用が期待できる。

以上の研究は膠芽腫の悪性維持に関わる経路を同定し、新規治療開発の可能性を示した。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 1 月 23 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。