

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	渡辺 隆太
審査委員	主査 杉山 隆 副査 今井 祐記 副査 中城 公一 副査 阿部 雅則 副査 武森 信暁

論文名

SPOP は前立腺癌細胞において DNA-protein クロスリンク修復に必須である：SPOP 依存的な TOP2A-DNA 複合体からの TOP2A の除去

審査結果の要旨

前立腺癌は欧米において男性の癌の中で罹患数は1位と最多であり、わが国でもその罹患数は急増している。進行性前立腺癌に対する治療の中心は現在もアンドロゲン受容体(AR)を標的としたホルモン療法であるが、ホルモン療法に耐性化した前立腺癌(去勢抵抗性前立腺癌)の進行が临床上問題である。現時点で去勢抵抗性前立腺癌に対する新規AR阻害薬の効果は限定的であり、AR以外を標的とした新規分子標的薬の開発が急務である。

前立腺癌の10-15%において腫瘍抑制因子のひとつである speckle-type POZ protein (SPOP)の点変異が報告されている。SPOPはCUL3型ユビキチンリガーゼの基質結合アダプターで、SPOPが基質タンパク質とCUL3と複合体を作り、基質をユビキチン化する。これまでSPOPの基質タンパク質としてアンドロゲン受容体(AR)を含む癌に関与する多数の基質が報告されている。野生型SPOPでは、AR等の基質が結合しユビキチン化が起り、プロテアソームで分解制御される。一方、前立腺癌由来SPOP変異体(Y87CやF133V等)では、基質がSPOPに結合できない結果、ユビキチン化されず、基質がプロテアソームにおいて蓄積し、癌化が進行すると考えられている。

本研究では、SPOP 変異前立腺癌における分子病態学的意義を検討するために、DNA-タンパク質クロスリンク修復過程に焦点を当て、SPOP ノックダウンや SPOP 変異の過剰発現における DNA 修復に関連する重要な既知因子について解析した。その結果、AR 陽性前立腺癌細胞において、SPOP 欠失により核内 DNA 上のトポイソメラーゼ 2A (TOP2A)の量が増加し、DNA 損傷のマーカである γ H2AX 量も同様に増加した。チロシル DNA ホスホジエステラーゼ-2 (TDP2)は TOP2A を TOP2A-DNA 複合体から分離する DNA 修復過程に重要な酵素である。SPOP 欠失前立腺癌細胞では、TDP2 量が減少し、核内の γ H2AX や TOP2A の蓄積が認められた。また F133V 変異過剰発現細胞でも同様の現象が認められた。これらの結果は、TDP2 が TOP2A-DNA 複合体から TOP2A の分離を介して SPOP が DNA-タンパク質クロスリンク修復過程に関与することを示唆する。既報で irradiation 等による外的な DNA 損傷に対する修復に SPOP が不可欠であることは知られていたが、本研究により初めて通常培養下の前立腺癌細胞における DNA 修復ストレスに対しても SPOP が重要な働きを有することが判明した。すなわち、前立腺癌関連 SPOP 変異を発現している細胞では、DNA-タンパク質クロスリンク修復が正常に機能せず、これらの癌細胞のゲノム不安定性を生じる可能性が示唆された。

なお、本研究で行った遺伝子組み換え実験は、遺伝子組換え実験安全委員会で承認されており（承認番号：27-31）、外科的手術により摘出されたヒト前立腺癌腫瘍組織の使用については、本学臨床研究倫理審査委員会（IRB）の承認を受けている。

本論文の公開審査会は令和元年 12 月 24 日に開催された。申請者は研究内容を英語で明確に口頭発表した。その後、審査委員より、本研究に関する質問や臨床への応用性などに関して多くの質疑がなされた。具体的には、SPOP の基質探索を行ったか、SPOP の基質結合に関するコンセンサス配列はあるのか、本実験で用いた AR 陽性前立腺癌細胞は変異 AR であり、野生型 AR を用いるべきではないか、AR を発現していない細胞株に野生型 AR を共発現させる系は考えたか、また本実験は正確には去勢抵抗性前立腺癌の研究とはいえない可能性についての指摘に加え、DNA に対する外的刺激と内的刺激の相違は何か、SPOP のノックダウンで γ H2AX の局在に変化が出ることとタンパク量が変化することの相関について、TDP1/2 と MRE11 の DNA 修復における機能補填の可能性はあるのか、F133V とアンドロゲン刺激による DNA 修復との相関、癌化には genetic な原因と epigenetic な原因があるが本実験における外的刺激は epigenetic と考えられるのか、乳癌や卵巣癌においても SPOP 変異が知られているが、本研究と同様の分子的機序が関連するのか、臨床への応用の視点から変異 SPOP に対する抗体はあるのか、変異 SPOP の移植などの *in vivo* の実験系は PARP 阻害薬等の効果を調べる上で有効な系と考えられるか考慮したか、等の質問がなされた。申請者はそれらの質問に対する的確に回答した。審査委員は実験ノートがしっかり記載されていることも確認し、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が博士（医学）の学位授与に値すると判定した。