

# ゲノム編集による機能獲得型p53変異細胞の樹立とヌクレオシドアナログの抗腫瘍効果にp53ステータスがおよぼす影響

若狹, 武司

<https://hdl.handle.net/2324/5068187>

---

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士（創薬科学）, 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :



# 博士学位論文

ゲノム編集による機能獲得型 p53 変異細胞の樹立と  
ヌクレオシドアナログの抗腫瘍効果に p53 ステータスが  
およぼす影響

2022 年

九州大学大学院

薬学府 創薬科学専攻 薬剤学分野

若狭 武司

## 目次

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 序論.....                                             | 4  |
| 実験材料および方法.....                                      | 9  |
| 本論.....                                             | 19 |
| 第1章 CRISPR/Cas9 システムを用いた p53 ミスセンス変異導入細胞株の樹立.....   | 19 |
| p53 ミスセンス変異細胞株樹立の意義.....                            | 19 |
| p53 ミスセンス変異細胞株樹立.....                               | 19 |
| p53 ミスセンス変異細胞株の薬剤応答.....                            | 27 |
| 考察.....                                             | 30 |
| 第2章 p53 ミスセンス変異導入細胞株の網羅的遺伝子発現プロファイル解析.....          | 32 |
| p53 ミスセンス変異と転写因子 ETS2 との相互作用.....                   | 32 |
| CEL-Seq2 法による RNA-seq 解析.....                       | 33 |
| 機能獲得型 p53 ミスセンス変異細胞の遺伝子発現プロファイル.....                | 45 |
| 考察.....                                             | 52 |
| 第3章 p53 ミスセンス変異細胞のトリフルリジンに対する細胞応答.....              | 53 |
| トリフルリジンによるアポトーシス誘導.....                             | 53 |
| Fucci 細胞を用いたライブセルイメージングによる細胞周期解析.....               | 56 |
| 分裂期後期における姉妹染色体の分配異常.....                            | 57 |
| Histone H2B-GFP 発現細胞を用いたライブセルイメージングによる分裂期進行の解析..... | 61 |
| 細胞分裂後の多核形成解析.....                                   | 63 |
| 考察.....                                             | 65 |
| 第4章 スフェロイド 3D 及びマウスモデルにおけるトリフルリジンの抗腫瘍効果.....        | 67 |
| トリフルリジンのスフェロイド増殖抑制効果.....                           | 67 |
| マウス皮下移植モデルにおけるトリフルリジンの抗腫瘍効果.....                    | 69 |
| 考察.....                                             | 71 |

|            |    |
|------------|----|
| 結論.....    | 72 |
| 引用文献 ..... | 73 |
| 謝辞.....    | 83 |

## 略語表

本論文では以下の略語を用いた。

|        |                                                           |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| ACA    | anti centromere antibody, 抗セントロメア抗体                       |
| Ana    | anaphase, 後期                                              |
| APH    | aphidicolin, アフィジコリン                                      |
| bp     | base pair, 塩基対                                            |
| Cas9   | CRISPR-associated proteins 9                              |
| CDDP   | cisplatin, シスプラチン                                         |
| cDNA   | complementary DNA, 相補的 DNA                                |
| CFS    | common fragile sites, 共通脆弱部位                              |
| Chr    | chromosome, 染色体                                           |
| CPM    | counts per million                                        |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| dNTP   | deoxynucleotide triphosphate, デオキシヌクレオチド 3 リン酸            |
| dTTP   | deoxythymidine triphosphate, デオキシチミジン 3 リン酸               |
| DAPI   | 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride            |
| DDBJ   | DNA data bank of Japan, 日本 DNA データバンク                     |
| DEG    | differentially expressed gene, 発現変動遺伝子                    |
| DNA    | deoxyribonucleic acid, デオキシリボ核酸                           |
| DRA    | DDBJ Sequence Read Archive                                |
| E      | exon, エクソン                                                |
| ETS    | E26 transformation-specific                               |
| FBS    | fetal bovine serum, ウシ胎児血清                                |
| FC     | fold chang, 倍率変化                                          |
| FDR    | false discovery rate                                      |
| FdUMP  | 5-Fluorodeoxyuridine monophosphate, フルオロデオキシウリジン 1 リン酸    |
| 5-FU   | 5-fluorouracil, 5-フルオロウラシル                                |
| FS     | frameshift, フレームシフト                                       |
| FTD-DP | FTD-diphosphate, FTD 2 リン酸体                               |
| FTD-MP | FTD-monophosphate, FTD 1 リン酸体                             |
| FTD-TP | FTD-triphosphate, FTD 3 リン酸体                              |
| F3dTTP | trifluorothymidine-5'-monophosphate, FTD 1 リン酸体           |
| Fucci  | fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator     |
| FTD    | trifluridine, トリフルリジン                                     |
| G      | glycine, グリシン                                             |
| GFP    | green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質                      |
| GO     | gene ontology, 遺伝子オントロジー                                  |

|                  |                                                                                  |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| GOF              | gain-of-function, 機能獲得                                                           |
| G1 phase         | gap 1 phase, G1 期                                                                |
| G2 phase         | gap 2 phase, G2 期                                                                |
| H                | histidine, ヒスチジン                                                                 |
| HR               | homologous recombination, 相同組換え                                                  |
| KO               | knock out, 欠失型、ノックアウト                                                            |
| LOF              | loss-of-function, 機能喪失                                                           |
| Meta             | metaphase, 中期                                                                    |
| MiDAS            | mitotic DNA synthesis                                                            |
| M phase          | mitotic phase, M 期, 分裂期                                                          |
| mRNA             | messenger RNA, 伝令 RNA                                                            |
| NA               | not applicable                                                                   |
| NA               | numerical aperture, 開口数                                                          |
| NCS              | neocarzinostatin, ネオカルジノスタチン                                                     |
| N.D.             | non-differentially expressed gene                                                |
| NEBD             | nuclear envelope breakdown, 核膜崩壊                                                 |
| Neo              | neomycin, G418, geneticin, ネオマイシン, ジェネティシン                                       |
| NGS              | next generation sequencing, 次世代シーケンサー                                            |
| PAGE             | poly-acrylamide gel electrophoresis, ポリアクリルアミドゲル電気泳動                             |
| PAM              | protospacer adjacent motif, プロトスペーサー隣接モチーフ                                       |
| PCA              | principal components analysis, 主成分分析                                             |
| PCR              | polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応                                            |
| PGK              | phosphoglycerate kinase, ホスホグリセリン酸キナーゼ                                           |
| Prometa          | prometaphase, 前中期                                                                |
| Puro             | puromycin, ピューロマイシン                                                              |
| p53 WT           | p53 <sup>WT/WT</sup> , 野生型 p53, p53 wild type                                    |
| p53 KO           | p53 <sup>-/-</sup> , p53 欠失, p53 null type, p53 knock out, p53 ノックアウト            |
| p53 R175H        | p53 <sup>R175H/R175H</sup> , p53 R175H missense mutation type, p53 R175H ミスセンス変異 |
| P53 R248Q        | p53 <sup>R248Q/R248Q</sup> , p53 R248Q missense mutation type, p53 R248Q ミスセンス変異 |
| Q                | glutamine, グルタミン                                                                 |
| qRT-PCR          | quantitative reverse-transcription PCR                                           |
| R                | arginine, アルギニン                                                                  |
| RNA              | ribonucleic acid, リボ核酸                                                           |
| S                | serine, セリン                                                                      |
| SA- $\beta$ -Gal | senescence associated $\beta$ -galactosidase, 老化関連酸性 $\beta$ -ガラクトシダーゼ           |
| SDS              | sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム                                              |
| seq              | sequencing, シーケンス                                                                |
| sgRNA            | single guide RNA, シングルガイド RNA                                                    |
| S phase          | synthesis phase, S 期                                                             |

|        |                                                   |
|--------|---------------------------------------------------|
| STR    | short tandem repeat, ショートタンデムリピート                 |
| TK     | thymidine kinase, チミジンキナーゼ                        |
| TP     | thymidine phosphorylase, チミジンホスホリラーゼ              |
| TPI    | thymidine phosphorylase inhibitor, チミジンホスホリラーゼ阻害剤 |
| TS     | thymidylate synthase, チミジル酸シンターゼ                  |
| UR-DNA | under-replicated DNA                              |
| W      | tryptophan, トリプトファン                               |
| WT     | wild type, 野生型                                    |

## 序論

癌は、病態を悪化させる無数の要因によって複雑化された深刻な病といえる。日本では、毎年 100 万人以上が新たに癌と診断されることが報告されており、その対策は依然として急務である<sup>1)</sup>。癌治療において、手術療法、放射線療法に加え、化学療法や免疫療法といった薬物療法は、その治癒のために重要な役割を担う治療法である。薬物療法で使われる治療薬は、内服や静脈注射によって血液中に入り全身に運ばれ、腫瘍を形成する癌細胞だけでなく転移を経て全身に散らばった癌細胞にも作用する。増殖する癌細胞に対しては、増殖のために必須の生物学的プロセスに作用する治療薬による増殖抑制効果が高いことが期待されるが、実際、化学療法で使用される治療薬の多くがこの種類の薬剤であり、様々な癌腫に対して適応されている。その中でも DNA 複製プロセスを攪乱させることは増殖する癌細胞に対して高い増殖抑制効果を示す。DNA 複製プロセスを攪乱させる方法としては、DNA 複製に必要な材料（デオキシヌクレオチド、dNTP など）の枯渇、DNA ポリメラーゼの活性阻害、DNA 鎖間クロスリンクによる DNA 鎖開裂阻害、DNA 障害物の形成、及び DNA 鎖切断などの DNA 損傷があるが、これらの作用を引き起こす薬剤は、DNA 複製進行を遅延または阻害することを通じて DNA 複製ストレスを誘導する。近年、DNA 複製ストレス誘導と抗腫瘍効果との強い関連が指摘されており、治療薬による DNA 複製ストレス誘導が今後も重要な癌治療戦略の一つとして活用されていくことが期待される<sup>2)</sup>。その中でも、薬剤の DNA への取り込みをコンセプトとした薬剤開発は重要な戦略である<sup>3)</sup>。そこで、DNA 複製ストレスを誘導するヌクレオシドアナログ系の薬剤であるトリフルリジン（trifluridine, FTD）に着目した。つまり、FTD による複製ストレス誘導が癌治療における重要な戦略となる。

ロンサーフ®（製品名：トリフルリジン・チピラシル（FTD/TPI）；商品名：LONSURF®；開発コード：TAS-102）は、抗腫瘍成分でフッ化チミジンアナログのトリフルリジン（FTD）とチピラシル塩酸塩（thymidine phosphorylase inhibitor, TPI: FTD の分解を防ぐチミジンホスホリラーゼ阻害剤）を 1 : 0.5 のモル比で配合した新規経口ヌクレオシド系抗悪性腫瘍剤である<sup>4)</sup>（図 1）。FTD はチミジンホスホリラーゼ（thymidine phosphorylase, TP）の基質であるために TP によって分解されるが、TPI を併用することで、TP 活性が高いヒトにおいて、FTD が薬効を発揮できる血中濃度を確保することができる。FTD はチミジンキナーゼ（thymidine kinase, TK）でリン酸化されることで、F3dTMP（FTD-MP）が生成され、チミジル酸シンターゼ（TS）を阻害する<sup>5)</sup>。しかし、F3dTMP による TS 阻害は可逆的であり、5-FU から産生される FdUMP の不可逆的 TS 阻害とは異なる<sup>6)</sup>。FTD の主たる抗腫瘍効果はその染色体 DNA への取り込みに起因すると考えられている。癌細胞では、TK を介するサルベージ経路の亢進、異常増殖、DNA 修復能力の低下などにより、FTD の染色体 DNA への取り込みと保持が高いと考えられており<sup>7)</sup>、FTD の癌細胞に対する有効性が期待されていた。臨床試験では、5-FU を用いた標準化学療法に対し不応となった 3 次/4 次転移性大腸癌患者を対象としたプラセボ対照二重盲検ランダム化第 II 相試験において、全生存期間の有意な延長が認められ<sup>8)</sup>、2014 年に日本国内で販売承認された。続いて標準化学療法に抵抗性を示す転移性大腸癌患者を対象とした国際多施設共同無作為化二重盲検第 III 相試

験 (RECOURSE 試験) においても、ロンサーフはプラセボと比較して全生存期間を有意に延長することが示され、現在ロンサーフは進行再発大腸癌に対する治療薬として世界で使用されている<sup>9)</sup>。さらに、進行再発胃癌に対する有効性も示され、その治療薬としても世界で使用されている。また、bevacizumab との併用療法による良好な治療成績に注目が集まるなど、さらなる臨床開発に向けた臨床研究も盛んに行われているところである<sup>10-12)</sup>。

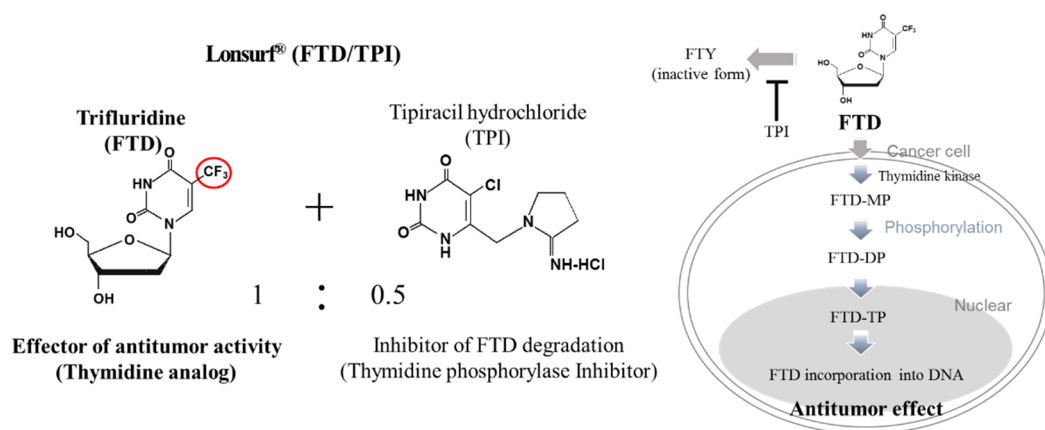


図 1 Antitumor activity of FTD as nucleoside analog

Lonsurf is an oral nucleoside antitumor agent that consists of trifluridine (FTD) and tipiracil hydrochloride (TPI) at a molar ratio of 1:0.5. FTD is the antitumor component of Lonsurf, whereas TPI prevents degradation of FTD through a first-pass effect as a thymidine phosphorylase inhibitor. FTD is a well-known antiproliferative agent with mechanisms of action is incorporated into DNA<sup>13)</sup>. FTD indicates trifluridine; TPI, thymidine phosphorylase inhibitor; FTY, 5-trifluoromethyluracil; MP, monophosphate; DP, diphosphate; and TP, triphosphate.

FTD はヌクレオシドアナログとして、癌細胞の核酸代謝経路を利用し FTD 3 リン酸体 (FTD-TP) となり、DNA 複製プロセスを通じて染色体 DNA に誤挿入させることで DNA 機能不全を引き起こし、抗腫瘍効果を発揮する<sup>3)</sup> (図 1)。抗腫瘍効果を持つヌクレオシドアナログの中で FTD は顕著な DNA 鎖切断を起こさずに DNA 鎖に取り込まれる特徴を有する<sup>14)</sup>。FTD は FTD-TP 産生に伴い細胞内ヌクレオチドプール中の dTTP 量を低下させ、S 期進行を遅延させることが確認された<sup>15)</sup>。試験管内の反応で FTD-TP は dTTP に比べ DNA ポリメラーゼによる複製反応効率が極めて低かったことから、FTD 存在下では効率よく染色体 DNA に取り込まれる dTTP が減少することで、代わりに FTD-TP が DNA ポリメラーゼにより染色体 DNA に取り込まれ、その結果、複製フォーク進行遅延を誘導すると考えられた (図 2)。このようなメカニズムによる FTD 誘導性 DNA 複製ストレスを癌細胞に与えると、p53 野生型 HCT116 では、p53-p21 の蓄積、サイクリン B1 のタンパク質分解と有糸分裂期のスキップ、さらに G1 期での細胞周期停止が起こり、最終的に SA-β-Gal 活性の増加と細胞老化様の表現型を示した<sup>15)</sup>。一方で、CRISPR/Cas9 システムにより樹立した p53 ノックアウト HCT116 では、サイクリン B1 分解および有糸分裂期スキップが起こらずに有糸分裂期に進行し、有糸分裂期後期に染色体ブリッジを伴う染色体分配異

常が観察され、その後アポトーシス依存的な細胞死が誘導された<sup>15)</sup>。このように、FTD に対する細胞応答と細胞運命決定において p53 が主要な制御因子であることが示されているが、ヒト腫瘍で多く検出されるミスセンス変異を含む p53 を発現する癌細胞において、FTD がどのように作用し、癌細胞はどのような運命に至るのかについては明らかになっていなかった (図 3)。

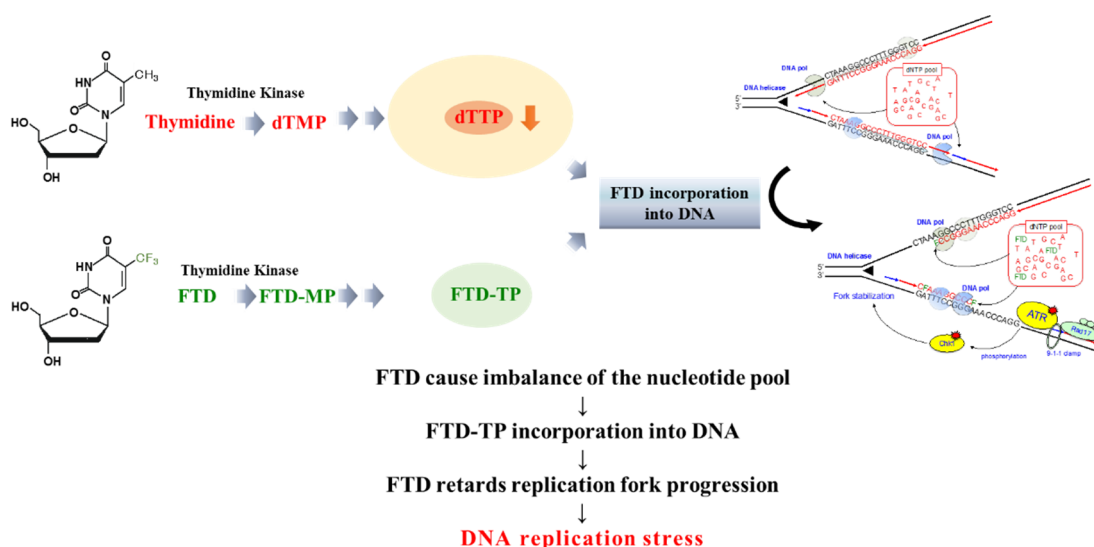


図 2 Mechanism of FTD-induced DNA replication stress

FTD exert cytotoxicity through “DNA replication stress” caused by its incorporation into DNA. FTD indicates trifluridine; MP, monophosphate; TP, triphosphate; dTMP, deoxythymidine monophosphate; dTTP, deoxythymidine triphosphate; and dNTP, deoxynucleotide triphosphate.

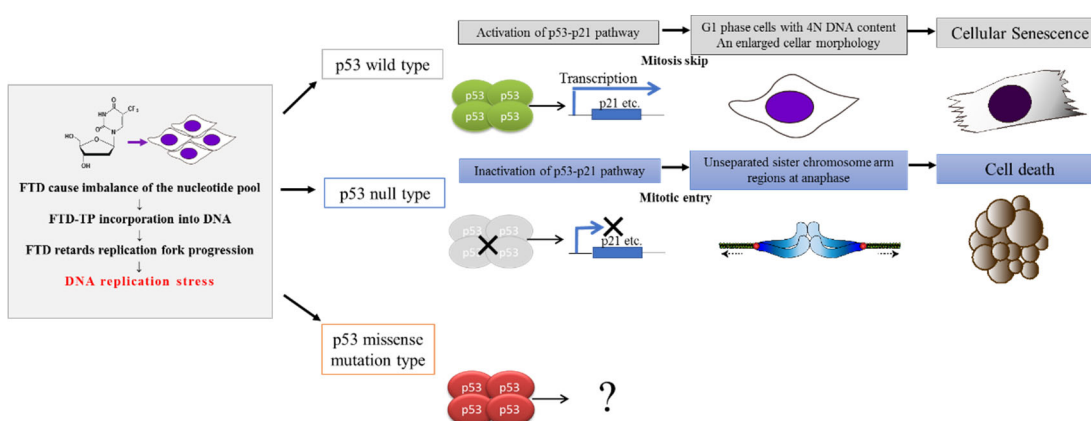


図 3 Different responses to FTD between p53 wild type and null cells

DNA replication stress induced by FTD induces cellular senescence in p53 wild type cells, and apoptotic cell death in p53 null-type cells. However, the response of p53 missense mutant cells to FTD remains to be elucidated. FTD indicates trifluridine; and G1 phase, Gap 1 phase.

p53 をコードする *TP53* 遺伝子はヒトのがんで変異が最も高頻度に見られ、その変異の中で最も多いのはミスセンス変異である<sup>16-20)</sup> (図 4)。p53 ミスセンス変異は腫瘍抑制機能を無効にし、そのミスセンス変異の種類によっては癌を促進する機能獲得 (gain-of-function, GOF) をもたらし、野生型 p53 および p53 欠失とは異なる遺伝子発現を誘導する<sup>21,22)</sup> (図 5)。これは、病態を悪化させる無数の要因を誘導して複雑化に一役を担っていると考えられ、多くの臨床研究により多くの種類のヒト腫瘍において、変異した p53 を有する腫瘍はシスプラチン、ドキソルビン、5-FU などの化学療法や放射線療法などの標準療法に対する抵抗性を有するなど、機能獲得型 (GOF) 変異 p53 の発現は予後不良につながる性質の獲得に寄与していることが明らかになっている<sup>23-28)</sup>。p53 は様々な細胞ストレスに応答する機構があり、その細胞ストレスの一つが DNA 複製ストレスである。過剰な増殖シグナルや DNA 損傷など様々な要因で DNA 複製進行が滞り、発がん過程におけるゲノム不安定性の誘因となるが、癌化学療法で用いる抗がん剤によっても DNA 複製ストレスが惹起され、がんに対して治療効果を発揮している。がん細胞周期における DNA 複製ストレスは、複製フォークの遅延・停止・崩壊、さらに DNA 損傷や未成熟な有糸分裂など、多岐にわたる要因で発生していると考えられる。

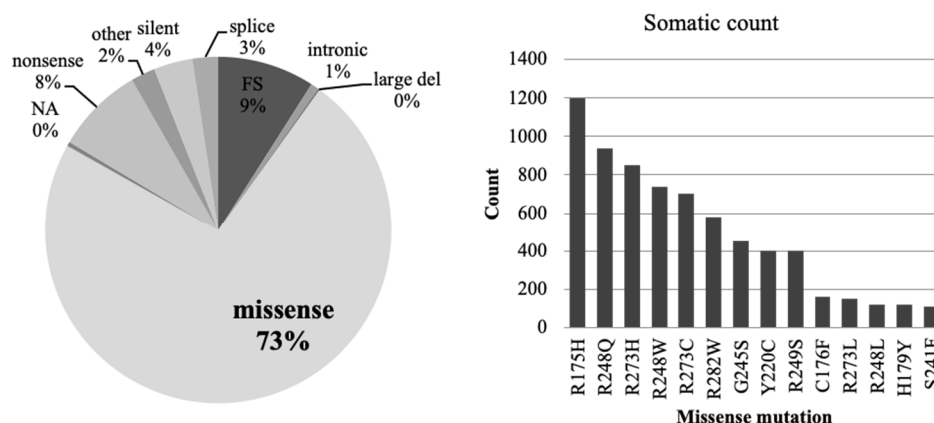


図 4 p53 missense mutation

Most of the mutations exist within the DNA-binding domain as a single amino acid substitution. In the bar graph on the right, 14 missense somatic mutations are listed in order of frequency from left to right. Data derived from the IARC *TP53* Database<sup>16)</sup>. FS indicates frameshift, and NA, not applicable.

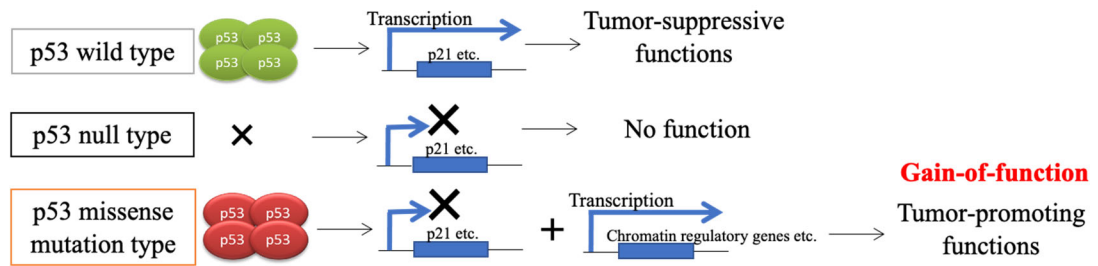


図 5 Gain-of-function p53 missense mutation

The p53 missense mutations not only abrogate its tumor suppressive function, but also lead to a gain-of-function effect.

本研究の第一章では、遺伝子の背景の違いに由来する影響が無い p53 ミスセンス変異の癌細胞株モデルの樹立を目的とし、CRISPR/Cas9 システムを用いて p53<sup>R248Q/R248Q</sup> (R248Q; 野生型 p53 の転写調節領域 DNA との結合ドメインの変異、DNA contact mutation) と p53<sup>R175H/R175H</sup> (R175H; p53 タンパク構造変化を引き起こす変異、structural mutation) の p53 ミスセンス変異をゲノム DNA 上に組み込んだ HCT116 細胞株を樹立した。p53 ミスセンス変異タンパク質の機能は、p53 標的遺伝子である p21 および MDM2 の遺伝子発現レベルを評価した。加えて、p53 を活性化する様々な DNA 損傷誘導剤に対する応答についてタンパク質発現レベルで評価した。

第二章では、樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞の p53 が、新たな機能を獲得した機能獲得型のミスセンス変異 p53 タンパク質であるか評価することを目的とし、p53 R175H および p53 R248Q 細胞のミスセンス変異 p53 タンパク質と ETS2 との相互作用について評価した。ミスセンス変異 p53 タンパク質発現により細胞に起こる変化の全体像は、野生型 p53、p53 欠失、p53 R175H または p53 R248Q 細胞間のゲノムワイド遺伝子発現の差異を RNA-seq 解析により比較評価した。

第三章では、GOF p53 R175H および p53 R248Q 細胞について、FTD が細胞応答にどのような影響をおよぼすのかを明らかにすることを目的とし、細胞増殖曲線評価およびアポトーシスマーカーによる細胞死の検出により抗腫瘍効果を評価した。細胞死に至るまでの細胞応答は、蛍光ライブセルイメージング技術により、野生型 p53、p53 欠失、p53 R175H または p53 R248Q 細胞の細胞周期および染色体を可視化して 1 細胞解析をした。スナップショットの高解像度の解析は、多重蛍光免疫染色により分裂期における染色体分配の様子、さらに分裂期終了後における核膜の形態を観察し、分裂期進行における染色体分配から細胞死に至るまでの時系列的な表現型を明らかにした。

第四章では、ヒト腫瘍で最も多く検出される機能獲得型 p53 ミスセンス変異の癌細胞において、FTD は抗腫瘍効果に影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とし、樹立した GOF p53 R175H および p53 R248Q 細胞のスフェロイド 3D モデルおよびマウス皮下移植モデルで薬効試験を実施した。

## 実験材料および方法

### 細胞培養、試薬および RNA-seq ライブラリ調製

HCT116 (ECACC) 細胞株は DMEM (Thermo Fisher)、LS174T (ATCC) および WiDr (ATCC) 細胞株は EMEM (Thermo Fisher)、LS1034 (ATCC) および COLO 320DM (ATCC) 細胞株は RPMI1640 (Thermo Fisher) の培地で培養し、それらすべての培地は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した。すべての細胞株は、37°C、5% CO<sub>2</sub> atmosphere で培養した。すべての細胞株は short tandem repeat (STR) 分析により認証され、マイコプラズマの混入がないことが確認された。各試薬は、trifluridine (FTD) を 3 および 9 μM (T2511; Tokyo Chemical Industry)、5-fluorouracil (5-FU) を 3 μM (F6627; Sigma)、cisplatin (CDDP) を 5 μM (D3371; Tokyo Chemical Industry)、aphidicolin (APH) を 0.5 μM (A0781; Sigma)、neocarzinostatin (NCS) を 20 nM (N9162; Sigma) に調製した。RNA-seq ライブラリは、CEL-seq2 法を用いた既報の方法<sup>29)</sup>に基づき調製した。使用したプライマーの配列および試薬は、表 1 Primer and sgRNA sequences および表 2 Reagent of CEL-Seq2 に示した。

### 細胞増殖曲線の細胞生存率測定

96-well culture plate (Nunc<sup>TM</sup> Edge 2.0 96-well plates, Nunclon delta (surface treatment)) に 1000 cells/well で細胞を播種し、24 時間培養した後、3 μM FTD で処理した。3 日間、6 日間、9 日間の処理後、接着細胞の生存率を CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Cell Viability Assay (Promega) の細胞生存率検出試薬で反応させて、TriStar LB 941 plate reader (Berthold Technologies) で発光を測定した。

### Fluorescent Ubiquitination-based Cell-Cycle Indicator (Fucci) 発現細胞の樹立

PIP-FUCCI がコードされた DNA 断片は、Jean Cook<sup>30)</sup>から供与された鋳型 DNA (pENTR-PIP-FUCCI; Addgene; plasmid #118621)、KOD FX DNA polymerase (TOYOBO) およびプライマー (表 1) で PCR 増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) で、pLVSIN-EF1α Hyg vector (Takara bio) の BamHI 部位にクローニングした。レンチウイルスストックを作製するために、lenti-X 293T Cells (Takara Bio) にレンチウイルスプラスミド (pLVSIN-PIP-FUCCI または pBOB-EF1-FastFUCCI (Addgene; plasmid # 86849) ; Kevin Brindle & Duncan Jodrell<sup>31)</sup> から供与) および Lentiviral High Titer Packaging Mix (Takara Bio) を TransIT-Lenti Transfection Reagent (Takara Bio) で共トランスフェクションをした。トランスフェクション後 48 時間でウイルス液を回収し、Millex-HV 0.45 μm low protein binding PVDF membrane (Millipore) でろ過し、Lenti-X Concentrator (Takara Bio) を用いて製造元のプロトコルに従って 100 倍まで濃縮した。HCT116 細胞株に感染させて FUCCI SA または PIP-FUCCI を発現するポリクローナル集団を作製し、セルソーター SH800 (SONY) を用いて増殖細胞をソーティングした。

### Quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR)

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて各細胞株から total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA

Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて表 1 Primer and sgRNA sequences に示したプライマーを用いて相補的 DNA (cDNA) を合成し、 $\beta$ -アクチンで伝令 RNA (mRNA) の発現量をノーマライズした。qRT-PCR は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて実施した。蛍光シグナルは LightCycler 480 system (Roche Diagnostics) で検出した。

#### ウェスタンブロッティング

細胞はスクレーパーを用いて回収し、RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF および protease and phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)) で 30 分間氷上に静置し、超音波処理をした。細胞抽出物は、遠心分離後の上清を回収した。細胞ライセートは、Laemmli sample buffer (Bio-Rad) で調製後、ヒートブロックにて 95°C で 5 分間熱した。TGX precast gels (Bio-Rad) を用いた SDS-PAGE で細胞ライセート中のタンパク質を分離し、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) を用いてメンブレンに転写した。ウェスタンブロッティングは、表 3 The list of antibodies used in this study に示した一次抗体と二次抗体を使用し、検出は Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) により反応させて、LAS 4000 mini (Cytiva) を使用し撮影した。

#### 共免疫沈降法

ETS2 遺伝子は HCT116 cDNA から KOD FX DNA polymerase (TOYOBO) とプライマー (表 1) を用いて PCR で増幅し、pENTR/D-TOPO (Thermo Fisher) にクローニングし、N 末端にタグ用の 3FLAG を保有する pcDNA3.1 ベクター (Gateway Technology, Thermo Fisher) へ導入した。HCT116 野生型および p53 ミスセンス変異細胞に、X-treme GENE HP (Merck) を用いて、製造元の手順書に従ってプラスミドをトランスフェクションさせた。24 時間後、細胞を cold PBS で洗浄し、IP buffer (20mM Tris-HCl, pH8.0, 137mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1% NP-40, 10% glycerol, 1mM PMSF, a protease and phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai Tesque), and 12.5U ml<sup>-1</sup> benzonase (Millipore)) で溶解し、超音波処理した。遠心分離後、上清を回収し、50  $\mu$ l の抗 DDDDK-tag mAb-Magnetic Beads および Mouse IgG2a Magnetic Beads (MBL) とともに 4°C で 2 時間インキュベートした。ビーズはマグネットラックでペレット化し、1 mL IP バッファで 5 回洗浄後、30  $\mu$ L Laemmli sample buffer (Bio-Rad) に再懸濁し、95°C で 5 分間熱した。免疫沈降したタンパク質は、上述のウェスタンブロッティング法で分析した。

#### 蛍光免疫染色法

細胞は、collagen-I-coated coverslips (Iwaki) 上で培養した。 $\alpha$ -tubulin、ACA、CyclinB1 の染色は、4%パラホルムアルデヒドを用いて 37°C で 10 分間静置により固定し、90%メタノールを室温で 5 分間処理した。その他のタンパク質の染色には、4%パラホルムアルデヒドを用いて 37°C で 15 分間静置により固定した。その後、10 mM グリシンを含む PBS で洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS で 5 分間透過処理し、2%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS を用いて室温で 30 分間ブロッキングし、表 3 The list of antibodies used in this study に示した一次および二次抗体とインキュベートした。カバースリップを

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS で 5 分間洗浄し、さらに PBS で洗浄後、Prolong Glass (Thermo Fisher) を用いてマウントした。

#### 画像取得および解析

固定細胞実験では、All-in-one fluorescence microscope (BZ-X800, KEYENCE) あるいは Nikon NIS Elements software (Nikon) で制御する Nikon A1R confocal imaging system を用いて蛍光画像を取得した。All-in-one fluorescence microscope において、対物レンズは Plan Apochromat 40x objective (numerical aperture (NA) 0.95, BZ-PA40, KEYENCE) を使用した。赤色の蛍光は TexasRed filter (ex: 560/40 nm, em: 630/75 nm, dichroic: 585 nm, OP-87765, KEYENCE)、緑色は GFP filter (ex: 470/40 nm, em: 525/50 nm, dichroic: 495 nm, OP-87763, KEYENCE)、青色は DAPI filter (ex: 360/40 nm, em: 460/50 nm, dichroic: 425 nm, OP-87762, KEYENCE) を使って検出しました。Nikon A1R confocal imaging system において、対物レンズは oil immersion Plan-Apo 100× NA1.40 lens (Nikon) を使用した。画像は 0.2 mm 間隔の Z スタックとして取得し、デコンボリューションを実行した。最大輝度投影は、NIS Elements software (Nikon) を用いて作成した。ライブセルイメージング実験には、使用前に 5 mM 酢酸中で collagen-I (Nippi) を glass bottom chamber (Matsunami) 中に室温で 30 分間インキュベートすることでコーティングし、Fucci および histone H2B-GFP (green fluorescent protein, GFP) の安定発現細胞を培養した。細胞はライブセルイメージングの全期間中、ステージトップ型インキュベーターと PureBox SHIRAITO (Tokai Hit) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> atmosphere に維持し、FluoroBrite DMEM (Thermo Fisher) に 10% FBS と GlutaMAX (Thermo Fisher) を添加した培地で培養した。画像は、DS-Qi2 camera (Nikon) を搭載した倒立蛍光顕微鏡の Eclipse Ti-E (Nikon) で Plan-Apo 20× NA 0.75 lens (Nikon) を用いて 10 分毎に取得した。スフェロイドの観察には、DS-Fi2 camera (Nikon) を搭載した倒立顕微鏡 Eclipse TS100 (Nikon) に CFI achromat 10×F NA 0.25 lens (Nikon) を用いて明視野画像を取得した。

#### 細胞のスフェロイド化と細胞生存率測定

96-well spheroid culture plate (EZ-BindShut<sup>®</sup> SP, microplate 96-well round bottom, 4870-800SP; IWAKI) に 300 cells/well で細胞を播種し、24 時間培養してスフェロイド化の後、溶媒のみ (Control) および 9 μM FTD で処理した。3 日間、6 日間、9 日間の処理後、スフェロイドの生存率を CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D Cell Viability Assay (Promega) の細胞生存率検出試薬で反応させて、TriStar LB 941 plate reader (Berthold Technologies) で発光を測定した。培養した細胞は、光学顕微鏡 (Nikon) を用いて撮影した。各群のスフェロイドの生存率はコントロールと比較した。

#### 動物試験による抗腫瘍効果の評価

動物の飼育及び取り扱い等動物を使用する際には、「大鵬薬品工業株式会社における動物実験等の実施に関する規程 (2013 年 04 月 1 日制定施行、2017 年 4 月 1 日改正施行)」に従い動物を適正に使用した。本動物実験は実施前 (2019 年 10 月 10 日) に動物実験委員会で倫理承認された。雄のヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu、5 週齢、日本クレア株式会社)

は、特定の病原体がいない環境（SPF conditions）下で  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$ 、12 時間の明暗サイクルで飼育され、餌（CE-2；CLEA Japan）と水は自由摂取とした。それぞれの細胞は 10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて培養し、TrypleExpress<sup>TM</sup> を用いて剥離した後に PBS で HCT116 p53<sup>WT/WT</sup>、p53<sup>-/-</sup>、および p53<sup>R175H/R175H</sup> は  $2 \times 10^7$  cells/mL、HCT116 p53<sup>R248Q/R248Q</sup> は  $5 \times 10^7$  cells/mL になるように懸濁し、0.1 mL/body の割合で 1 週間検疫したマウスの皮下に移植した。腫瘍移植後適宜、腫瘍の縦（mm）、横（mm）及び高さ（mm）を電子ノギスの測定面で測定し、腫瘍体積（tumor volume, TV; 以下の式より算出）を求めた。

$$\text{TV (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{縦 mm} \times \text{横 mm} \times \text{高さ mm}$$

腫瘍体積 TV が 200 mm<sup>3</sup> 程度になったマウスを選別後、各処置群は 6 匹のマウスとなるように無作為に割り振り（Day 0）、薬剤投与の開始は Day 1 より行った。FTD/TPI は、0.5% HPMC 溶液に FTD と TPI をモル比 1:0.5 で混合して調製した。FTD/TPI (FTD:200 mg/kg/day) は、1 日 1 回午前中に 2 週間投与（5 日間投与、2 日間休薬：Day 1-5, 8-12 po, sid）の臨床と同一である経口投与で 10 mL/kg で投与した。

#### 統計学的解析

qRT-PCR 解析では、統計量を平均値  $\pm$  標準偏差で表し、2 群間比較でそれぞれ p53 WT 群と p53 KO 群、p53 WT 群と p53 R175H 群、p53 WT 群と p53 R248Q 群の平均値の差の有意性を Student *t*-test で評価した。p53 KO 群、p53 R175H 群または p53 R248Q 群の値が p53 WT 群よりも有意（ $p < 0.05$ ）に低値であった場合に「p53 WT と比べて有意に低発現である」と評価した。

RNA-seq の遺伝子発現解析では、(1) 緩い条件と (2) 厳しい条件に 2 種類に分けて differentially expressed gene (DEG) を抽出した。(1) 遺伝子発現データは wald 検定で比較し、*P* 値を Benjamini and Hochberg Procedure for controlling the false discovery rate (FDR) <sup>32)</sup> に よって補正した。FDR が 0.05 未満で、log fold change (logFC) の絶対値が 0 より高い遺伝子を、differentially expressed gene (DEG) とした。GO enrichment 解析 <sup>33)</sup> では、各群間の発現量比較により同定された DEG について、*p*-value  $< 0.01$ 、*q*-value  $< 0.05$  の条件で解析した。(2) 遺伝子発現データは、FDR と fold change value を用いた Welch's *t*-test で比較した。各群間で、FDR が 0.005 未満で、log FC の絶対値が 1 より大きい遺伝子を抽出し DEG とした。各群間の発現量比較により同定された DEG について、ピアソン相関係数に基づく距離を用いて階層クラスター分析を行った。各群間の多遺伝子発現の変動を主成分分析 (PCA) により比較した。これらのデータ解析ソフトウェアは、R 統計パッケージおよび GeneSpring GX software version 13.0 (Agilent Technologies) を用いた。

細胞培養実験では、統計量を平均値  $\pm$  標準偏差で表し、2 群間比較で Control 群と FTD 処理群の平均値の差の有意性を Student *t*-test で評価した。FTD 処理群の値が Control 群よりも有意（ $p < 0.05$ ）に低値であった場合に「抗腫瘍効果あり」と評価した。

動物実験では、統計量を平均値  $\pm$  標準誤差で表し、2 群間比較で Control 群と FTD/TPI 投与群の平均値の差の有意性を Aspin-Welch's *t*-test で評価した。FTD/TPI 投与群の値が Control 群よりも有意（ $p < 0.05$ ）に低値であった場合に「抗腫瘍効果あり」と評価した。

**表 1 Primer and sgRNA sequences**

| <b>sgRNA for pX330</b>    |                            |
|---------------------------|----------------------------|
| Primer                    | Sequence (5'-3')           |
| TP53 R175 sgRNA sense     | CACCGGCAGTCACAGCACATGACGG  |
| TP53 R175 sgRNA antisense | AAACCCGTCATGTGCTGTGACTGCC  |
| TP53 R248 sgRNA sense     | CACCGGTGTAACAGTTCCTGCATGGG |
| TP53 R248 sgRNA antisense | AAACCCCATGCAGGAACGTGTACACC |
| TP53 R273 sgRNA sense     | CACCGGACTGGGACGGAACAGCTTTG |
| TP53 R273 sgRNA antisense | AAACCAAAGCTGTTCCGTCCCAGTCC |

| <b>PCR to construct donor vectors</b> |                                                |
|---------------------------------------|------------------------------------------------|
| Primer                                | Sequence (5'-3')                               |
| LoxP_PGK pro (f)                      | ATCGATAAGCTTGATGGATCCTAACGCGTCGATCATATTCAATAAC |
| LoxP_PGK pro (r)                      | GCTAGCGGTAAGCTTCAGCTGCTCG                      |
| PGK ter_LoxP (f)                      | GCTAGCCGCCCCGCCCCACGACCCGC                     |
| PGK ter_LoxP (r)                      | CTGCAGGAATTCGATGGATCCTAGTGAACCTCTTCGAGGGAC     |
| Neo cassette (f)                      | AAGCTTACCGCTAGCATGATTGAAC                      |
| Neo cassette (r)                      | GGGCGGGCGGCTAGCTCAGAAGAAC                      |
| Puro cassette (f)                     | AAGCTTACCGCTAGCATGACCGAGT                      |
| Puro cassette (r)                     | GGGCGGGCGGCTAGCTCAGGCACCG                      |
| R175 UPS F                            | GCAGCCCGGGGGATCCCTTAGGAGGCTGAGGTGGGAAGATC      |
| R175 UPS R                            | CGACGCGTTAGGATCCCTGTCTCTCCAGCCCCAGCT           |
| R175 DOWNS F                          | AGGTTCACTAGGATCCTGGTTGCCAGGGTCCCCAGGCCT        |
| R175 DOWNS R                          | TAGAACTAGTGGATCCCTAATTTTTTTTTGTATTTTTTCAGT     |
| R248 UPS F                            | GCAGCCCGGGGGATCCAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGC      |
| R248 UPS R                            | CGACGCGTTAGGATCCAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGGCT        |
| R248 DOWNS F                          | AGGTTCACTAGGATCCCTGTCTGTGCCCCAGCCTCTGCTTG      |
| R248 DOWNS R                          | TAGAACTAGTGGATCCGCATAACTGCACCCTTGGTCTCCTC      |
| R273 UPS F                            | GCAGCCCGGGGGATCCACTTGCCACCCTGCACACTGGCCTG      |
| R273 UPS R                            | CGACGCGTTAGGATCCCTCCACCGCTTCTGTCTCTGCTTG       |
| R273 DOWNS F                          | AGGTTCACTAGGATCAGACCAAGGGTGCAGTTATGCCTCA       |
| R273 DOWNS R                          | TAGAACTAGTGGATCCCTTAGATTAGGTGTATTAATCCAT       |

**表 1 Primer and sgRNA sequences (Continued)**

| <b>Site-specific mutagenesis by overlap extension</b> |                               |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Primer                                                | Sequence (5'-3')              |
| TP53 F                                                | TACCAGGGCAGCTACGGTTT          |
| TP53 R                                                | ACTGGGGAGGCAGAGTTAGG          |
| p53 R175H F                                           | GGAGGTTGTGAGGCACTGCCCCACCATG  |
| p53 R175H R                                           | CATGGTGGGGCAGTGCCTCACAACCTCC  |
| p53 R248Q F                                           | GGGCGGCATGAACCAGAGGCCCATCCTCA |
| p53 R248Q R                                           | TGAGGATGGGCCTCTGGTTCATGCCGCCC |
| p53 R273H F                                           | CAGCTTTGAGGTGCATGTTTGTGCCTGTC |
| p53 R273H R                                           | GACAGGCACAAACATGCACCTCAAAGCTG |

| <b>Quickchange lightning site-directed mutagenesis kit</b> |                                                      |
|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Primer                                                     | Sequence (5'-3')                                     |
| QC175_F                                                    | CATGGCCATCTACAAGCAAAGTCAACATATGACAGAAGTTGTGAGGCACT   |
| QC175_R                                                    | AGTGCCTCACAACCTTCTGTGCATATGTTGACTTTGCTTGTAGATGGCCATG |
| QC248_F                                                    | CACTACAACCTACATGTGCAATTCAAGTTGTATGGGCGGCATGAACCAGAG  |
| QC248_R                                                    | CTCTGGTTCATGCCGCCCATACTGAATTGCACATGTAGTTGTAGTG       |
| QC273_F                                                    | GAGTAGTGGTAATCTATTAGGACGAACTCATTTGAAGTGCATGTTTGTG    |
| QC273_R                                                    | CACAAACATGCACTTCAAATGAGTTTCGTCCTAATAGATTACCACTACTC   |

| <b>Quantitative RT-PCR</b> |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| Primer                     | Sequence (5'-3')        |
| p21_F                      | AGCGATGGAACCTTCGACTTTG  |
| p21_R                      | CGAAGTCACCCTCCAGTGGT    |
| MDM2_F                     | AAATGAATCCCCCCTTCC      |
| MDM2_R                     | CACGAAGGGCCCAACATCT     |
| $\beta$ -actin_F           | CTGGCACCACACCTTCTACAATG |
| $\beta$ -actin_R           | GGCGTACAGGGATAGCACAGC   |

**表 1 Primer and sgRNA sequences (Continued)**

| <b>CEL-seq2</b>       |                                                             |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------|
| Primer                | Sequence (5'-3')                                            |
| library primer-1(RP1) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACA<br>GTCCGACGAT |
| randomhexRT           | GCCTTGGCACCCGAGAATTCCANNNNNN                                |

| <b>CEL-seq2 (RNA PCR Primer, Index)</b> |                                                                      |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Primer                                  | Sequence (5'-3')                                                     |
| RNA PCR Primer,<br>Index 11 (RPI11)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTAGCCGTGACTGGAG<br>TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA  |
| RNA PCR Primer,<br>Index 13 (RPI13)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTGACTGTGACTGGAG<br>TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA  |
| RNA PCR Primer,<br>Index 18 (RPI18)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGGACGTGACTGGA<br>GTTCCCTTGGCACCCGAGAATTCCA |
| RNA PCR Primer,<br>Index 34 (RPI34)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCCATGGTGACTGGAG<br>TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA  |
| RNA PCR Primer,<br>Index 37 (RPI37)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATATTCCGGTGACTGGAG<br>TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA  |
| RNA PCR Primer,<br>Index 42 (RPI42)     | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGATTAGTGACTGGAG<br>TTCCTTGGCACCCGAGAATTCCA  |

| <b>PCR to construct Fucci vector</b> |                                             |
|--------------------------------------|---------------------------------------------|
| Primer                               | Sequence (5'-3')                            |
| PIP-Fucci in fusion (f)              | GAGCGGCCGCGGATCCACCATGGAGCAGCGCCGCGTCACCGAC |
| PIP-Fucci in fusion (r)              | CGGTAGAATTGGATCTTACAGCGCCTTTCTCCGTTTTTC     |

| <b>PCR to construct ETS2 vector</b> |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Primer                              | Sequence (5'-3')              |
| ETS2 v1_firstM free (f)             | CACCAATGATTTCGGAATCAAGAATATGG |
| ETS2 (r)                            | TCAGTCCTCCGTGTCGGGCTGGACG     |

表 1 Primer and sgRNA sequences (Continued)

| CEL-seq2 index primer (96 Primers) |                                                                                       |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Primer                             | Sequence (5'-3')                                                                      |
| CEL-Seq2_13s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNAGTGTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_15s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCTGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV    |
| CEL-Seq2_21s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNGTACCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_23s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNGTCTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV   |
| CEL-Seq2_27s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNGTGATCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_31s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNACTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_33s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNACGTTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV   |
| CEL-Seq2_36s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCTAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV   |
| CEL-Seq2_42s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCTGTGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_45s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNTGCAATGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_49s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNTGGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_52s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNGATCTGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_55s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNAGACAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_59s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNAGGACATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_64s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCACTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_65s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCAGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV   |
| CEL-Seq2_68s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNTCACTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_69s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNTCCTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_6s                        | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNCATGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV  |
| CEL-Seq2_78s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNACCAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_82s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNCTTCACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_86s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNTGAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_90s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNGAAGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |
| CEL-Seq2_94s                       | GCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGTTCTACAGTCCGACGATC<br>NNNNNNNGACAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV |

**表 2 Reagent of CEL-Seq2**

| Product                                                                     | Supplier             | Cat#        | Step                    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------|-------------------------|
| ERCC RNA spike-in mix                                                       | Ambion               | 4456740     | Primer mix              |
| Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix                                         | NEB                  | N0047S      |                         |
| SuperScript II                                                              | invitrogen           | 18064-014   | RT reaction             |
| RNaseOUT                                                                    | invitrogen           | 10777-019   |                         |
| Second Strand buffer                                                        | invitrogen           | 10812-014   | Second strand reaction  |
| Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix                                         | NEB                  | N0047S      |                         |
| DNA Polymerase I ( <i>E. coli</i> )                                         | invitrogen           | 18010-025   |                         |
| <i>E. coli</i> DNA ligase                                                   | invitrogen           | 18052-019   |                         |
| RnaseH ( <i>E. coli</i> )                                                   | invitrogen           | 18021-071   |                         |
| AMPure XP beads                                                             | Beckman Coulter      | A63880      | cDNA cleanup            |
| MEGascript T7 Transcription Kit                                             | Ambion               | AM1334      | IVT                     |
| ExoSAP-IT For PCR Product Clia-Up                                           | Affymetrix           | 78201       | ExoSAP treatment        |
| RNAClean XP beads                                                           | Beckman Coulter      | A63987      | aRNA cleanup            |
| Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix                                         | NEB                  | N0047S      | RT reaction             |
| SuperScript II                                                              | invitrogen           | 18064-014   |                         |
| RNaseOUT                                                                    | invitrogen           | 10777-019   |                         |
| Phusion High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffers                        | NEB                  | M0531       | Primer mix              |
| Ribonuclease A (10 mg/ml)                                                   | nacalai tesque       | 30100-31    | Disassembly and removal |
| AMPure XP beads                                                             | Beckman Coulter      | A63880      | Cleanup of PCR products |
| E-Gel™ SizeSelect™ II Agarose Gels, 2%                                      | invitrogen           | G661012     | SizeSelect              |
| MinElute PCR Purification Kit (250)                                         | QIAGEN               | 28006       | Purification            |
| High Sensitivity DNA kit                                                    | Agilent Technologies | 5067-4626   |                         |
| NEBNext Library Quant Kit for Illumina                                      | NEB                  | E7630L      |                         |
| Hiseq PE Rapid Cluster Kit v2                                               | illumina             | PE-402-4002 | Run                     |
| Hiseq Rapid SBS Kit v2 (50 cycles)                                          | illumina             | FC-402-4022 |                         |
| buffer                                                                      |                      |             |                         |
| Fragmentation buffer; 200 mM tris-acetate, pH 8.1, 500 mM KOAc,150 mM MgOAc |                      |             |                         |
| Fragmentation stop buffer; 0.5 M EDTA pH 8.0                                |                      |             |                         |
| Bead binding buffer; 20% PEG8000, 2.5 M NaCl                                |                      |             |                         |

**表 3 The list of antibodies used in this study**

| Antigen           | Supplier                  | Cat #    | Dilution |
|-------------------|---------------------------|----------|----------|
| PARP              | Cell Signaling Technology | 9542     | 1:1000   |
| cleaved PARP      | Cell Signaling Technology | 5625     | 1:1000   |
| p53               | DAKO                      | M7001    | 1:1000   |
| p21               | Santa Cruz Biotechnology  | sc-397   | 1:1000   |
| Caspase 3         | Cell Signaling Technology | 9662     | 1:1000   |
| cleaved Caspase 3 | Cell Signaling Technology | 9664     | 1:500    |
| $\beta$ -actin    | Sigma                     | A5316    | 1:2000   |
| $\alpha$ -tubulin | Sigma                     | T6199    | 1:2000   |
| centromere (ACA)  | Immunovision              | HCT-0100 | 1:10000  |
| Cyclin B1         | Merk Millipore            | 05-373   | 1:500    |
| Lamin A/C         | Cell Signaling Technology | 4777     | 1:200    |

## 本論

### 第 1 章 CRISPR/Cas9 システムを用いた p53 ミスセンス変異

#### 導入細胞株の樹立

##### p53 ミスセンス変異細胞株樹立の意義

p53 ステータスの違いが抗がん剤、特に FTD の効果と生物学的プロセスを介した細胞応答に及ぼす影響を解析して明らかにすることが目的である。しかし、異なるがん由来の細胞株間で p53 ステータスの違いを比較することは、p53 ステータス以外の遺伝子的背景の違いに由来する影響を排除することはできない。さらに、p53 は多くのタンパク質との相互作用することや転写因子であることから、細胞の継代を重ねるほど二次、三次的変化が起こり、他の因子に由来して表現型に影響がでていることが推察される<sup>22)</sup>。このような問題を克服するために、野生型 (wild type, WT) p53 を有し、2 倍体の核型である HCT116 細胞に CRISPR/Cas9 システムを用いて p53 変異導入細胞株を樹立することとした。

これまでの研究で、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて p53 wild type HCT116 親細胞 (以下、p53 WT 細胞) から p53 ノックアウト HCT116 細胞 (以下、p53 KO 細胞) の樹立に成功している<sup>15,34)</sup>。本研究では、3 種類の p53 GOF 型変異ノックイン HCT116 細胞である p53<sup>R175H/R175H</sup>、p53<sup>R248Q/R248Q</sup>、および p53<sup>R273H/R273H</sup> HCT116 細胞 (以下、p53 R175H、p53 R248Q、p53 R273H 細胞) の樹立を試みた。これらの変異は、structural mutation (e.g. R175H) と DNA contact mutation (e.g. R248Q、R273H) に分類され、ヒト癌から得られた p53 変異遺伝子で最も頻度の高い変異である<sup>18,35)</sup>。

##### p53 ミスセンス変異細胞株樹立

CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術は、二本鎖切断修復経路である Homologous recombination (HR) による DNA 修復を利用する系を利用した (図 6)。p53 ミスセンス変異導入細胞株樹立への手順の概要を図 7 Workflow of CRISPR/Cas9 genome editing に示した。

はじめに、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて p53 ミスセンス変異をノックインするために、オンラインソフトウェアの CRISPRdirect を利用して single guide RNA (sgRNA) 配列をそれぞれの変異を導入するアミノ酸をコードする配列の近傍に設計した<sup>36)</sup>。設計した sgRNA 配列は表 1 Primer and sgRNA sequences に、TP53 遺伝子座上の位置は図 8 Testing p53 sgRNA cleavage efficacy に示した。それぞれの sgRNA 配列について、Guide-it<sup>TM</sup> sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems (Takara Bio) を用いて、sgRNA の標的配列特異的なゲノム切断能を確認した (図 8)。それぞれの sgRNA 配列のセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し (表 1)、アニーリングにより二本鎖オリゴ DNA とし、pX330A-1x2 (Addgene; plasmid #58766、Feng Zhang より供与<sup>37)</sup>) の BbsI 切断部位にクローニングすることで、各 sgRNA 配列に対する Cas9 のリクルートのための Scaffold domain を含む sgRNA と DNA 切断酵素 Cas9 を同時に発現するためのプラスミドベクター (p53 sgRNA (R175)、p53 sgRNA (R248)、p53 sgRNA (R273)) を構築した (図 9)。

次に、点変異導入のためのドナーベクターを構築した。HCT116 細胞由来のゲノム DNA を鋳型とし、KOD FX DNA polymerase (TOYOBO) により、それぞれの標的遺伝子座の sgRNA 配列近傍に約 500bp の左腕および右腕 DNA 断片を増幅した。左腕、右腕にはそれぞれ変異を導入するアミノ酸を含むエクソンとそれに隣接するエクソンがスプライシング部位を含む形で組み込んだ。また、左腕と右腕の結合部位には人為的に BamHI 認識部位を組み込んだ。In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio) を用いて左腕、右腕の DNA 断片を pBluescript SK+ΔBamHI (Bam HI 切断配列が人為的に破壊されている) の EcoRV 切断部位にクローニングした。目的の p53 ミスセンス変異は QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いてこのプラスミド上で導入した。この時、同キットを用いて、左腕、右腕 DNA 断片上の protospacer adjacent motif (PAM) 配列および sgRNA target 配列にも CRISPR/Cas9 による再切断を防ぐためのサイレント変異を導入した。適切な変異を導入した左腕と右腕の間の人為的に組み込まれた BamHI 切断部位に、ピューロマイシンまたはネオマイシン耐性カセット (それぞれ *loxP* 配列に挟まれた構造) をクローニングし、ドナーベクターとした (pDonor(R175H)-puro, pDonor(R175H)-neo など、図 10) プラスミド構築のためのプライマーの配列は表 1 Primer and sgRNA sequences に示した。

HCT116 細胞の目的のゲノム部位の改変は、図 10 Schematic design of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting に示す方法で行った。まず、HCT116 細胞に 4D Nucleofector (Lonza) を用いて、単一の sgRNA 標的配列を含む pX330 プラスミド (p53 sgRNA) 1 μg と、ピューロマイシン耐性カセットまたはネオマイシン耐性カセットを有する 2 つのドナー DNA プラスミド (pDonor-puro, pDonor-neo) を各々 1 μg を導入した。24 時間後、適切な細胞密度で P100 ディッシュに再播種し、さらに 2 日後からピューロマイシン (0.5 μg/mL) と G418 (ネオマイシン) (800 μg/mL) (Thermo Fisher) で 10~14 日二重選択し、コロニーを形成させた。単一細胞由来のコロニーはクローニングリングを用いて単離し、各クローンについて細胞を増殖させ、ゲノム DNA を抽出し、ゲノム PCR とシーケンスによりスクリーニングを行った。両アリアル目的の変異が導入された細胞は、R175H、R248Q、R273H それぞれ 2/48 (4%)、3/48 (6%)、0/55 (0%) であった。p53 R273H 変異を導入された細胞が得られなかった理由は明らかではないが、片アリアルに目的の変異が導入された細胞も得られなかったことから、pDonor (R273H) プラスミドがゲノム上の相同配列に組み込まれにくい構造的な理由が存在することが予想される。

両アリアル目的の p53 R175H および p53 R248Q 変異が導入された細胞株 2 クローンずつ選別、*TP53* 遺伝子座に組み込まれたピューロマイシンおよびネオマイシン耐性カセットの除去を行った。方法は Cre Recombinase Gescicles (Takara Bio) を用いた核内への Cre recombinase タンパク質導入法を用い、Cre-*loxP* 組換えシステムを機能させることにより薬剤耐性カセットを除去し、再度クローニングを行い、p53 R175H および p53 R248Q 細胞を樹立した。p53 R175H および p53 R248Q 細胞については、ゲノムシーケンスにより、目的の変異が両アリアルにノックインされていることを確認した (図 11)。樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞について、その細胞形態および増殖倍加時間を p53 WT 細胞および p53 KO 細胞と比較したところ、以後の実験に用いる際に考慮が必要となるような差は認められな

った (図 12)。

以上の結果より、ゲノム上に p53 GOF 型変異のみを導入した HCT116 細胞である p53 R175H および p53 R248Q 細胞の樹立に成功した。

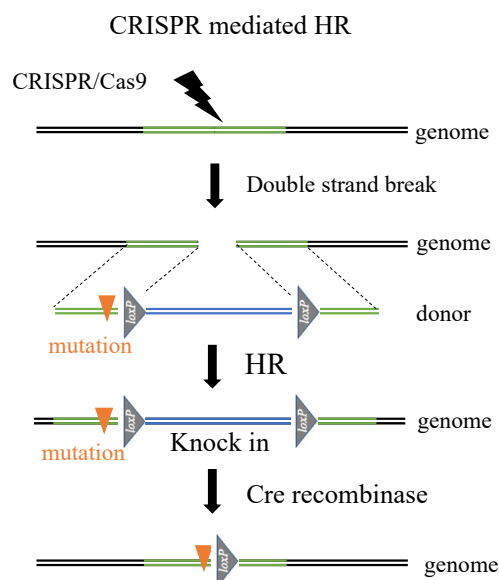


図 6 HR mediated gene knock-in

CRISPR/Cas9 genome editing technology was selected for a system that utilizes DNA repair by homologous recombination (HR), a double-strand break repair pathway. The drug resistance cassettes integrated into the genome were removed by the Cre-loxP recombination system. The green area is the target gene site. The blue area is the drug resistant cassettes site.

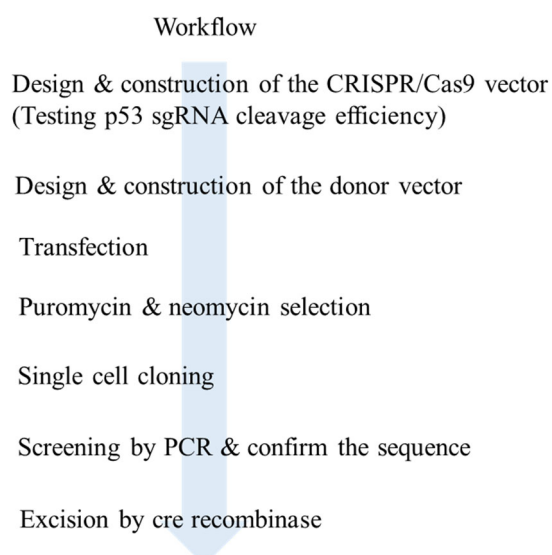
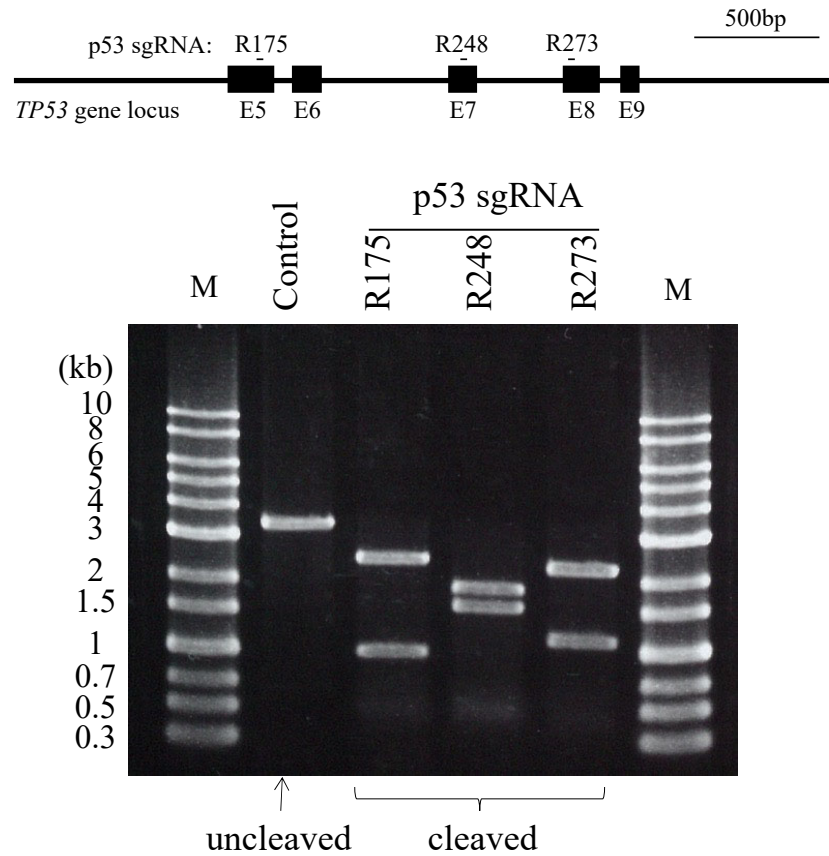
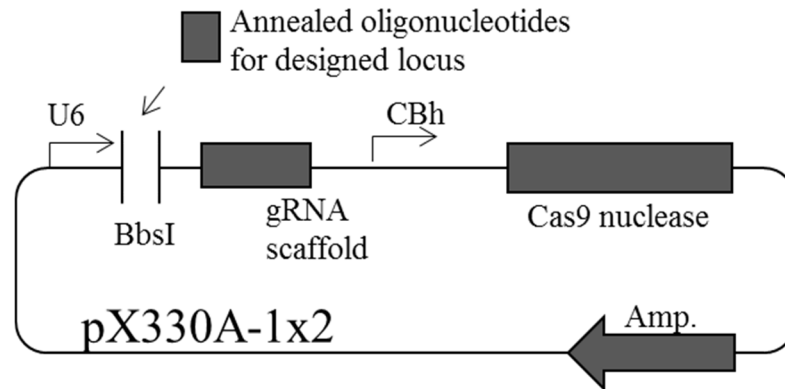


図 7 Workflow of CRISPR/Cas9 genome editing



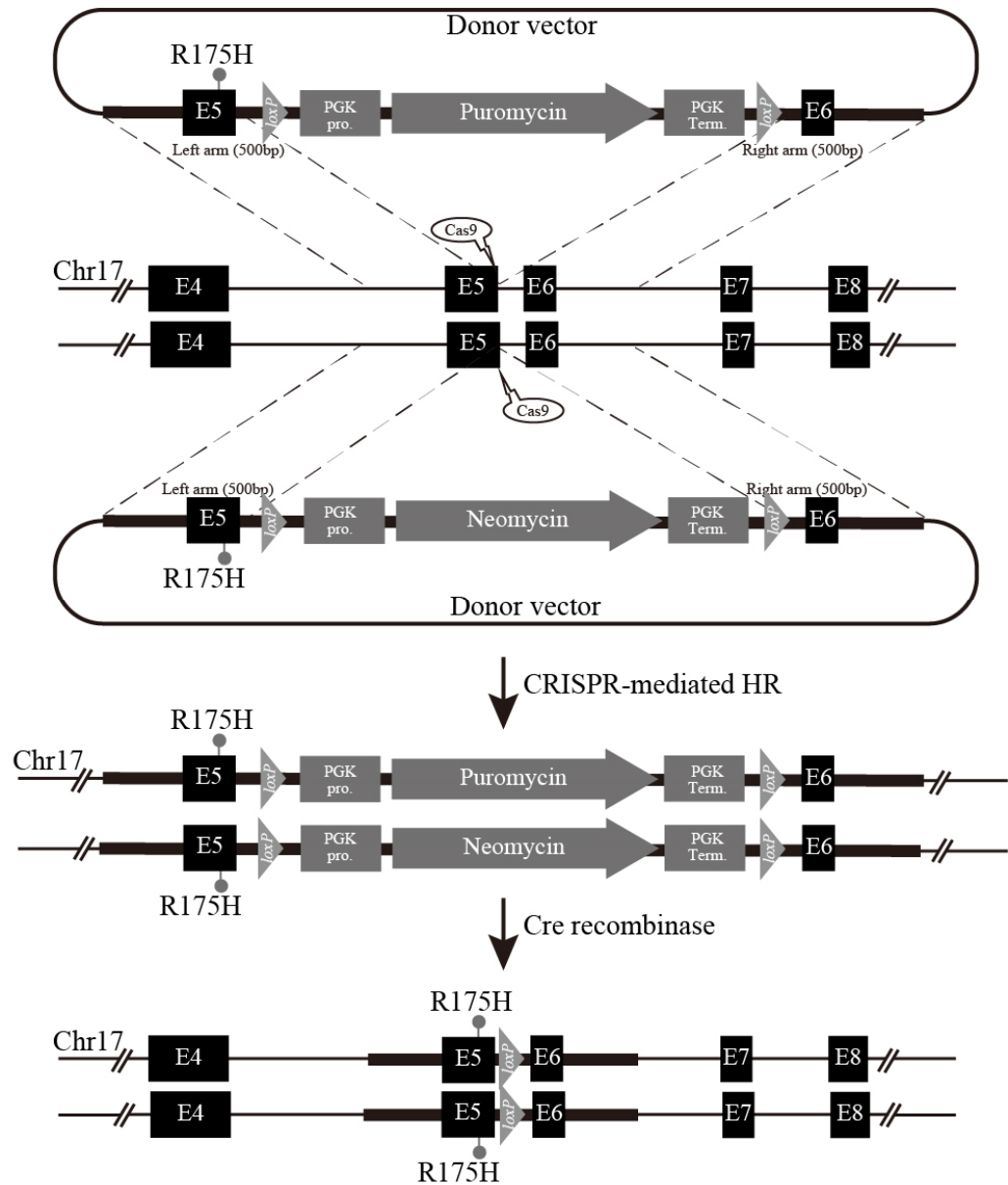
#### **图 8 Testing p53 sgRNA cleavage efficacy**

For each sgRNA sequence, the target sequence-specific genome cleavage ability of the sgRNA was confirmed using Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems (Takara Bio). Agarose gel electrophoresis image shows the separation of DNA fragments (0.8 % agarose gel/TAE). Lane M shows 1 kbp ladder maker. Lane control shows the untreated Control Fragment. Lane R175H, R248 and R273 shows the treated target fragment. sgRNA indicate small guide RNA; E, exon; bp, base pair; and kb, kilo base pair.



### **9 Construction of CRISPR/Cas9 expression vectors**

To knock-in p53 missense mutation using the CRISPR/Cas9 genome editing system, single guide RNA (sgRNA) sequences were designed using the online software CRISPRdirect<sup>36)</sup>. The sense and antisense oligonucleotides were annealed and cloned into the BbsI site of pX330A-1x2 (Addgene; plasmid #58766), which was a gift from Feng Zhang<sup>37)</sup>. Amp indicates ampicillin; U6, U6 promoter; and CBh, CBh promoter.



**图 10 Schematic design of CRISPR/Cas9-mediated gene targeting**

To establish the p53 missense mutation knock-in cell lines, HCT116 cells were co-transfected with the pX330 plasmid containing the single guide RNA target sequence and two donor DNA plasmids harboring puromycin or neomycin resistance cassette using a 4D Nucleofector (Lonza). After double selection with puromycin and G418 (neomycin), each clone was screened by genomic PCR and sequencing. The puromycin and neomycin resistance cassettes integrated into the *TP53* loci were removed by the Cre-loxP recombination system. Cre recombinase proteins were delivered into p53 missense mutation knock-in cells using Cre Recombinase Gesicles. E indicate exon; Chr, chromosome; HR, homologous recombination; PGK, phosphoglycerate kinase; pro, promoter, and term, terminator.

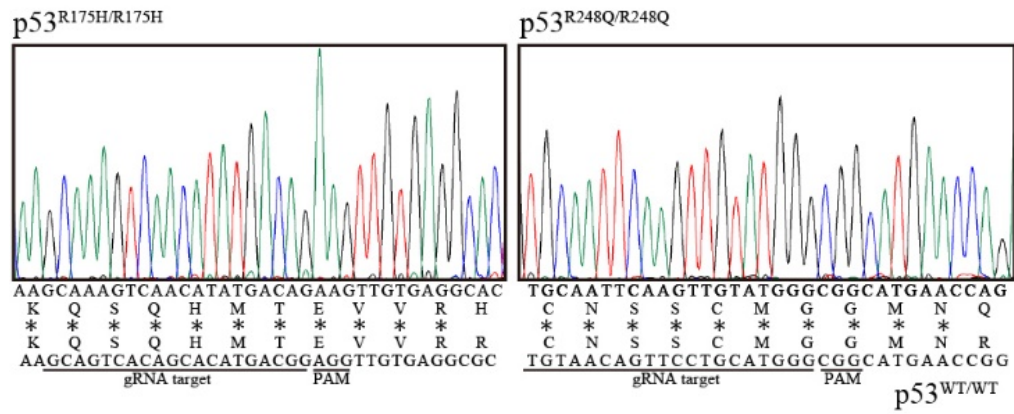
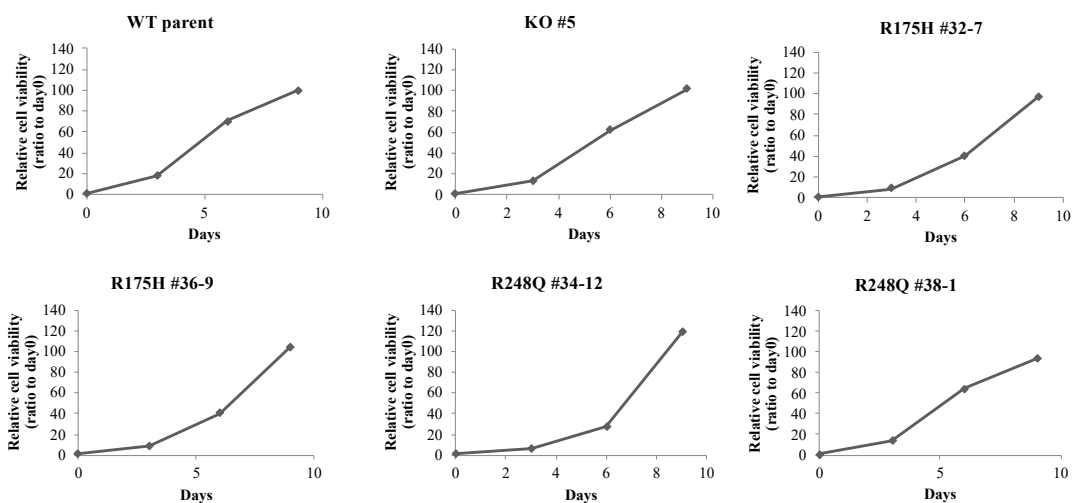
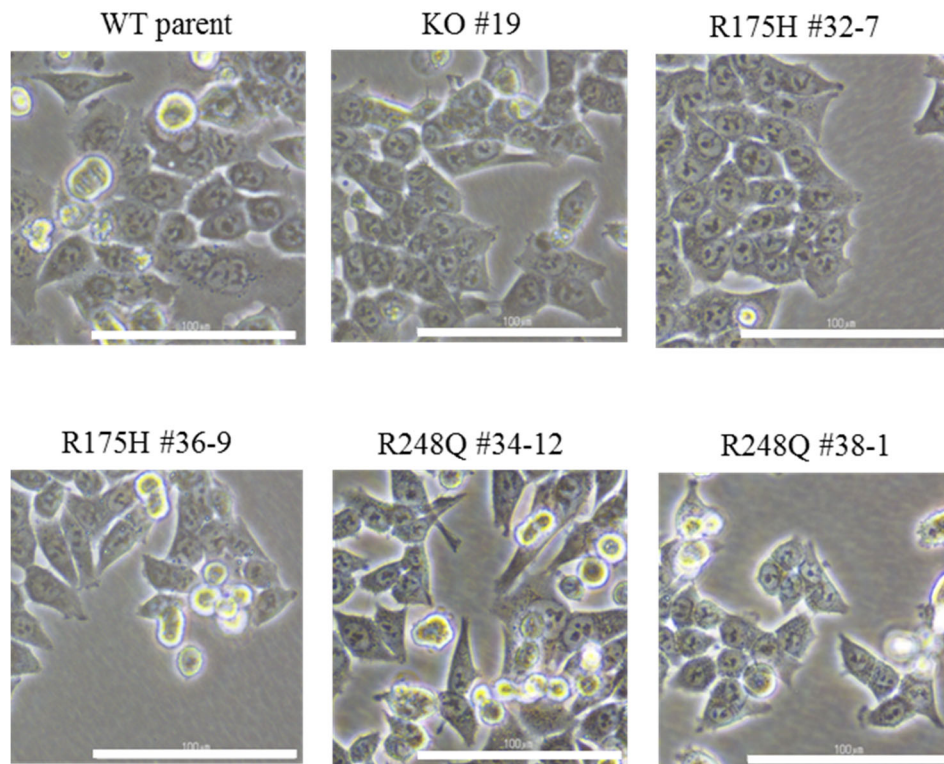


图 11 Sequence analysis of the CRISPR/Cas9-target site

p53 R175H and p53 R248Q cells were confirmed by genome sequencing to have the desired mutation knocked into both alleles. WT indicates wild type; PAM, protospacer adjacent motif; and gRNA, guide RNA.



## 12 Morphology and proliferation doubling time of p53 missense mutant cells

Representative images were taken on mid-log phase. Scale bar, 100  $\mu$ m. Cell growth was measured by CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Cell Viability Assay on the indicated days. Data are means (n=3). WT indicate p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

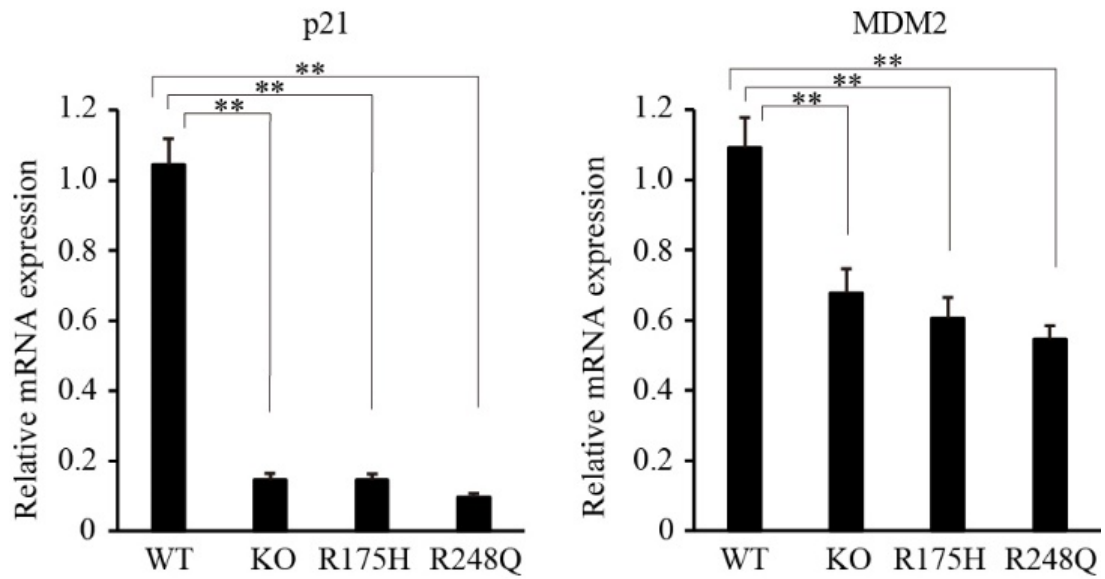
### p53 ミスセンス変異細胞株の薬剤応答

樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞における p53 の機能について評価するために、通常増殖時の p53 標的遺伝子である p21 および MDM2 の mRNA 発現レベルを qRT-PCR により評価した。HCT116 (p53 WT) 細胞と比較し、p53 R175H および p53 R248Q 細胞では、p53 KO 細胞と同様に p21 および MDM2 の mRNA 発現レベルが有意に低かった (図 13)。この結果は、*TP53* 遺伝子の 1 アミノ酸変異により、p53 の正常な機能が失われたことを意味している。

次に、樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞の p53 を活性化する様々な DNA 損傷誘導剤に対する応答について評価を行った。使用した薬剤はヌクレオシドアナログ系薬剤 (FTD および 5-FU)、DNA 架橋系薬剤 (シスプラチン)、DNA 複製阻害系薬剤 (アフィジコリン)、DNA 切断系薬剤 (ネオカルジノスタチン) である。

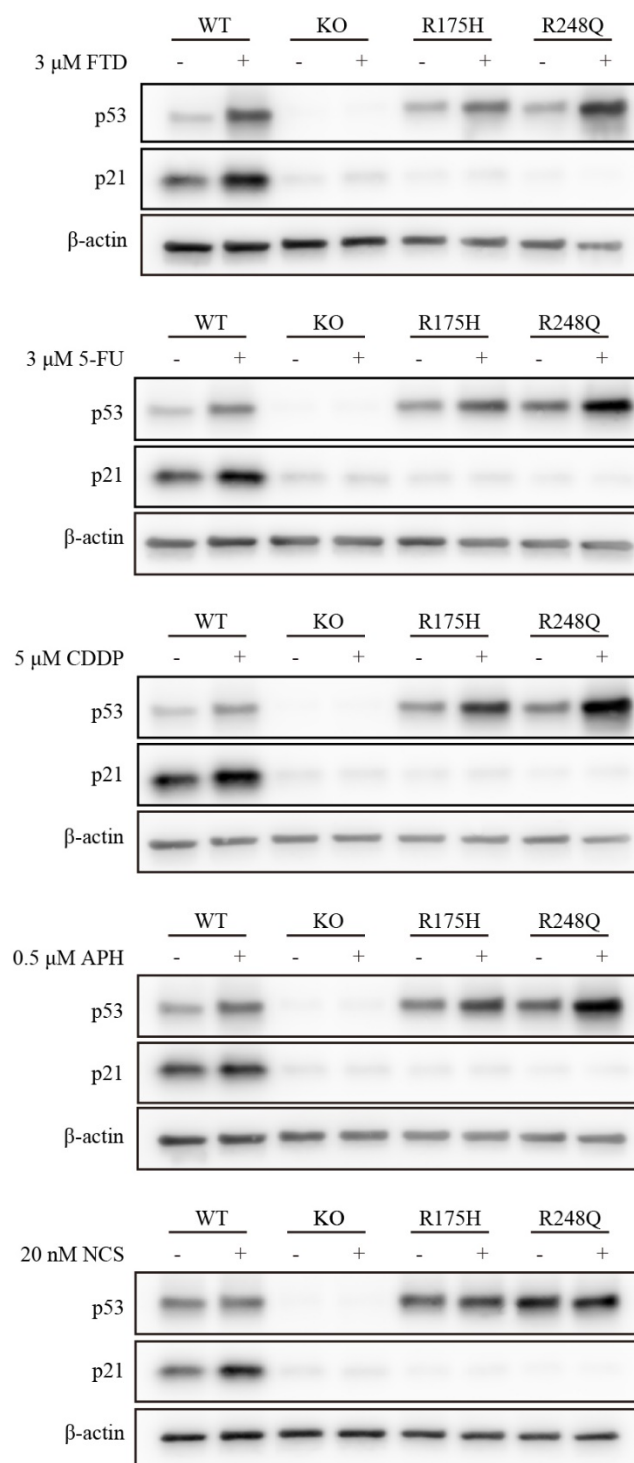
p53 R175H および p53 R248Q 細胞において、p53 KO 細胞と同様、通常増殖時の p21 タンパク質発現量は p53 WT 細胞に比べ減少しており、mRNA 発現解析の結果と一致した (図 14)。DNA 損傷誘導剤を作用させた時、p53 R175H および p53 R248Q 細胞において、p53 タンパク質の蓄積が p53 WT 細胞と同様に確認された。すなわち DNA 損傷誘導剤に対して p53 タンパク質自体は応答したにもかかわらず、p53 WT 細胞と異なり p53 R175H および p53 R248Q 細胞の両方で DNA 損傷誘導剤による p21 蓄積を誘導されなかった。これらのデータは、p53 ミスセンス変異タンパク質が、p53 WT の持つ転写活性化能について機能喪失 (loss of function, LOF) していることを意味する。これらの結果は、クローン間差の違いを反映したものではないことを他のクローンを用いた実験により確認した (図 15)。

以上の結果より、p53 にわずか 1 アミノ酸の置換をゲノム上で導入するだけで、正常な p53 の機能を喪失した細胞に変質してしまい、DNA 損傷誘導剤に対する応答 (p21 タンパク質の蓄積) が不全になってしまうことが明らかになった。



☒ 13 qRT-PCR Analysis of mRNA expression levels of p53 target gene p21 and MDM2

The cells were cultured to mid-log phase and collected for extracting total RNA. Expression of *CDKN1A* (*p21*) and *MDM2* was assessed by real time-PCR and normalized by  $\beta$ -actin. Results are displayed as mean + s.d. (n = 6). Statistical analysis was done Student *t*-test. \*\*:  $p < 0.01$ . WT indicate p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.



**图 14 Reaction of the p53-p21 signaling pathway with DNA damaging agents**

Western blot analysis of RIPA extracts; HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of 3  $\mu$ M trifluridine (FTD), 3  $\mu$ M 5-fluorouracil (5-FU), 5  $\mu$ M cisplatin (CDDP), 0.5  $\mu$ M aphidicolin (APH) and 20nM neocarzinostatin (NCS) for 24 hour and harvested. WT indicate p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

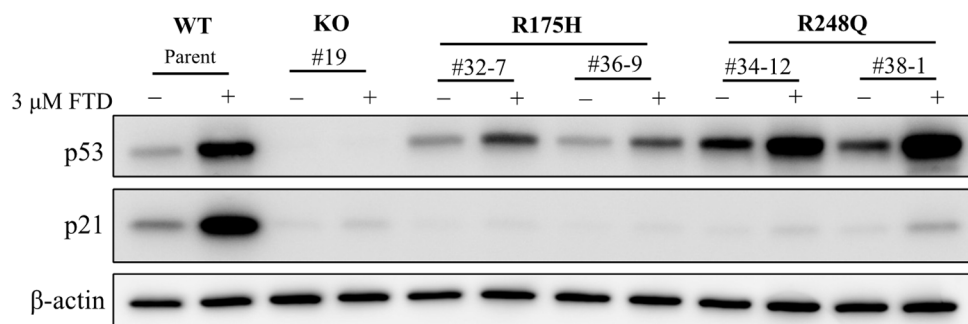


図 15 Reaction of the p53-p21 signaling pathway with trifluridine

Western blot analysis of RIPA extracts; HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of 3 μM trifluridine (FTD) for 48 hour and harvested. WT indicate p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

## 考察

p53 は DNA 損傷、老化、癌遺伝子活性化、低酸素などのストレスに応答して活性化することで、さまざまな遺伝子を転写誘導する。さらに p53 は癌で最も高頻度に変異を認める遺伝子であり、癌化において p53 の機能喪失 (LOF) は重要である。臨床の癌組織における p53 はそのほとんどがアミノ酸置換をとまなうミスセンス変異であることが知られているが、いくつかのミスセンス変異はあたかも癌遺伝子のように癌の進行をむしろ加速するようにふるまうことが報告された<sup>21,22)</sup>。そのメカニズムとして、p53 ミスセンス変異がクロマチン制御因子の発現上昇を誘導し、その結果ゲノムワイドにクロマチン制御を変化させエピゲノム異常を起こすことで癌の増殖を亢進させることが示された。このような p53 ミスセンス変異は、癌抑制遺伝子としての本来の機能を喪失するのみならず p53 が本来転写標的としない遺伝子を発現誘導する機能獲得型 (GOF) 変異であることが示されている<sup>22)</sup>。本研究では、p53 WT を発現するヒト癌細胞株 HCT116 を親株として、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により、ゲノム上に GOF としての報告のある p53 ミスセンス変異 (R175H と R248Q) のみを導入した細胞株の樹立に成功した。この細胞株を用いることにより、ゲノム上に p53 ミスセンス変異が導入されたことによる癌細胞に及ぼす影響の正確な評価が可能となり、ヒト腫瘍で最も高頻度で検出される p53 ミスセンス変異を標的とした治療戦略を構築するために有用なモデル細胞となることが期待される。

ゲノム編集は DNA 二重鎖切断の修復機構を利用するため、導入する細胞の特徴に合わせた戦略を決めることは成功率を高めるのに重要である。真核細胞において DNA 二重鎖切断は主に非相同末端連結 (non-homologous end joining, NHEJ) と相同組換え (homologous recombination, HR) の 2 つの経路を介して修復される<sup>38)</sup>。これらの修復経路は補完的な役割を果たしており、NHEJ による修復は細胞周期を通して可能であるのに対し、相同組換えは姉妹染色分体の存在する S 期から G2 期にしか起こらないと考えられている。NHEJ による修復は、切断部位の再連結に伴って塩基の挿入や欠失を伴うことがあるため、修復の

正確性は低い。それに対し、HR による修復は正確である。今回のように点変異をゲノム上に挿入する場合、ドナーDNA を利用した HR 経路による修復が必要である。HCT116 は他の癌細胞株に比べ HR を介したゲノム編集の成功確率が高いことが知られており、今回親株として使用したが、2 種の薬剤を用い、2 つのアリールに同時に正確に変異を導入できた割合は最高で 6 % であった。このようにゲノム配列の精密な編集は依然として非効率的であるが、今後、小分子の利用や哺乳類細胞における DNA 修復機構の研究成果を活用した様々な改良を通じて効率が上がれば<sup>39)</sup>、この技術の汎用性も高まると期待される。

本研究で樹立に成功した p53 ミスセンス変異導入細胞は、p53 WT 細胞および p53 KO 細胞と比較したところ、その形態および通常培養における増殖能において、今後の実験に用いる際に考慮が必要となるような違いは認められなかった。これらの p53 ミスセンス変異導入細胞に DNA 損傷剤を処理すると、p53 は蓄積したにもかかわらず、p21 の蓄積は誘導されなかった。p53 ミスセンス変異導入細胞が抗がん剤などにより DNA 損傷を受けた場合、p53-p21 による増殖抑制機能の喪失した状態で、癌細胞の増殖に関わるとされる GOF p53 の蓄積が起こるということであり、癌治療に及ぼす影響について慎重に検討する必要がある。

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術により HCT116 の p53 ミスセンス変異導入細胞株シリーズを樹立できたことで、p53 変異以外は同一の遺伝的背景での表現型の比較検証が可能になったことは有意義であると考えられる。本研究で樹立した p53 ミスセンス変異導入細胞株が、今後の癌研究の発展に貢献することが期待される。

## 第2章 p53 ミスセンス変異導入細胞株の網羅的遺伝子発現

### プロファイル解析

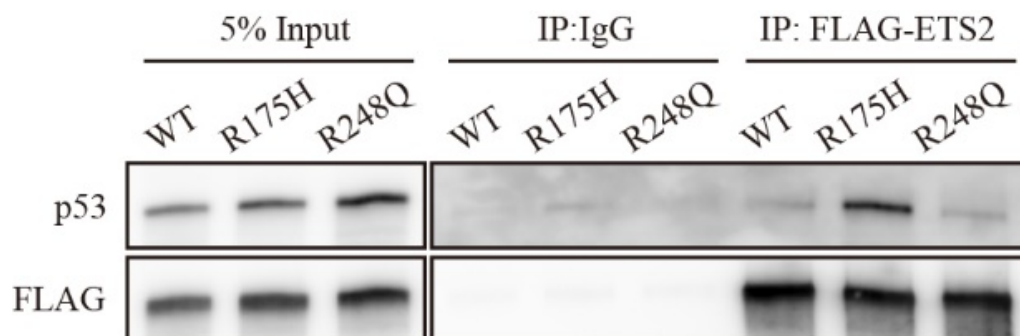
#### p53 ミスセンス変異と転写因子 ETS2 との相互作用

樹立した p53 R175H 細胞と p53 R248Q 細胞では、野生型 p53 の機能が喪失していることが示された。しかし、上記細胞ではミスセンス変異をもつ p53 が発現していることも確かめられており、このタンパク質には野生型 p53 とは異なる機能があると考えられている。ミスセンス変異が導入された時に産生される p53（ミスセンス変異 p53 と呼ぶ）は、野生型 p53 との相互作用が確認されないようなタンパク質と相互作用し、新たな機能を発揮することが報告されている。例えば、ミスセンス変異 p53 はファミリーメンバーである p63 および p73 と相互作用し、それらのアポトーシス誘導能を無効にすることができることや、他の転写因子（NF-Y、E2F1、VDR など）と相互作用し機能することが報告されている<sup>40,41)</sup>。これらの相互作用は、ミスセンス変異 p53 がどのように遺伝子発現を調節し、異常な細胞増殖、血管新生および転移を促進するかを説明するのに重要である<sup>42-46)</sup>。R175H および R248Q のような DNA 結合ドメイン内にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異 p53 は、野生型 p53 とは相互作用しないような転写因子と結合し、特有の遺伝子群の発現を誘導することが報告されている<sup>22,47,48)</sup>。中でも、E26 transformation-specific (ETS) ファミリーの一員である ETS2 は、ミスセンス変異 p53 と特異的に相互作用することが知られている<sup>22,47)</sup>。この相互作用を介し、ミスセンス変異 p53 はクロマチン制御因子（ヒストンメチルトランスフェラーゼの Mll1, Mll2 やヒストンアセチルトランスフェラーゼの Moz）の転写調節領域に結合し、その発現を増加させ、ゲノムワイドにヒストンのメチル化やアセチル化を亢進させることで、がんの進展に寄与していることが報告されている<sup>22)</sup>。

本研究では、樹立した p53 R175H および p53 R248Q 細胞におけるミスセンス変異 p53 タンパク質と ETS2 との相互作用について評価した。まず、p53 WT 細胞、p53 R175H 細胞、および p53 R248Q 細胞を用いて、抗 p53 抗体による共免疫沈降を行い、沈降物内の ETS2 が検出されるかを検討したが、ETS2 を検出することができなかった（data not shown）。この結果は、これらの細胞での ETS2 発現がウェスタンブロッティングによる検出に十分でないことが原因である可能性が考えられた。そこで、ETS2 遺伝子をクローニングし、N 末に FLAG タグを付加した ETS2 発現ベクターを構築し、上記細胞に一過的に過剰発現させ、抗 FLAG 抗体による共免疫沈降を行った。その結果、FLAG-ETS2 と p53 R175H との相互作用が確認された（図 16）。しかし、p53 WT や p53 R248Q との相互作用は確認されなかった。ETS2 と p53 R248Q については、これまでの報告で相互作用することが示されているが、p53 R175H および R248W との相互作用に比べて弱いことが示唆されていた<sup>22,47)</sup>。今回の条件で実施した共免疫沈降解析では、ETS2 と p53 R248Q との相互作用は、ETS2 と p53 WT との相互作用と比較して明確な違いは確認できなかった。

以上の結果より、p53 R175H は ETS2 との相互作用を介し、新たな機能を獲得した GOF ミスセンス変異 p53 タンパク質である可能性が示された。また、p53 R248Q は既報通り p53

R175H に比べ ETS2 との相互作用が弱いことが確認され、p53 の変異の種類による機能の違いがあることが示唆された。



**図 16 Interaction study of p53 and ETS2 proteins using co-immunoprecipitation analysis**

Co-immunoprecipitation of HCT116 p53 WT, p53 R175H or p53 R248Q cells expressed Flag-ETS2 with p53, followed by western blot. WT indicate p53 wild type cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

### CEL-Seq2 法による RNA-seq 解析

p53 R175H と ETS2 との相互作用が確認されたことから、p53 R175H が GOF ミスセンス変異 p53 タンパクであることが示唆された。その一方、p53 R248Q と ETS2 との相互作用は検出できず、この 2 つのミスセンス変異 p53 タンパクについて、その機能に違いがある可能性があった。ミスセンス変異 p53 発現により細胞に起こる変化の全体像を捉えるために、p53 WT、p53 KO、p53 R175H または p53 R248Q 細胞間でゲノムワイドに遺伝子発現の差異を比較検討したいと考えた (図 17)。遺伝子発現の状態を網羅的に解析する方法であるトランスクリプトーム解析には DNA マイクロアレイや次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing; NGS) などがある。近年、NGS 技術の開発が急速に進展し、がんゲノムから多様な微生物群に至るまで、多くの知見がもたらされている<sup>49)</sup>。NGS 技術 RNA-seq 解析の基盤技術は多数にのぼり、コスト、リード数、シーケンサー、全長 or 3'端、細胞数、1 細胞ピッキング等、目的に応じた解析基盤の選択が重要になっている<sup>49,50)</sup>。そこで、本研究では試験目的を網羅的遺伝子発現解析に絞り、安価、検出感度が高く、少量のサンプルから解析が可能な RNA シーケンス (RNA-seq) 解析である CEL-Seq2 法を選択した<sup>29,51,52)</sup>。この方法の特徴は mRNA の PolyA 領域近傍のみを読むことで少ないリード数でより多くの遺伝子発現情報を取得することができ、実験毎の補正が可能で多くのサンプルを比較解析することができる。

p53 WT、p53 KO、p53 R175H または p53 R248Q 細胞の RNA-seq 解析では、クローン化におけるバイアスを除去するために、それぞれ 2 つの独立したクローンと p53 WT につい

ては HCT116 親株を加え、コントロール (FTD 未処理群) と FTD 処理群からサンプリングを行った。また、サンプル間の実験誤差を除去し統計学的手法が可能となるように、それぞれ 6 つのレプリケートでサンプリングを実施した。具体的には、それぞれの細胞は、6-well plate に 100000 cells/well で細胞を播種し 24 時間培養した後、3  $\mu$ M FTD または溶媒 (水) で 48 時間処理した。このようにして合計 108 個のサンプルを回収し、total RNA を抽出した (図 17、表 4)。RNA-seq ライブラリは、CEL-seq2 法を用いた既報の方法<sup>29)</sup>に基づき自ら調製した。

CEL-seq2 ライブラリは、Illumina HiSeq 1500 system (Illumina) を用いて、リード 1 は 15 サイクル、リード 2 は 45 サイクルでシーケンスを行い<sup>53)</sup>、ペアエンドリードをこのプラットフォームで生成した。解析に必要である出力した FASTQ 形式シーケンスデータファイルとサンプルとインデックスプライマーとの対応は、表 4 Correspondence between FASTQ data files and samples and index primer に示した。これらの FASTQ 形式シーケンスデータファイルおよびメタデータは、DDBJ Sequence Read Archive (DRA) にデポジットした (アクセッション番号: DRA014321)。

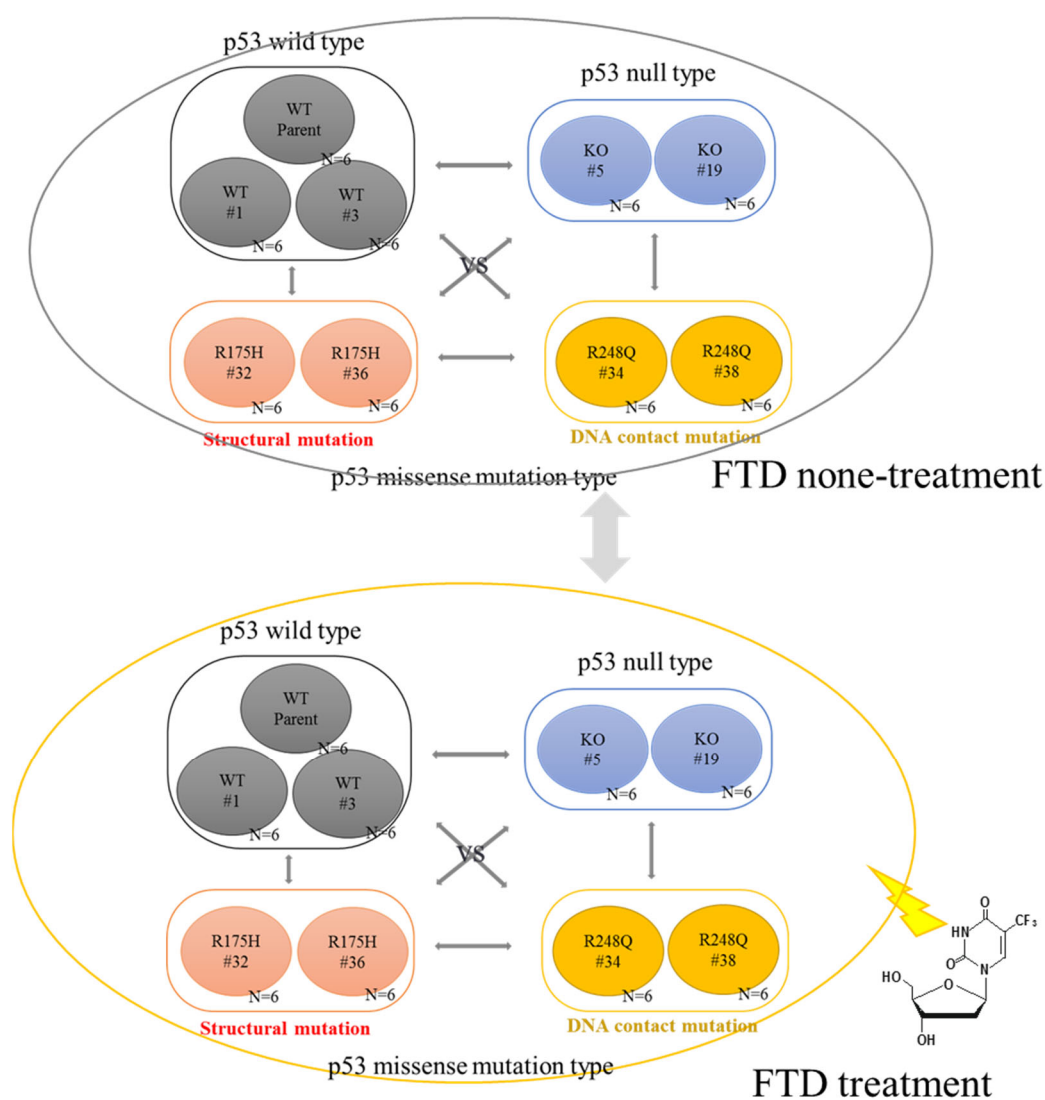
FASTQ 形式のシーケンスは、FastQC (v0.11.9) を用いて配列の品質評価をした。サンプル毎の Total read 数によりサンプル間のバラツキを確認したところ、解析を進める上で十分な品質であることを確認した (図 18)。アダプターのトリミングには、Trim Galore! (v0.6.0) を使用した。HISAT2 (version 2.1.0) を用いて、Ensembl (release 84) のヒトリファレンスゲノムである GRCh38/hg38 にマッピングした。2 回に分けて NGS 測定した run1 と run2 の間の batch effect 除去 (図 19) およびリードカウントデータから発現変動遺伝子を検出するために DESeq2 を用いた<sup>54-56)</sup>。DESeq2 で解析した発現プロファイルは、wald 検定で比較し、 $p$  値を FDR<sup>32)</sup>によって補正した。緩い条件として FDR が 0.05 未満で、log fold change (logFC) の絶対値が 0 より高い遺伝子を、differentially expressed gene (DEG) とみなし、その総数をグラフ化した (図 20)。Expression gene count すなわち DEG の数は、p53 ミスセンス変異細胞どうしでの比較 (R248Q vs. R175H) は少なく、一方で p53 ミスセンス変異細胞 vs. p53 KO (R248Q vs. KO, R175H vs. KO) では多い。この結果より、p53 ミスセンス変異細胞と p53 KO では遺伝子発現プロファイルは異なることを示唆した。FTD を処理した細胞同士の R248Q vs. R175H, R248Q vs. p53 KO および R175H vs. p53 KO (FTD\_R248Q vs. FTD\_p53 175H, FTD\_R248Q vs. FTD\_p53 KO, FTD\_R175H vs. FTD\_p53 KO) は少なく、一方で FTD を処理した細胞同士の p53 ミスセンス変異細胞 vs. p53 WT および p53 KO vs. p53 WT (FTD\_KO vs. FTD\_WT, FTD\_R248Q vs. FTD\_WT, FTD\_R175H vs. FTD\_WT) では多い。この結果より、FTD を処理した p53 ミスセンス変異細胞および p53 KO と p53 WTの間では、FTD によって応答する遺伝子発現プロファイルは異なることを示唆しており、細胞周期が違う細胞群を比較している影響が大きいと考えられた。その他、p53 ミスセンス変異細胞 vs. p53 WT、FTD 処理細胞 vs. FTD 未処理細胞では比較的多い。

次に GO enrichment 解析では、各 p53 ステータス間の発現量の比較により同定された DEG について、 $p$ -value < 0.01、 $q$ -value < 0.05 の条件で解析しプロットした<sup>33)</sup> (図 21)。図 21 Comparison of GO enrichment of gene clusters に記された横軸ラベルの拡大図は、図 22 Excerpt of GO category に示した。p53 ミスセンス変異細胞同士の比較では、プロットは小さ

く数が少なかったため、特徴は類似している傾向だった。p53 ミスセンス変異細胞と p53 WT、p53 KO と p53 WT、p53 ミスセンス変異細胞と p53 KO の比較では、プロットの数が多かったため、特徴は異なる傾向だった。また、FTD を処理した細胞同士の p53 ミスセンス変異細胞と p53 KO の比較では、プロットの数が多かったため、遺伝子発現レベルでの応答は異なる傾向であった。

代表的な p53 標的遺伝子を抽出して遺伝発現プロファイルの比較することで、p53 ミスセンス変異細胞の LOF を確認した。その結果、p53 ミスセンス変異細胞は通常の細胞増殖で、*CDKN1A* (*p21*)、*MDM2*、*BTG2*、*BBC3* (*PUMA*)、*BAX* および *SFN* (*14-3-3 sigma*) は、*p21* および *MDM2* の発現レベルは p53 WT 細胞と比べて減少していた (図 23)。逆に、通常の細胞増殖の p53 ミスセンス変異細胞が p53 WT 細胞と比べて発現レベルが増加している遺伝子を抽出すると、*GPT2*、*ATF4*、*ASNSP4*、*PSAT1*、*SLC7A1* および *SLC3A2* など、p53 ミスセンス変異でアミノ酸代謝をはじめとするがん代謝に関わる遺伝子発現が増加していた<sup>57,58)</sup> (図 23)。

以上の結果より、CEL-Seq2 法による RNA-seq 解析により、GOF p53 の機能獲得による変化の全体像を捉えることができ、p53 WT、KO、R175H または R248Q 細胞間のゲノムワイド遺伝子発現の差異を比較検討することが可能であった。一方で、FTD 処理による遺伝子発現レベルでの細胞応答の違いを解析する目的で、FTD 処理実験をしたが、FTD 処理群は細胞周期の影響を排除できないデータであることが示唆された。p53 標的遺伝子の発現量を比較することで、p53 ミスセンス変異細胞の LOF を確認できた。さらに、p53 ミスセンス変異で特徴的に遺伝子発現が増加していた因子を抽出することができ、GOF に関連していることが示唆された。GO enrichment 解析において、p53 ミスセンス変異細胞は p53 WT とも、p53KO とも異なる遺伝子発現プロファイルであることを捉えることができた。



☒ 17 Schematic diagram of RNA-seq running sample

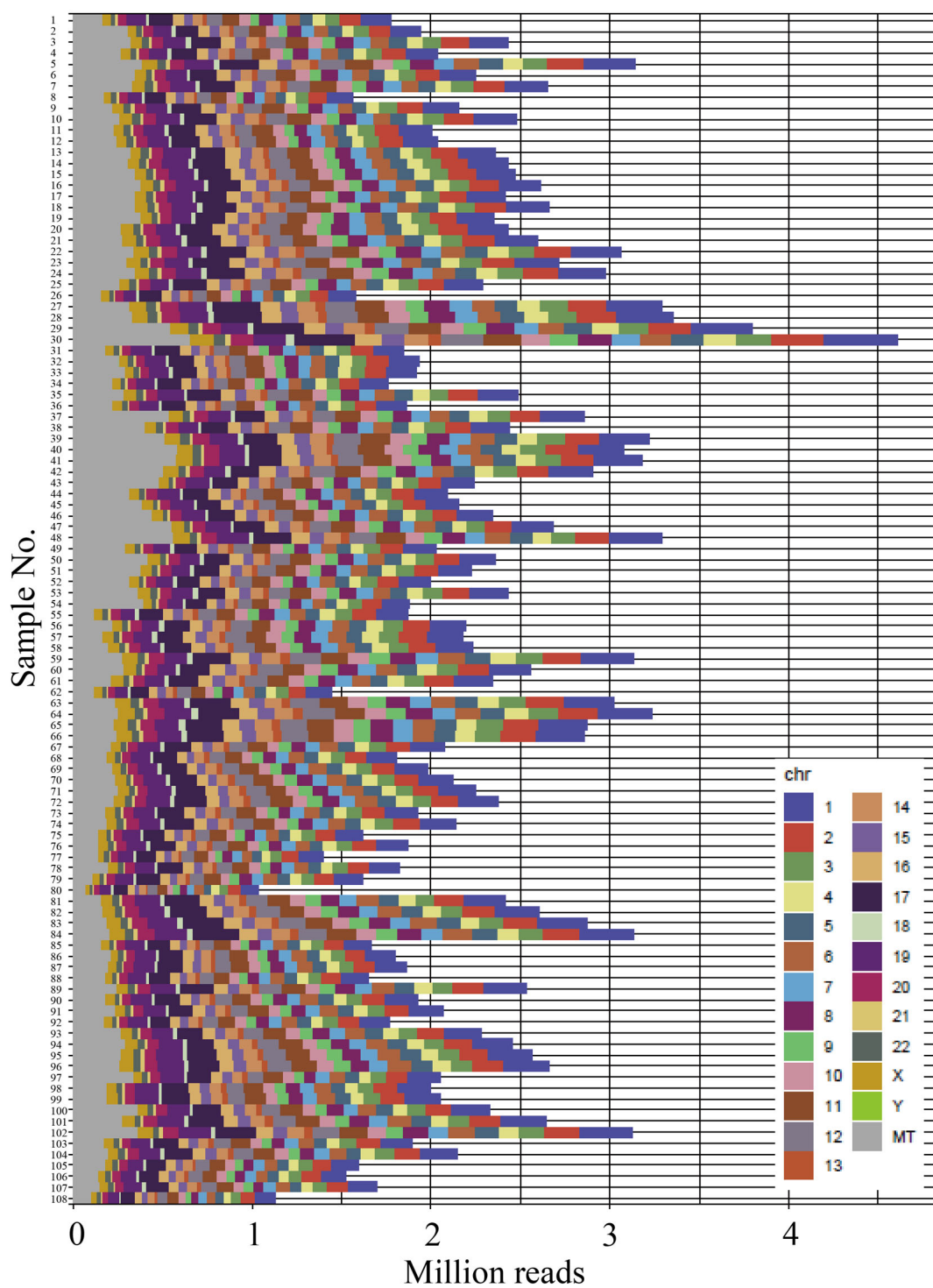
For RNA-seq analysis of p53 WT, KO, R175H or R248Q cells, p53 WT was added to two independent clones plus HCT116 parental line and divided into control (FTD untreated) and FTD treated groups. Each was performed in six replicates. After 48 hours of treatment, a total of 108 samples were collected for total RNA extraction. RNA-seq library was prepared with CEL-seq2 technique as described previously. FTD indicates trifluridine; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

表 4 Correspondence between FASTQ data files and samples and index primer

| Run1                                                                            |                       |            |                                    |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Mixture ID.                                                                     | Sample name           | Sample No. | CEL-seq2 index primer (96 primers) | RNA PCR primer, index            |
| Data file: HCT116p53mix1-3 S1 R1 001.fastq, HCT116p53mix1-3 S1 R2 001.fastq     |                       |            |                                    |                                  |
| mix1                                                                            | p53WTparent-1         | 103        | CEL-Seq2_6s                        | RNA PCR Primer, Index 11 (RPI11) |
|                                                                                 | p53WTparent-2         | 104        | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-1     | 73         | CEL-Seq2_15s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-2     | 74         | CEL-Seq2_21s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-1     | 7          | CEL-Seq2_49s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-2     | 8          | CEL-Seq2_52s                       |                                  |
| mix2                                                                            | p53WTparent-3         | 105        | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTparent-4         | 106        | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-3     | 75         | CEL-Seq2_31s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-4     | 76         | CEL-Seq2_36s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-3     | 9          | CEL-Seq2_59s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-4     | 10         | CEL-Seq2_64s                       |                                  |
| mix3                                                                            | p53WTparent-5         | 107        | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTparent-6         | 108        | CEL-Seq2_55s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-5     | 77         | CEL-Seq2_42s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone36-6     | 78         | CEL-Seq2_45s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-5     | 11         | CEL-Seq2_78s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone5-6     | 12         | CEL-Seq2_90s                       |                                  |
| Data file: HCT116p53mix10-12 S2 R1 001.fastq, HCT116p53mix10-12 S2 R2 001.fastq |                       |            |                                    |                                  |
| mix10                                                                           | p53KOclone5-1         | 61         | CEL-Seq2_49s                       | RNA PCR Primer, Index 34 (RPI34) |
|                                                                                 | p53KOclone5-2         | 62         | CEL-Seq2_52s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-1     | 49         | CEL-Seq2_6s                        |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-2     | 50         | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-1 | 19         | CEL-Seq2_15s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-2 | 20         | CEL-Seq2_21s                       |                                  |
| mix11                                                                           | p53KOclone5-3         | 63         | CEL-Seq2_59s                       |                                  |
|                                                                                 | p53KOclone5-4         | 64         | CEL-Seq2_64s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-3     | 51         | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-4     | 52         | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-3 | 21         | CEL-Seq2_31s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-4 | 22         | CEL-Seq2_36s                       |                                  |
| mix12                                                                           | p53KOclone5-5         | 65         | CEL-Seq2_78s                       |                                  |
|                                                                                 | p53KOclone5-6         | 66         | CEL-Seq2_90s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-5     | 53         | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTparent-6     | 54         | CEL-Seq2_55s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-5 | 23         | CEL-Seq2_42s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone36-6 | 24         | CEL-Seq2_45s                       |                                  |
| Data file: HCT116p53mix13-15 S3 R1 001.fastq, HCT116p53mix13-15 S3 R2 001.fastq |                       |            |                                    |                                  |
| mix13                                                                           | p53KOclone19-1        | 55         | CEL-Seq2_6s                        | RNA PCR Primer, Index 37 (RPI37) |
|                                                                                 | p53KOclone19-2        | 56         | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-1     | 37         | CEL-Seq2_65s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-2     | 38         | CEL-Seq2_68s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-1 | 25         | CEL-Seq2_49s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-2 | 26         | CEL-Seq2_52s                       |                                  |
| mix14                                                                           | p53KOclone19-3        | 57         | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | p53KOclone19-4        | 58         | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-3     | 39         | CEL-Seq2_69s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-4     | 40         | CEL-Seq2_82s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-3 | 27         | CEL-Seq2_59s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-4 | 28         | CEL-Seq2_64s                       |                                  |
| mix15                                                                           | p53KOclone19-5        | 59         | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | p53KOclone19-6        | 60         | CEL-Seq2_55s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-5     | 41         | CEL-Seq2_86s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone1-6     | 42         | CEL-Seq2_94s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-5 | 29         | CEL-Seq2_78s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone34-6 | 30         | CEL-Seq2_90s                       |                                  |

表 4 Correspondence between FASTQ data files and samples and index primer (Continued)

| Run2                                                                            |                       |     |                                    |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-----|------------------------------------|----------------------------------|
| Mixture ID.                                                                     | Sample name           | No. | CEL-seq2 Index primer (96 Primers) | RNA PCR Primer, Index            |
| Data file: HCT116p53mix4-6_S1_R1_001.fastq, HCT116p53mix4-6_S1_R2_001.fastq     |                       |     |                                    |                                  |
| mix4                                                                            | p53WTclone1-1         | 91  | CEL-Seq2_65s                       | RNA PCR Primer, Index 13 (RPI13) |
|                                                                                 | p53WTclone1-2         | 92  | CEL-Seq2_68s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-1     | 79  | CEL-Seq2_49s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-2     | 80  | CEL-Seq2_52s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-1    | 1   | CEL-Seq2_6s                        |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-2    | 2   | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
| mix5                                                                            | p53WTclone1-3         | 93  | CEL-Seq2_69s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTclone1-4         | 94  | CEL-Seq2_82s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-3     | 81  | CEL-Seq2_59s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-4     | 82  | CEL-Seq2_64s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-3    | 3   | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-4    | 4   | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
| mix6                                                                            | p53WTclone1-5         | 95  | CEL-Seq2_86s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTclone1-6         | 96  | CEL-Seq2_94s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-5     | 83  | CEL-Seq2_78s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone34-6     | 84  | CEL-Seq2_90s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-5    | 5   | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53KOclone19-6    | 6   | CEL-Seq2_55s                       |                                  |
| Data file: HCT116p53mix7-9_S2_R1_001.fastq, HCT116p53mix7-9_S2_R2_001.fastq     |                       |     |                                    |                                  |
| mix7                                                                            | p53WTclone3-1         | 97  | CEL-Seq2_15s                       | RNA PCR Primer, Index 18 (RPI18) |
|                                                                                 | p53WTclone3-2         | 98  | CEL-Seq2_21s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-1     | 85  | CEL-Seq2_6s                        |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-2     | 86  | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-1 | 13  | CEL-Seq2_65s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-2 | 14  | CEL-Seq2_68s                       |                                  |
| mix8                                                                            | p53WTclone3-3         | 99  | CEL-Seq2_31s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTclone3-4         | 100 | CEL-Seq2_36s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-3     | 87  | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-4     | 88  | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-3 | 15  | CEL-Seq2_69s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-4 | 16  | CEL-Seq2_82s                       |                                  |
| mix9                                                                            | p53WTclone3-5         | 101 | CEL-Seq2_42s                       |                                  |
|                                                                                 | p53WTclone3-6         | 102 | CEL-Seq2_45s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-5     | 89  | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R248Qclone38-6     | 90  | CEL-Seq2_55s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-5 | 17  | CEL-Seq2_86s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R175Hclone32-6 | 18  | CEL-Seq2_94s                       |                                  |
| Data file: HCT116p53mix16-18_S3_R1_001.fastq, HCT116p53mix16-18_S3_R2_001.fastq |                       |     |                                    |                                  |
| mix16                                                                           | p53R175Hclone32-1     | 67  | CEL-Seq2_65s                       | RNA PCR Primer, Index 42 (RPI42) |
|                                                                                 | p53R175Hclone32-2     | 68  | CEL-Seq2_68s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-1     | 43  | CEL-Seq2_15s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-2     | 44  | CEL-Seq2_21s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-1 | 31  | CEL-Seq2_6s                        |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-2 | 32  | CEL-Seq2_13s                       |                                  |
| mix17                                                                           | p53R175Hclone32-3     | 69  | CEL-Seq2_69s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone32-4     | 70  | CEL-Seq2_82s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-3     | 45  | CEL-Seq2_31s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-4     | 46  | CEL-Seq2_36s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-3 | 33  | CEL-Seq2_23s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-4 | 34  | CEL-Seq2_27s                       |                                  |
| mix18                                                                           | p53R175Hclone32-5     | 71  | CEL-Seq2_86s                       |                                  |
|                                                                                 | p53R175Hclone32-6     | 72  | CEL-Seq2_94s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-5     | 47  | CEL-Seq2_42s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53WTclone3-6     | 48  | CEL-Seq2_45s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-5 | 35  | CEL-Seq2_33s                       |                                  |
|                                                                                 | FTD-p53R248Qclone38-6 | 36  | CEL-Seq2_55s                       |                                  |



✉ 18 Total read count on chromosome of each samples

The total read count per sample confirmed the sample-to-sample variation to be of sufficient quality to proceed with the analysis. Colors correspond to chromosome numbers in the legend. X-axis is read count. Y-axis is samples.

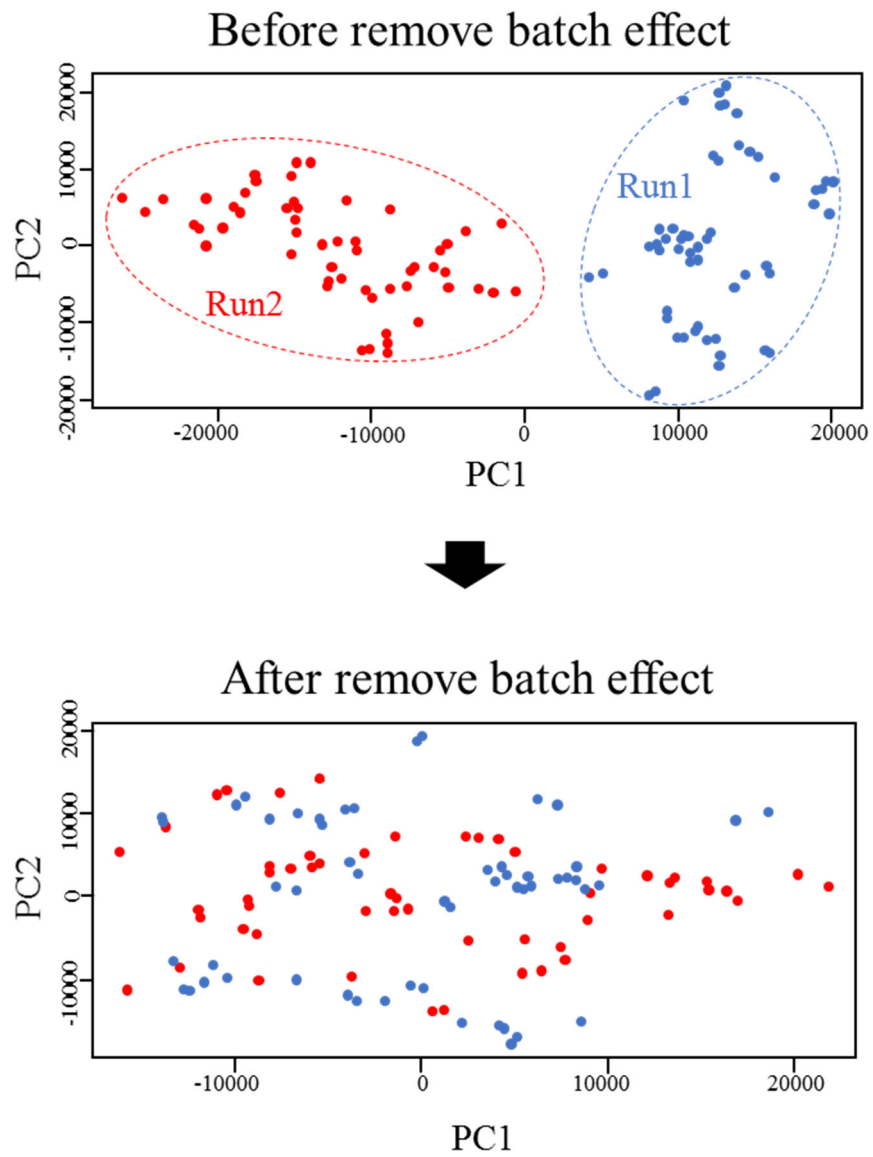
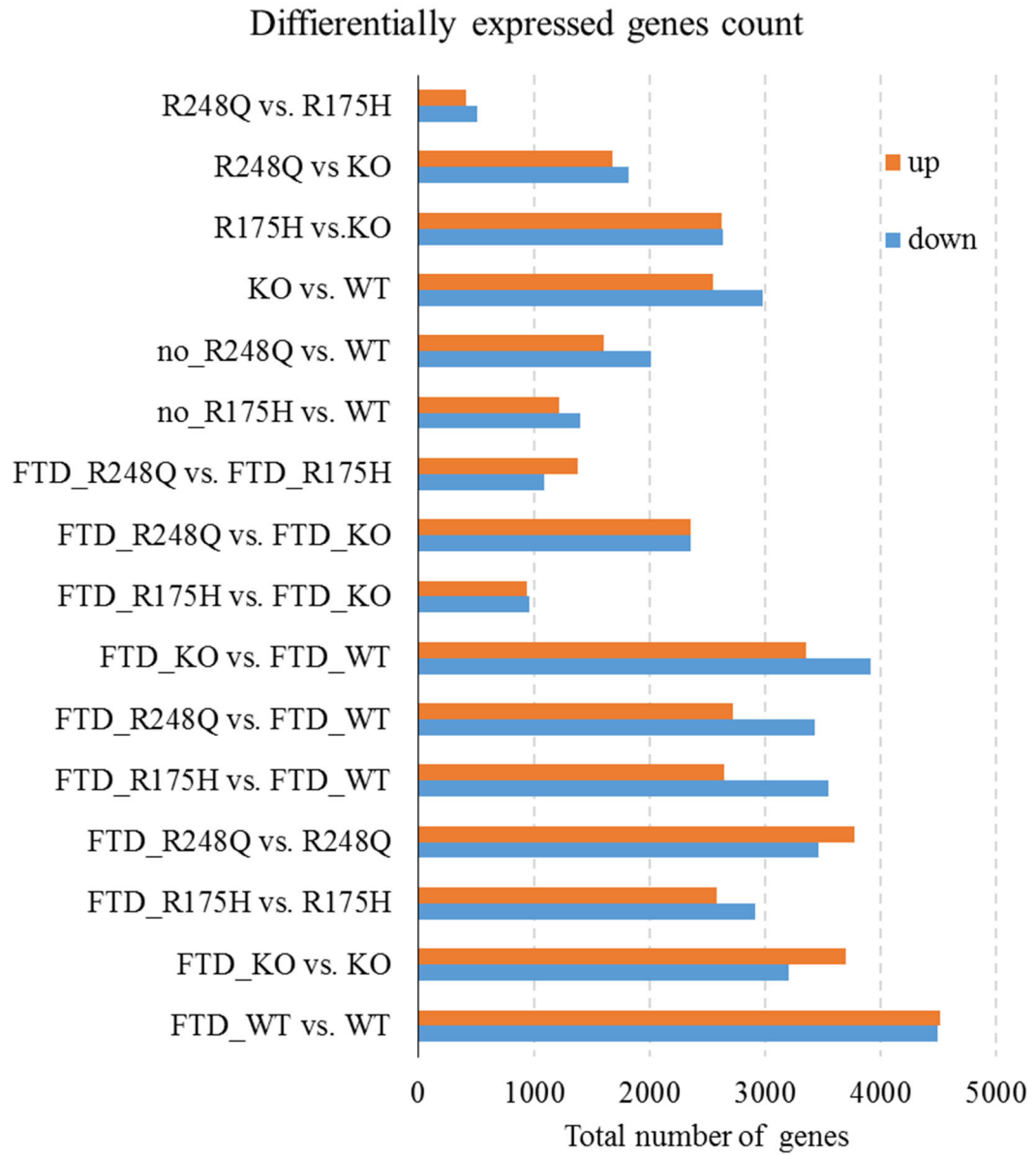


图 19 Comparison of Run1 and Run2 by principal components analysis

The batch effects between run1 and run2 were removed by DEseq2.



☒ 20 Total number of differentially expressed genes

$p < 0.05$  and log foldchange greater than or less than 0 were counted as genes with differentially expressed genes. FTD indicates trifluridine; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.



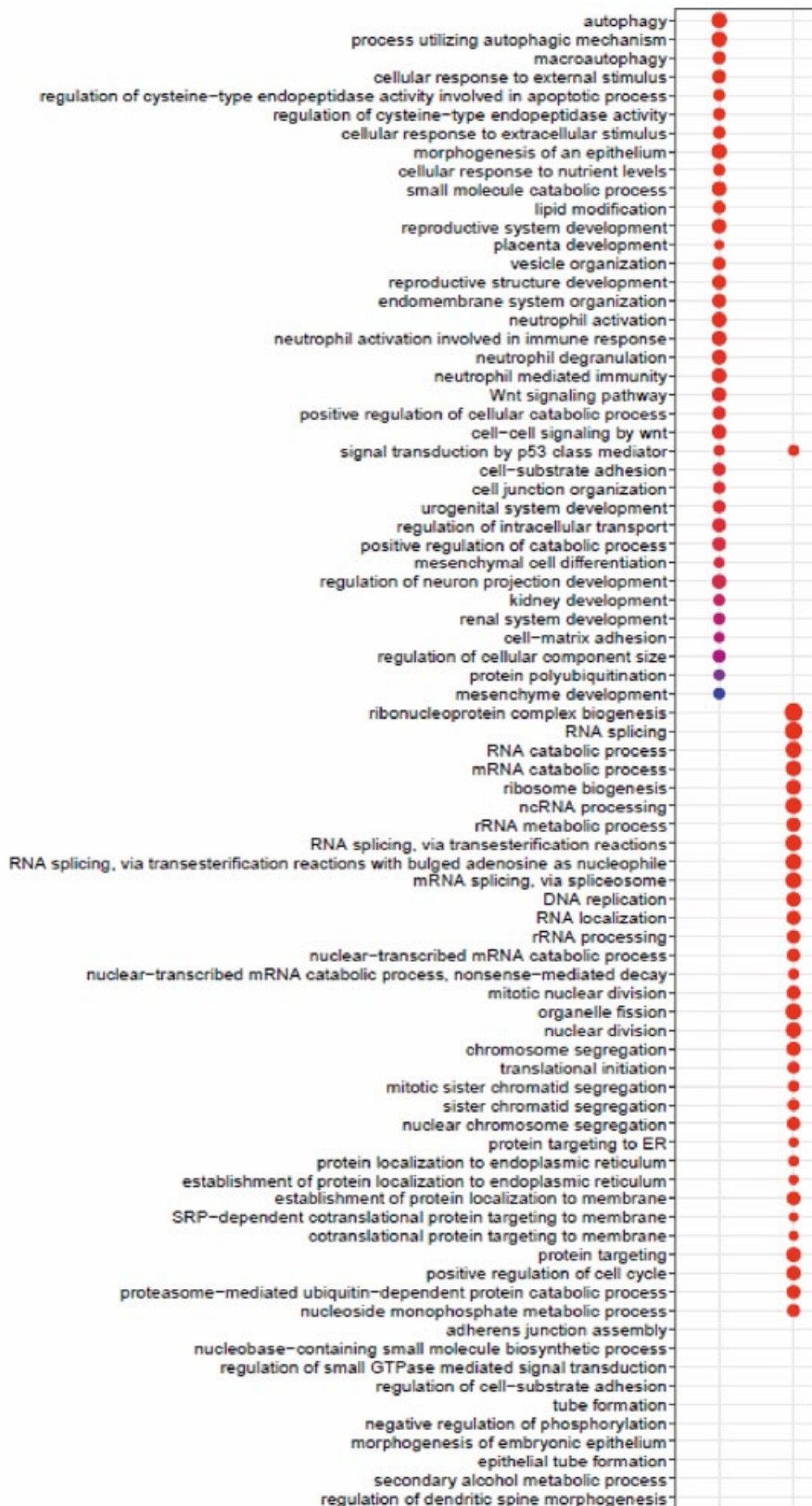
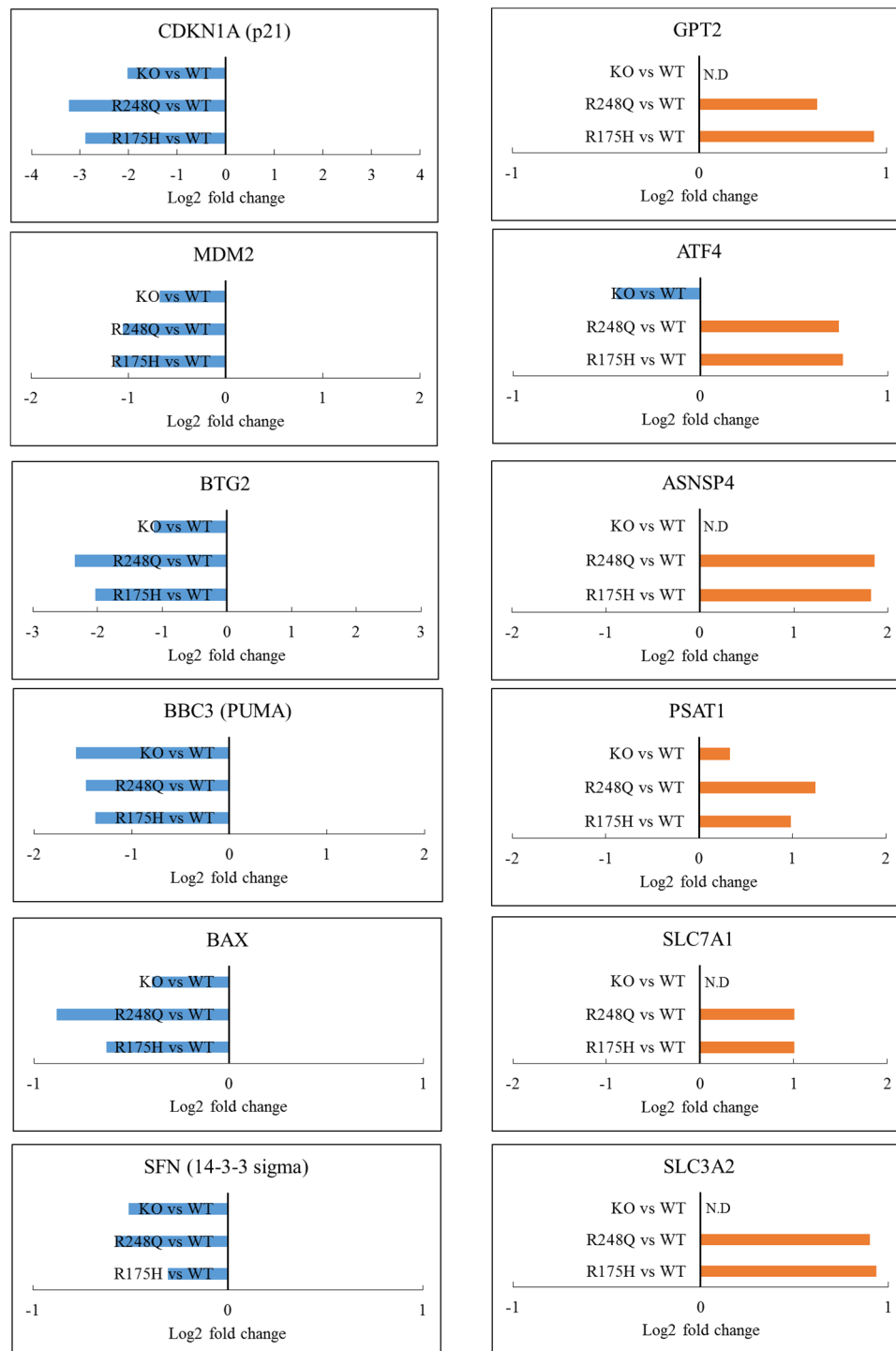


图 22 Excerpt of GO category

Enlarged view of the horizontal axis labels of Comparison of GO enrichment of gene clusters. The figure is tilted 90 degrees to the left. The order from right to left corresponds to the order from top to bottom. GO indicates gene ontology.



**Figure 23 Gene expression analysis of loss-of-function and gain-of-function related genes**

Loss of function of p53 missense mutant cells were confirmed by extracting representative p53 target genes (*CDKN1A*; *p21*, *MDM2*, *BTG2*, *BBC3*; *PUMA*, *BAX*, *SFN*; *14-3-3 sigma*) and comparing their genetic expression profiles. Genes with increased expression levels in p53 missense mutant cells compared to p53 WT cells were extracted (*GPT2*, *ATF4*, *ASNSP4*, *PSAT1*, *SLC7A1*, *SLC3A2*). N.D. indicates non-differentially expressed gene by cut-off of FDR < 0.05; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

## 機能獲得型 p53 ミスセンス変異細胞の遺伝子発現プロファイル

GO enrichment 解析において、p53 ミスセンス変異細胞は p53 WT とも、p53KO とも異なる遺伝子発現プロファイルであることを捉えることができた。さらに、精度を上げて比較するために対象群を絞って解析を実施した。具体的には、FTD 処理群は細胞周期の影響を排除できないデータであることが示唆されたため除外、比較条件を揃えるために HCT116 親株群も除外、つまりは p53 WT、KO、R175H または R248Q 細胞の RNA-seq 解析では、2 つの独立したクローンに、それぞれ 6 つのレプリケートで実施した (図 24)。解析について、マッピングしたリードは featureCounts (v.1.6.4) を用いてその遺伝子数をカウントし、counts per million (CPM) に変換後に log2 変換した。そこで、box plot および violin view で遺伝子発現の全体像を可視化した。その結果、正規化できており比較解析する上で問題無い分布であることを確認した (図 25)。また、p53 WT は p53 KO および p53 ミスセンス変異細胞群と比較して、発現量に差異のある遺伝子群が存在していた。発現プロファイルは、FDR<sup>32)</sup> と fold change value を用いた Welch's *t* test で比較した。具体的には、p53 WT 群、p53 KO 群、p53 ミスセンス変異細胞群で総当たりし、厳しい条件である FDR が 0.005 未満で、log FC の絶対値が 1 より大きい遺伝子を抽出し DEG とみなした (図 26)。これら抽出した DEG の包含関係を可視化するためにベン図を作成した (図 27)。p53 ミスセンス変異細胞 vs. p53 WT では、p53 KO vs. p53 WT の 207 遺伝子と比較して多い 401 遺伝子が抽出された。

次に、各 p53 ステータス間の発現量の比較により同定された DEG について、ピアソン相関係数に基づく距離を用いて階層クラスター分析を行った (図 28)。また、各 p53 ステータス間の多遺伝子発現の変動を主成分分析 (PCA) により比較した (図 29)。最初の 2 つの主成分を細胞の分子プロファイルデータに当てはめ、2 次元空間にプロットした。また、各主成分軸が捉えた分散の累積寄与率を算出した結果、X 軸は 36.16%、Y 軸は 14.42% であった。これらのデータ解析は、R 統計パッケージおよび GeneSpring GX software version 13.0 (Agilent Technologies) を用いた。

その結果、抽出された 572 の遺伝子からなる遺伝子発現プロファイルデータから、ゲノム編集による p53 ステータス変化が、これらの細胞の遺伝子発現に明らかな変化を引き起こすことが示された (図 28)。GOF p53 タンパク質と ETS2 の相互作用では、p53 R175H と R248Q との間で違いを示すことができた一方で、RNA-seq 解析で p53WT および KO と比較すると、両方の GOF p53 細胞で遺伝子発現プロファイルが近いことが明らかになった。この観察と一致して、主成分分析 (PCA) プロットは、p53 R175H と R248Q クラスター間の発現プロファイルの重複を示したが、p53 WT および KO のクラスターは、p53 R175H と R248Q を含む GOF p53 のクラスターと区別できた (図 29)。

これらの結果は、HCT116 細胞のゲノム編集によって樹立した p53 R175H および R248Q 変異細胞は p53 KO とは明らかに異なるプロファイルを示し、GOF p53 細胞として機能していることを示した。

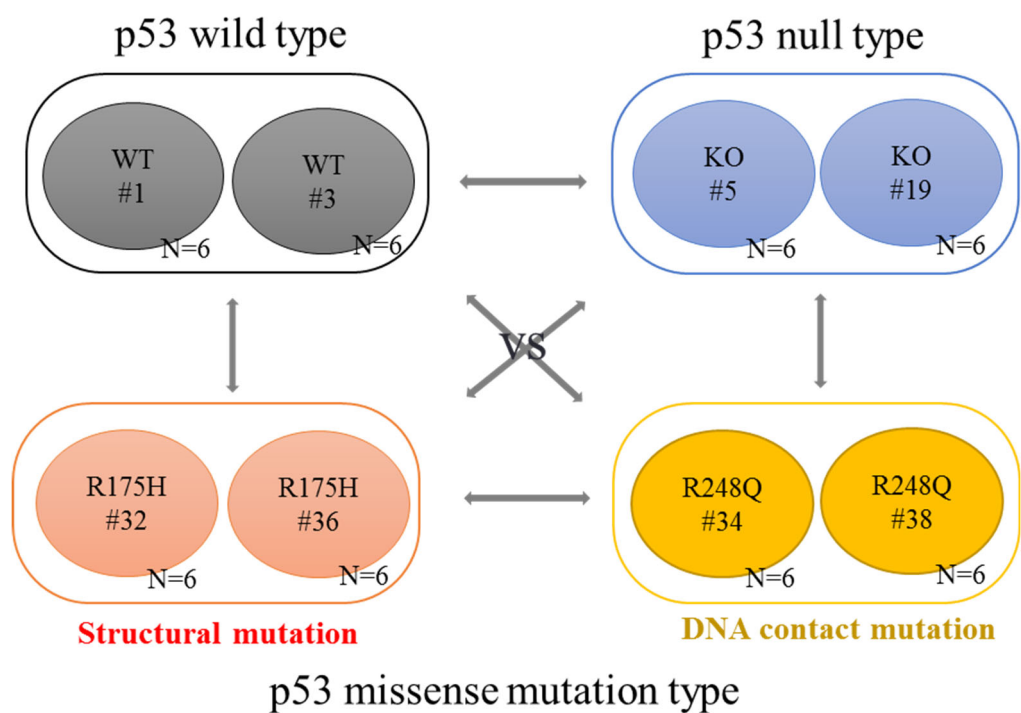
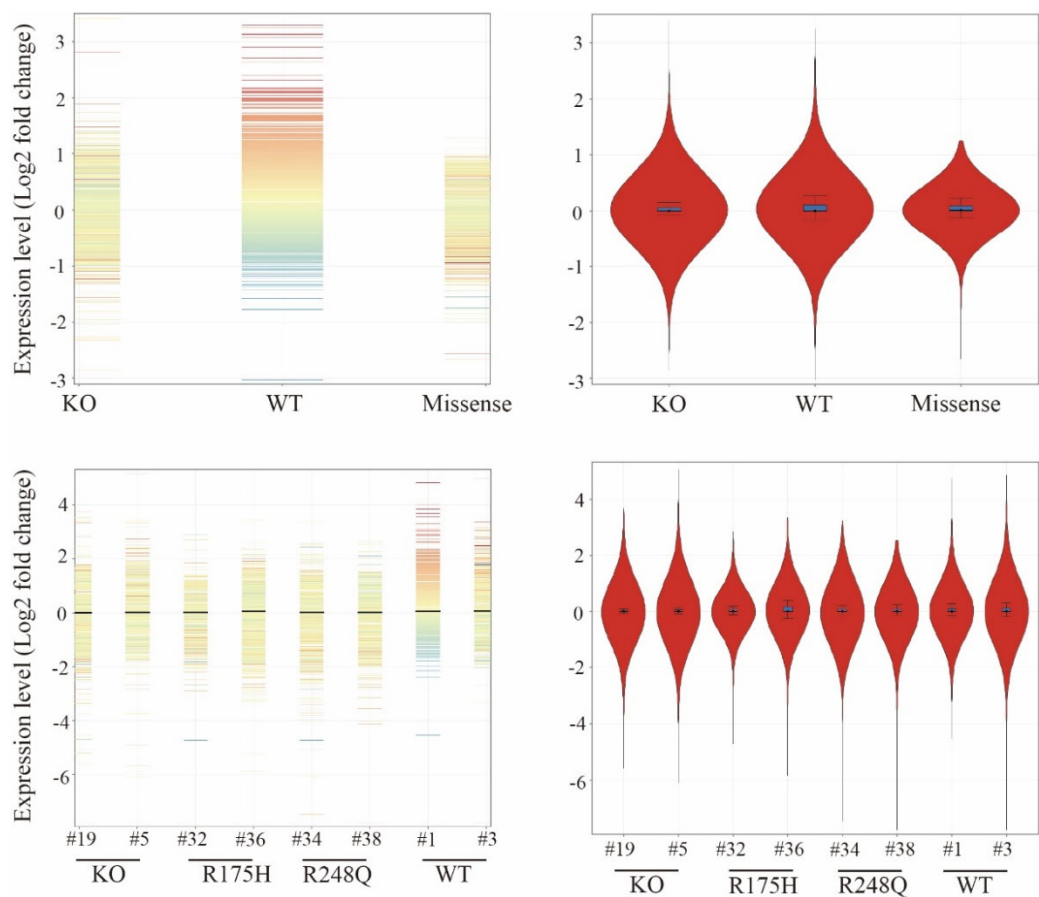


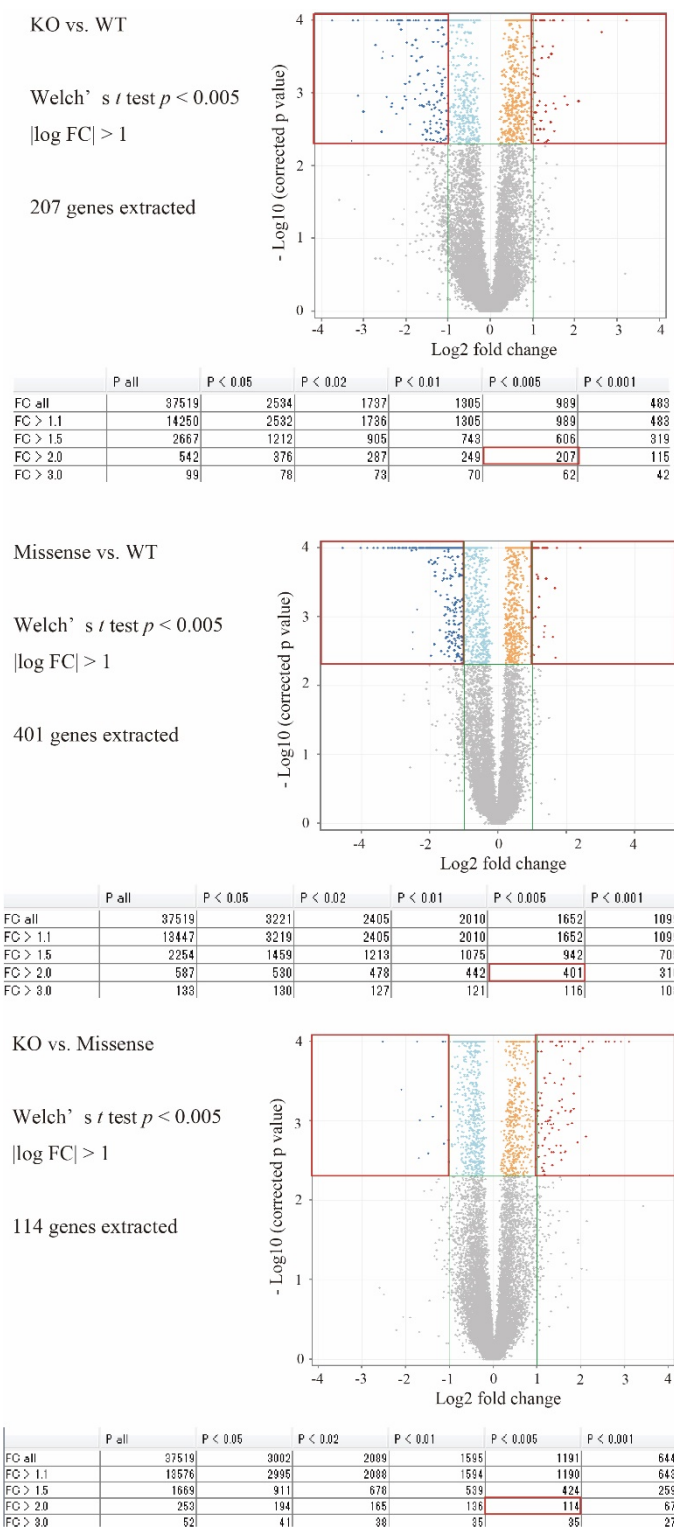
图 24 Schematic diagram of RNA-seq analysis sample

For RNA-seq analysis of p53 WT, KO, R175H or R248Q cells, six replicates were performed for each two independent clones. The cells were cultured to mid-log phase and collected for extracting total RNA. RNA-seq library was prepared with CEL-seq2 technique as described previously. WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.



☒ **25 Gene expression level overview using box plot and violin view**

The overall picture of gene expression was visualized by box plot and violin view. As a result, the normalized distribution was confirmed. WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; R248Q, p53 R248Q cells; and missense, p53 missense mutant cells.



## 26 Methods of gene extraction

p53 KO cells vs. p53 WT cells, p53 missense mutant cells vs. p53 WT cells, and p53 KO vs. p53 missense mutant cells with FDR < 0.005 and absolute log FC > 1 was extracted and considered DEG, 207, 401, and 114 genes were extracted. FC indicates fold change; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; and missense, p53 missense mutant cells.

### Missense vs. WT

Welch's  $t$  test  $p < 0.005$

$|\log FC| > 1$

401 entities

### KO vs. WT

Welch's  $t$  test  $p < 0.005$

$|\log FC| > 1$

207 entities

### KO vs. Missense

Welch's  $t$  test  $p < 0.005$

$|\log FC| > 1$

114 entities

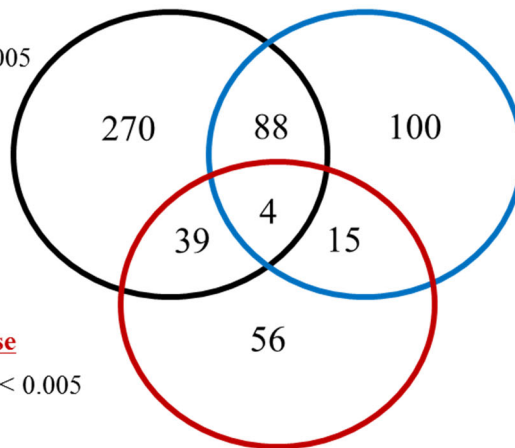


图 27 Venn diagram

The number of genes extracted from p53 missense mutant cells vs. p53 WT, P53 KO vs. p53 WT, and p53 KO vs. p53 missense mutant cells with  $FDR < 0.005$  and absolute  $\log FC > 1$  was considered as DEGs. 401, 207, and 114 genes were extracted, respectively. Venn diagrams were created to visualize the inclusion relationships of these extracted DEGs. FC indicates fold change; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; and missense, p53 missense mutant cells.

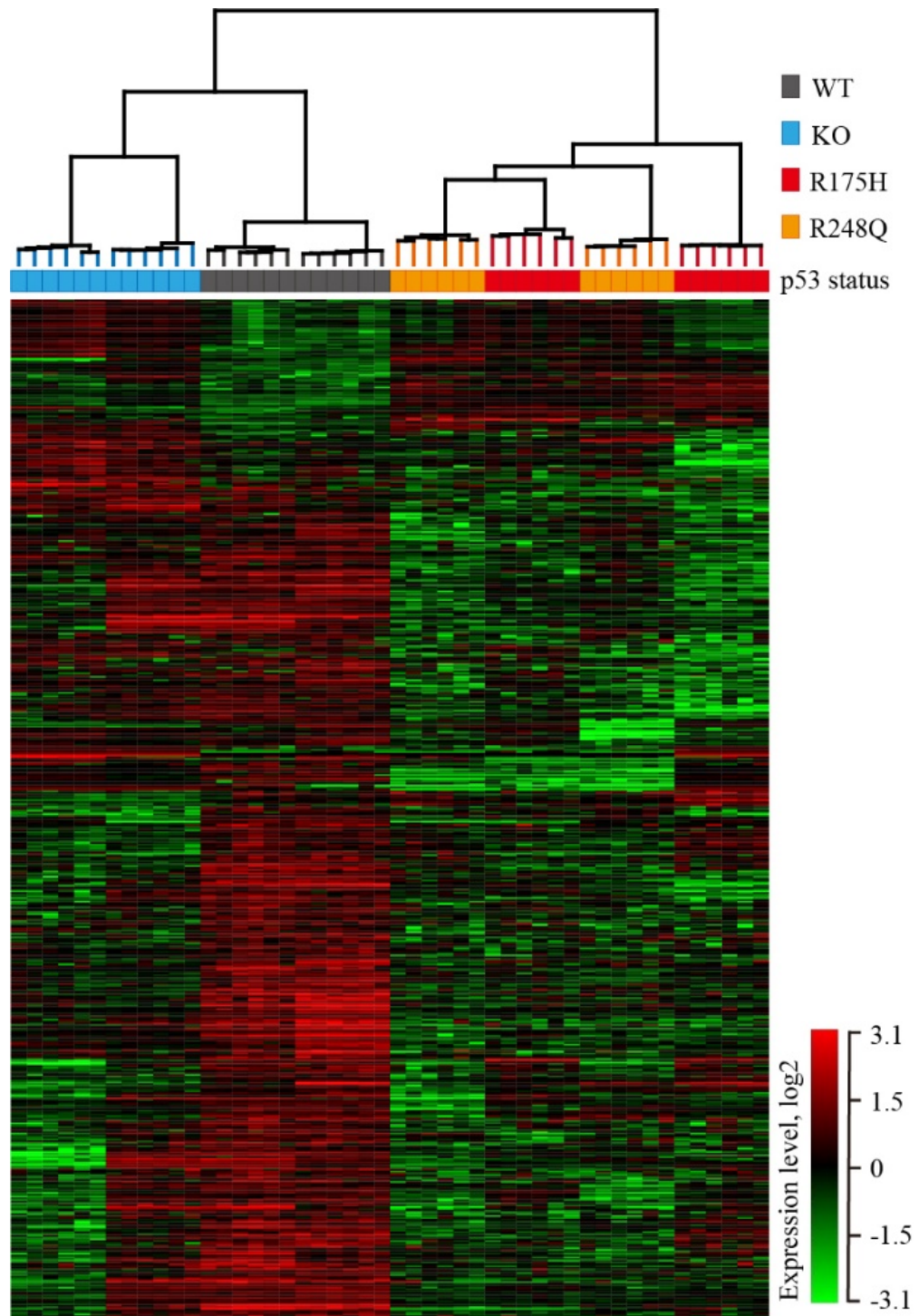
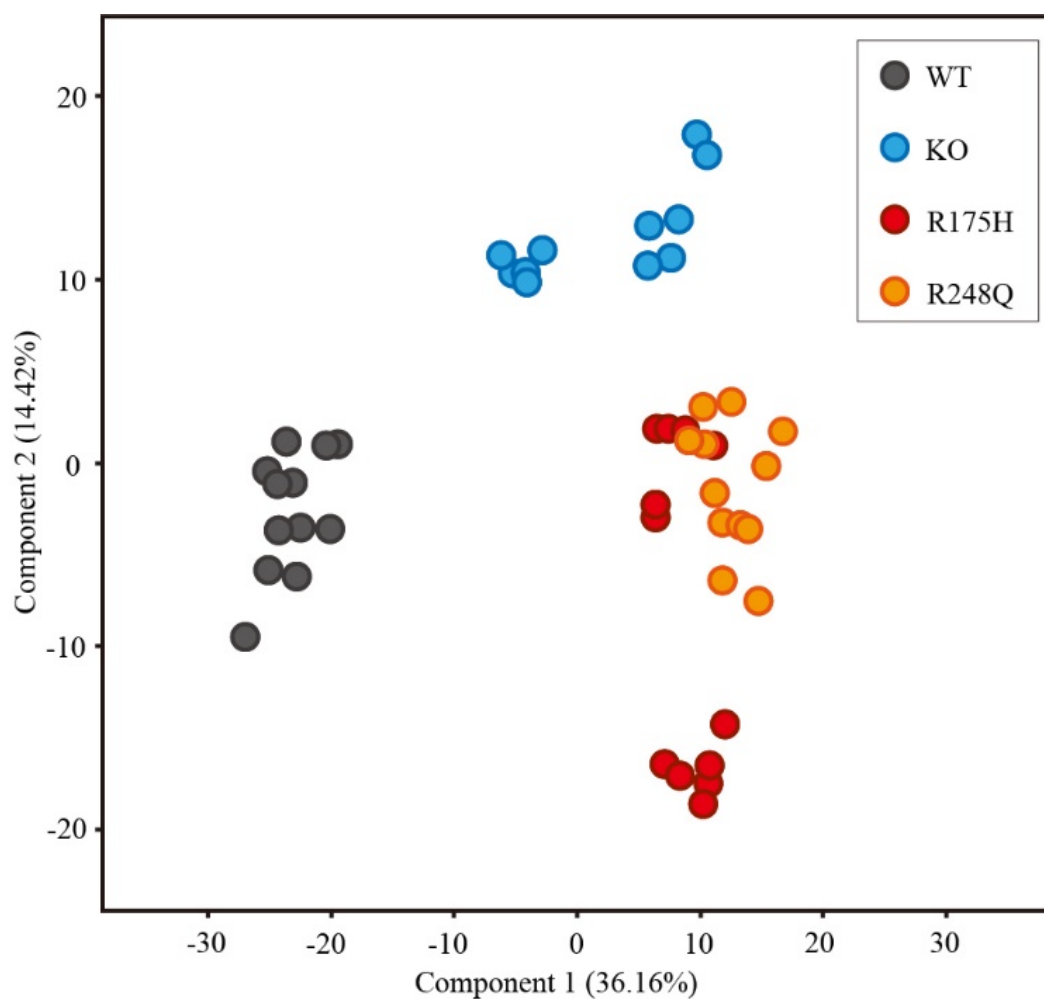


图 28 Two-way hierarchical clustering of gene expression data

Two-way hierarchical clustering analysis used to order samples from 48 cell lines (columns) and 572 differentially expressed genes (rows). WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.



#### ☒ **29 Principal components analysis of gene expression data**

PCA used to generate a two-dimensional data plot from 572 genes. The cumulative proportion of the variance captured by each principal component axis was: X) principal component axis 36.16% and Y) principal component axis 14.42%. WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

## 考察

ヒト腫瘍で検出される p53 変異の多くは、DNA 結合ドメインに位置する 1 個のアミノ酸の置換によって引き起こすミスセンス変異である。このようなミスセンス変異、特に特定の「ホットスポット」変異は、高い頻度で検出されることから、癌の進行過程で選択的な優位性があることが示唆される。これらの変異は、完全長の p53 タンパク質の発現が保持される一方で、野生型 p53 の腫瘍抑制機能は失われることが知られている<sup>48,59,60</sup>。また、これらの p53 ミスセンス変異を持つ細胞では、がんの性質や転移発生頻度の変化<sup>59,60</sup>、代謝経路の変化など<sup>48,61</sup>、発がんに伴って細胞に起こる現象を模擬した性質を獲得しているという知見が集まりつつある。GOF p53 が他の転写因子と結合して機能し、メバロン酸経路<sup>48</sup>やエトポシド抵抗性経路<sup>47</sup>などに関わる遺伝子の転写を促進することが一つのメカニズムであることも示されていた。

今回、ゲノム編集により樹立した p53 ミスセンス変異細胞株においても p53 により転写誘導される遺伝子の発現が抑制され、DNA 損傷に対する p21 の誘導が見られなかったことから、変異そのものによる影響により p53 の機能喪失が起こることが確認された。また、CEL-Seq2 法による網羅的遺伝子発現プロファイル解析から抽出された遺伝子群による PCA 解析から p53 ミスセンス変異細胞での遺伝子発現プロファイルの特徴が p53 WT 細胞とも p53 KO 細胞とも異なることが明らかとなった。また、この p53 ミスセンス変異細胞で特異的に発現する遺伝子群として、アミノ酸代謝に関わる遺伝子群が抽出された。このことは今回樹立した p53 ミスセンス変異細胞が新たな機能を獲得している 1 つの証拠であると考えられる。アミノ酸代謝に関わる遺伝子群の発現はミスセンス変異 p53 タンパクのどのような機能によって亢進するのか、さらにこのことが p53 ミスセンス変異細胞にどのような特徴をもたらすのかについてはさらなる検討が必要である。また、他にも p53 ミスセンス変異細胞において特徴的な発現パターンを示す遺伝子が存在することから、過去の報告において示された結果との比較等を通じて、p53 ミスセンス変異細胞における「新たな機能獲得」の実態が明らかになることが期待できる。

### 第3章 p53 ミスセンス変異細胞のトリフルリジンに対する

#### 細胞応答

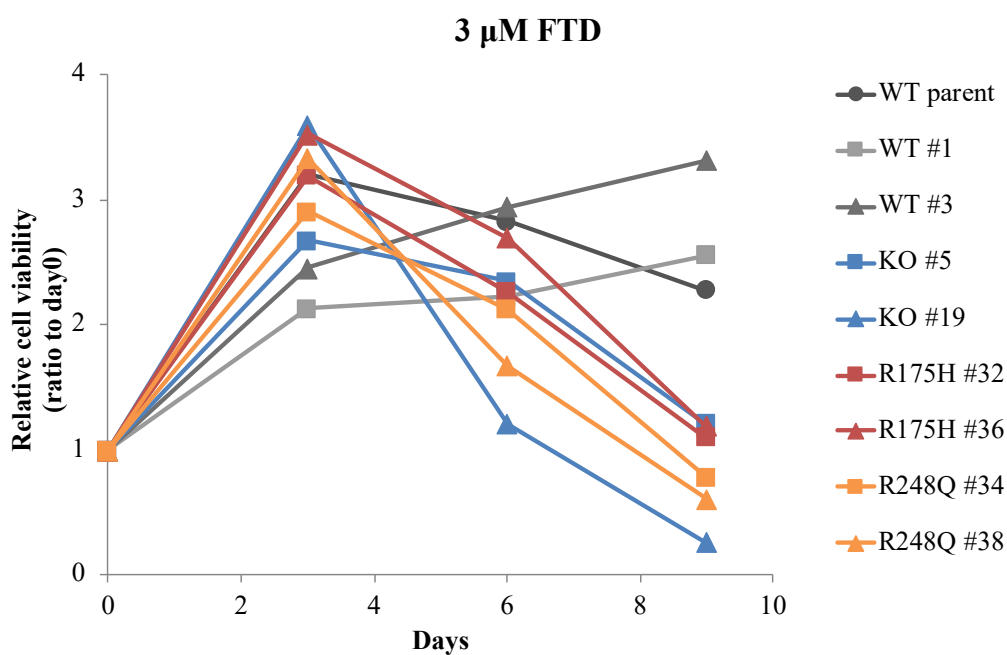
##### トリフルリジンによるアポトーシス誘導

これまでに、(1) FTD はまず S 期において DNA 複製ストレスを引き起こすこと、その後、(2) p53 WT 細胞では p53 依存的に DNA 量が 4N の状態での持続的な細胞周期停止が起り、分裂期 (M 期, mitotic phase) スキップを経て細胞老化に至ること、(3) p53 KO 細胞では M 期に進行し、染色体分配異常を経て細胞死に至ること、が報告されている<sup>14, 15)</sup>。本研究において樹立した p53 ミスセンス変異導入細胞 (p53 R175 細胞および p53 R248Q 細胞) では、FTD の作用により p53 WT と同程度に p53 は蓄積するものの、p21 の誘導は認められなかったこと、さらに GOF 変異 p53 発現に起因すると考えられるゲノムワイドな遺伝子発現プロファイルの違いがあることが明らかになった。ヒト腫瘍において高頻度で検出される p53 ミスセンス変異について、FTD に対する細胞応答にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞を用いて、FTD 処理時の細胞増殖や細胞の表現型についての経時的な観察と評価を行った。

まず、FTD 処理時の増殖について、CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Cell Viability Assay により経時的な評価を行った。過去の報告通り<sup>15)</sup>、p53 WT 細胞では、6 日目に増殖が停止し、その後細胞数は 9 日目まで大きく変化しなかったのに対し、p53 KO 細胞では、3 日目以降に細胞数が減少し始め、9 日目まで減少を続けていた (図 30)。p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞では、3 日目以降細胞数が減少し始め、9 日目まで減少を続けていた。p53 KO 細胞での細胞数の減少は細胞死が誘導されることに起因する<sup>15)</sup>。この結果より、p53 ミスセンス変異細胞では p53 KO 細胞と同様に細胞死が誘導され、細胞数の減少に至っていることが推察された。

FTD による p53 KO 細胞に起こる細胞死では、PARP や Caspase 3 がアポトーシスシグナル経路により活性化された上流の Caspase により切断されることが報告されている<sup>15)</sup>。そこで、FTD 処理後 3 日および 6 日の細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにより PARP および Caspase3 の切断 (Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 の出現で評価) について検討を行ったところ、p53 R175 細胞および p53 R248Q 細胞においても、p53 KO 細胞と同程度の Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 が検出された (図 31)。本研究で樹立した p53 ミスセンス変異細胞では、FTD により p53 KO 細胞と同程度のアポトーシス経路活性化が誘導され、細胞死に至ると考えられた。次に、HCT116 細胞以外で p53 のミスセンス変異の異なる大腸癌細胞株 4 種 (LS174T (p53 WT), LS1034 (p53 G245S), COLO320DM (p53 R248W), WiDr (p53 R273H)) を用いて、FTD 処理によるアポトーシス経路活性化に違いが見られるかについて同じくウェスタンブロッティングにより検討を行った。p53 野生型である LS174T (p53 WT) では FTD 処理により Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 は検出されなかったが、p53 ミスセンス変異を持つ 3 種の大腸癌細胞 LS1034 (p53 G245S)、COLO 320DM (p53 R248W) および WiDr (p53 R273H) では検出された (図 32)。

以上の結果より、p53 ミスセンス変異を持つ大腸癌細胞においては、FTD 処理によりアポトーシス経路が活性化されることが明らかになった。これらの細胞は、FTD 処理により死滅するため、p53 ミスセンス変異を持つ腫瘍に対してロンサーフによる治療効果が期待される。



**図 30 Growth curve of p53 missense mutation cells treated with trifluridine**

Cell growth was measured by CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Cell Viability Assay on the indicated days. Data are means (n=3). FTD indicates trifluridine; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

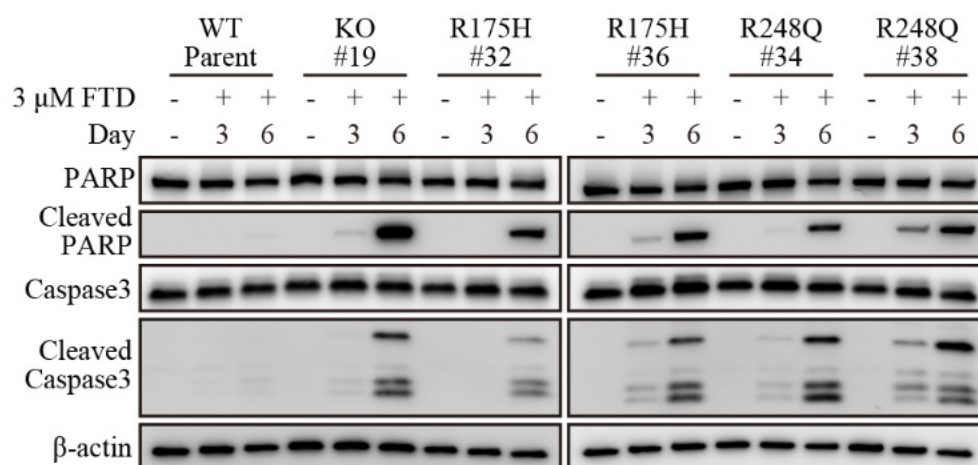


Figure 31 Western blotting analysis of apoptosis marker in p53 missense mutant cells

Western blot analysis of RIPA extracts; HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) for the indicated days and harvested. WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

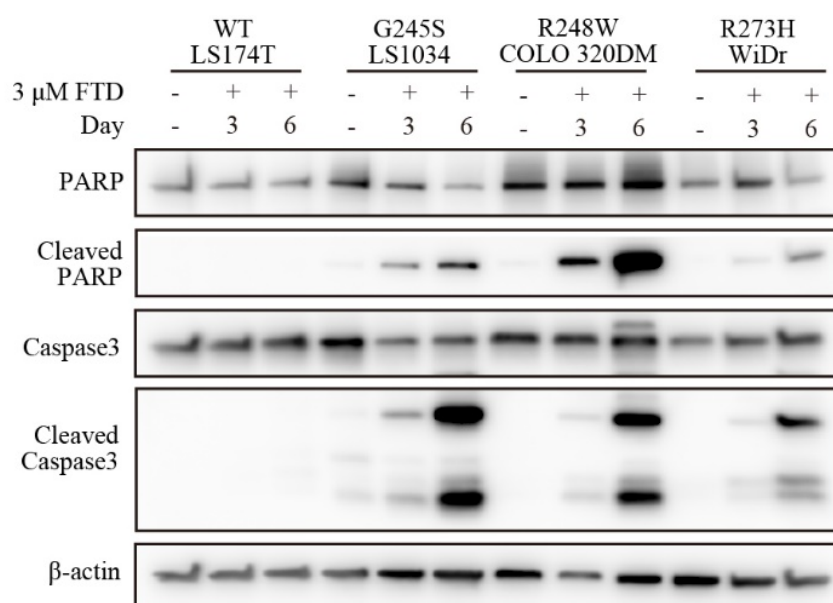


Figure 32 Western blotting analysis of apoptosis marker in p53 missense mutant cell lines

Western blot analysis of RIPA extracts; LS174T (p53 wild type cells), LS1034 (p53 G245S missense mutant cells), COLO 320DM (p53 R248W missense mutant cells) and WiDr (p53 R273H missense mutant cells) cells were cultured in the presence of 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) for the indicated days and harvested. FTD indicates trifluridine; WT, p53 wild type cells.

### Fucci 細胞を用いたライブセルイメージングによる細胞周期解析

これまでの研究で、FTD 処理した時、p53 WT 細胞では G2 期から M 期を経ずに G1 期へ移行する M 期スキップ (Mitosis skip) が起こり、その後細胞老化に至ること、p53 KO 細胞では M 期へ進行するが 2 細胞への分裂が正常に起こらず (M-phase entry & aberrant mitosis) が起こり、その後細胞死に至ることが報告されてきた<sup>15,62)</sup>。間期 (G1 期、S 期、G2 期) の細胞周期進行は明視野の細胞観察では確認できないため、上記知見は蛍光により G1 期の核を赤色 (mKusabira Orange2-hCdt1 (30/120))、S/G2/M 期の核を緑色 (mAsami Green1-hGeminin (1/110)) に色分けできる Fluorescent Ubiquitination-based Cell-Cycle Indicator (Fucci) 細胞<sup>63,64)</sup> (図 33) を用いることで確認された。p53 ミスセンス変異導入細胞における FTD に対する細胞応答を観察するために、p53 WT 細胞、p53 KO 細胞に加え p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞の Fucci 細胞を樹立し、蛍光ライブセルイメージングによりその細胞周期進行について観察した。これまでの報告通り、p53 WT 細胞ではほぼ全ての細胞が M 期スキップを起こしていた一方で、p53 KO 細胞では、ほぼ全ての細胞で 2 細胞への正常な分離が起こらず、染色体分配異常によるものと考えられた。p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞では 80%以上の細胞で M 期へ進行した (緑色の細胞が丸く浮き上がる) 後、2 細胞への正常な分離が起こらず、そのまま底面へ再接着し (異常な細胞分裂)、赤色に変化する様子が観察された (図 34)。p53 KO 細胞と同様に赤色になった細胞では核が分葉化しており、染色体分配異常が起こったと考えられた。また、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞では、M 期に進行後、正常に 2 細胞に分裂する細胞 (M-phase entry & normal mitosis) と M 期スキップを起こす細胞がそれぞれ数%ずつ存在し、p53 KO 細胞に比べ多い傾向であった。

以上の結果より、p53 ミスセンス変異導入細胞では、大部分の細胞で FTD 処理により p53 KO 細胞で観察されるような染色体分配異常を起こすことが示唆された。一部の細胞で、正常な細胞分裂や M 期スキップが観察されたが、この表現型がミスセンス変異 p53 発現に伴う何に起因するかについては現時点では不明である。

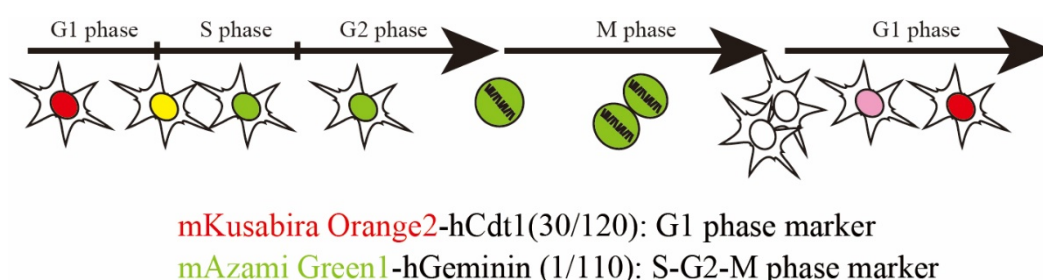


図 33 Fluorescent Ubiquitination-based Cell-Cycle Indicator

Nuclei of cells in G1 phase are depicted in red, nuclei of cells in S/G2/M phase are depicted in green, nuclei of cells in G1/S transition phase are depicted in yellow, and nuclei of cells in G0/post mitotic phase are depicted in strong red (red high)<sup>63,64)</sup>. G1 phase indicates gap 1 phase; S phase, synthesis phase; G2 phase, gap 2 phase; and M phase, mitotic phase.

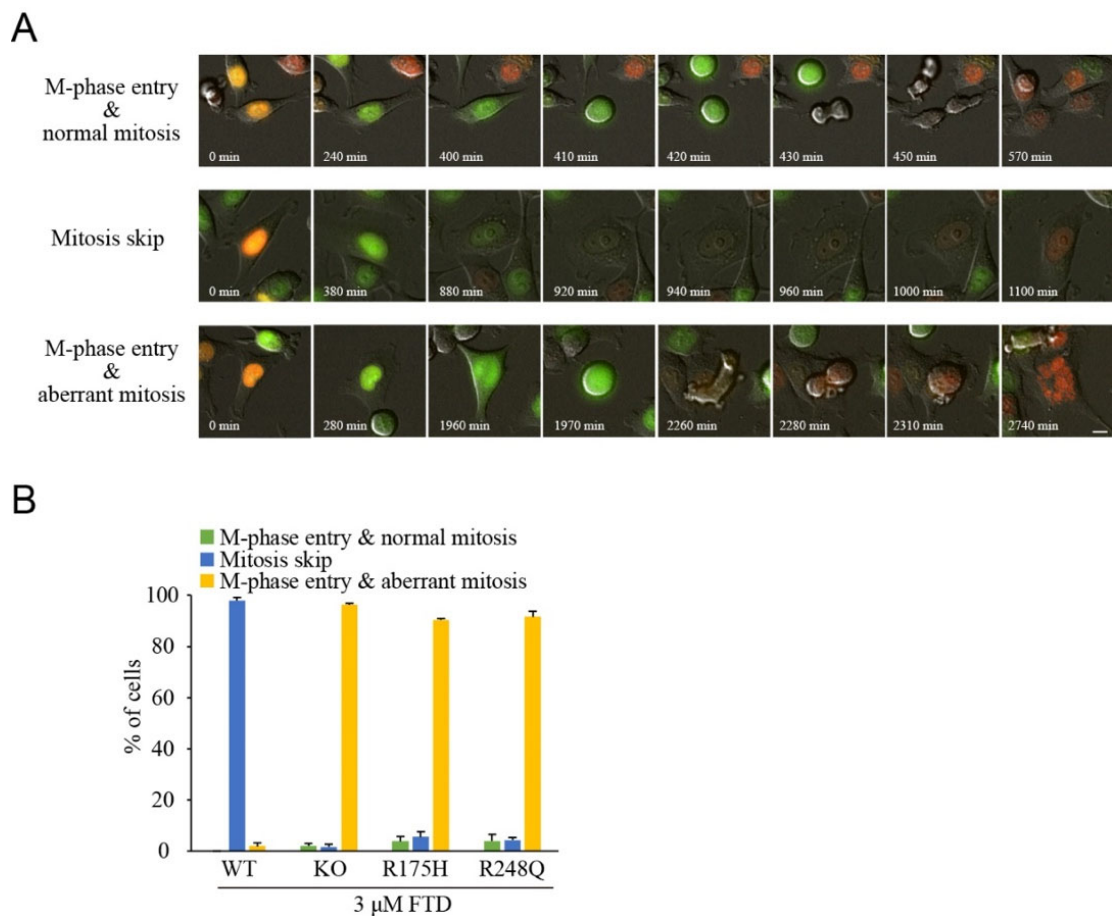


図 34 Quantification of aberrant mitosis in p53 missense mutant Fucci cells

**A**, Images show representative live imaging of Fucci cells. Cell cycle behavior by 3 μM trifluridine (FTD) treatment were divided into three main categories: M-phase entry and normal mitosis, mitosis skip, and M-phase entry and aberrant mitosis. The images were obtained with a DS-Qi2 camera (Nikon). Scale bar: 5 μm. **B**, HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of 3 μM FTD. To quantify, M-phase entry and normal mitosis, mitosis skip, and M-phase entry and aberrant mitosis were counted by observing one cell at a time. Data are means + s.d. from three independent experiments (≥100 cells per experiment). WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

### 分裂期後期における姉妹染色体の分配異常

Fucci 細胞の観察結果から、p53 ミスセンス変異導入細胞では、FTD 処理時に p53 KO 細胞で観察されたような染色体分配異常が誘導されていることが示唆された。そこで、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞を用いて、蛍光免疫染色により FTD 処理時の染色体分配を共焦点顕微鏡で観察した。FTD 処理条件は予備検討での結果から p53 KO 細胞で M 期

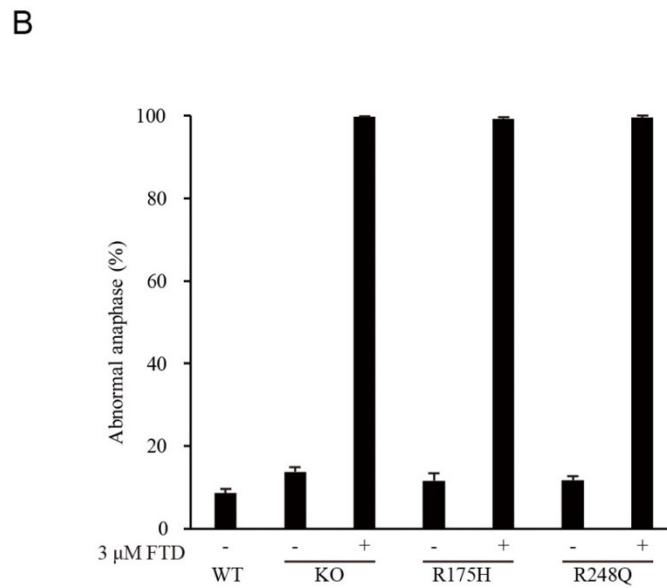
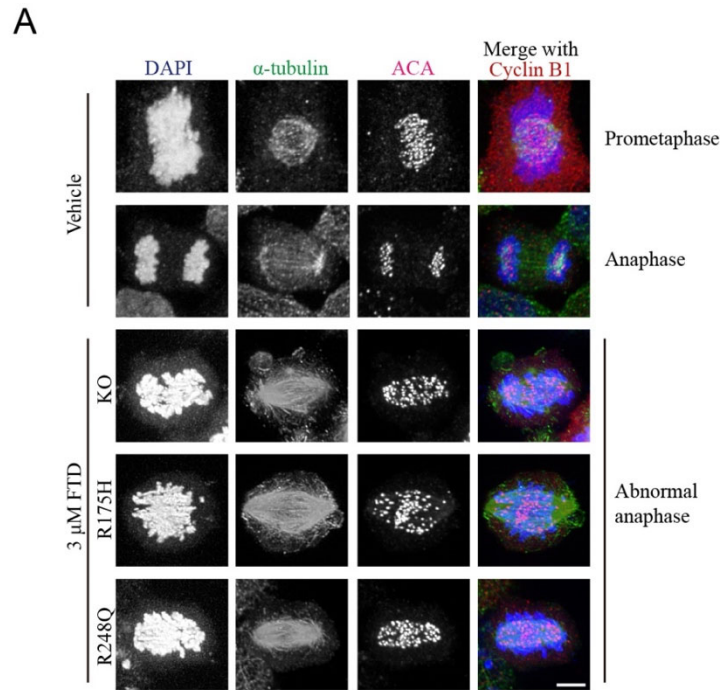
後期 (anaphase) の細胞が高い割合で存在するとされた 3  $\mu$ M 60 時間とした。4%パラホルムアルデヒドで固定後、微小管 ( $\alpha$ -tubulin, Alexa 488)、セントロメア (ACA, Alexa 568)、細胞周期インディケーター (Cyclin B1 : M 期前中期 (Prometaphase) から M 期後期へ移行する過程で消失する。Alexa568)、核 (DAPI) による 4 重染色を行った。

ACA と Cyclin B1 の同蛍光による染色については、それぞれの局在の違い (ACA は各染色体の中央部にドット上に局在する ; Cyclin B1 は細胞内全体が染色する) により区別した。通常培養時の M 期後期は、姉妹染色分体が両極に分離する時期であり、Cyclin B1 の細胞内全体の染色が消失する (図 35A)。今回、FTD 処理時の M 期後期における姉妹染色分体の分離について評価を行うため、Cyclin B1 陰性細胞についてのみ評価を行った (図 35B)。

FTD 処理を行った p53 KO 細胞では、既報通りほぼ全ての M 期後期細胞で姉妹染色分体が分離しておらず、染色体分配異常が誘導されていると考えられた。p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞でも、p53 KO 細胞と同様、ほぼ全ての M 期後期細胞で姉妹染色分体が分離していなかったことから、染色体分配異常が誘導されたと考えられた。この結果から、p53 ミスセンス変異導入細胞では FTD 処理により染色体分配異常が誘導され、そのことが 2 つの細胞への分離が起こりにくいという異常な M 期進行の原因となっていると想定された。

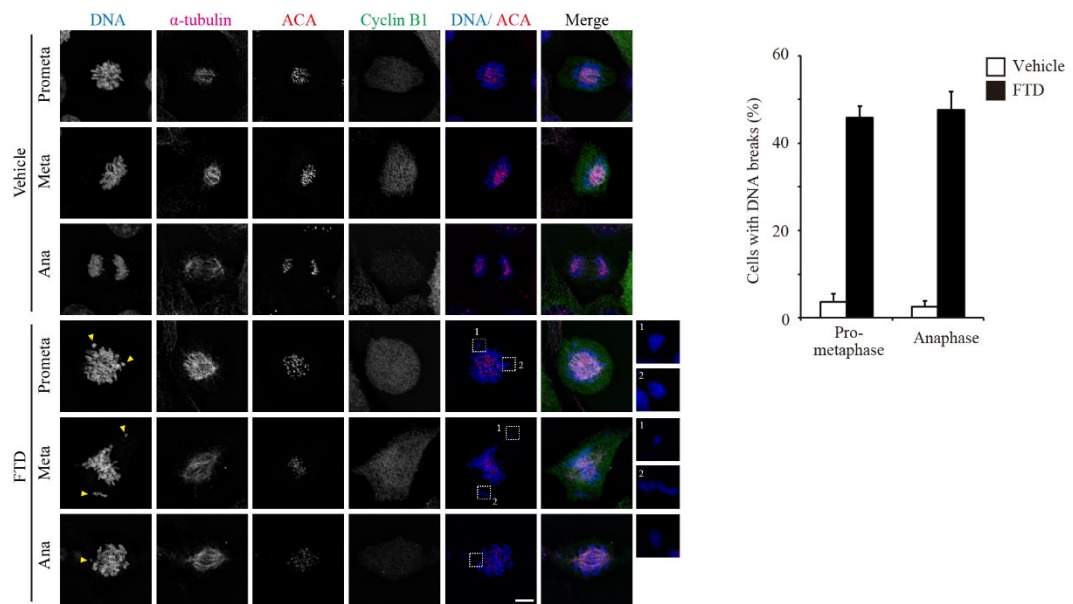
これまでの研究で、p53 KO 細胞で出現する M 期後期でも分離しない姉妹染色分体において、セントロメア領域の動原体は微小管により捕捉されていることが観察されている<sup>15)</sup>。この細胞では姉妹染色分体が M 期後期に両極に分離しないことから、FTD 処理により染色体上に解消できない姉妹染色分体間の絡まりが存在し、微小管により捕捉された動原体からの張力に逆らい、分離を妨げていると予想される。もし FTD 処理により染色体上に DNA 二重鎖切断などの脆弱な DNA 構造が発生し、動原体からの張力が強く働いたなら、セントロメア領域を含まない染色体断片が微小管からの捕捉から離脱し、赤道面や両極とは異なる領域に飛散する可能性が考えられた。この可能性について検証するために、FTD 処理を行った p53 KO 細胞を用いて、上と同様の蛍光免疫染色を行った。その結果、薬剤処理のない細胞ではほとんど観察されなかったセントロメア領域を含まない染色体断片が、FTD 処理を行った細胞では、M 期前中期、M 期中期 (Metaphase)、M 期後期いずれの時期でも観察され、M 期前中期および M 期後期では 40~50% の細胞で観察された (図 36)

癌細胞は DNA 複製ストレスが部分的な場合、common fragile sites (CFS) のような DNA 領域に under-replicated DNA (UR-DNA) を持ったまま G2 期や M 期に進むことが知られている<sup>65)</sup>。この UR-DNA は、M 期後期で ultrafine DNA bridges (UFB) を形成し、姉妹染色分体の両極への分離から取り残され赤道面に残る lagging chromosomes 発生の原因となる。また、lagging chromosome は次の間期に micronuclei を形成し、さらなる染色体不安定性 (chromosome instability; CIN) を誘発する起点となる<sup>66,67)</sup>。今回、FTD 処理した p53 KO 細胞において高頻度で確認された遊離染色体断片が、その後次の間期でどのような挙動をし、FTD に対する抗腫瘍効果へ及ぼす影響について、興味を持たれる。



**Figure 35 Aberrant chromosomal structures of p53 missense mutant cells**

**A**, Cells were fixed and co-stained with the indicated antibodies. Cyclin B1 staining was used to observe anaphase as distinct from prometaphase. Immunofluorescence images show representative normal prometaphase, normal anaphase and abnormal anaphase. The images were obtained with a Nikon A1R confocal imaging system. Scale bar, 5  $\mu$ m. **B**, HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of vehicle or 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) for 60 hours. To quantify, abnormal anaphase was counted. Data are means + s.d. from three independent experiments ( $\geq 250$  cells per experiment). WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; R248Q, p53 R248Q cells; DAPI, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; and ACA, anti-centromere antibody.



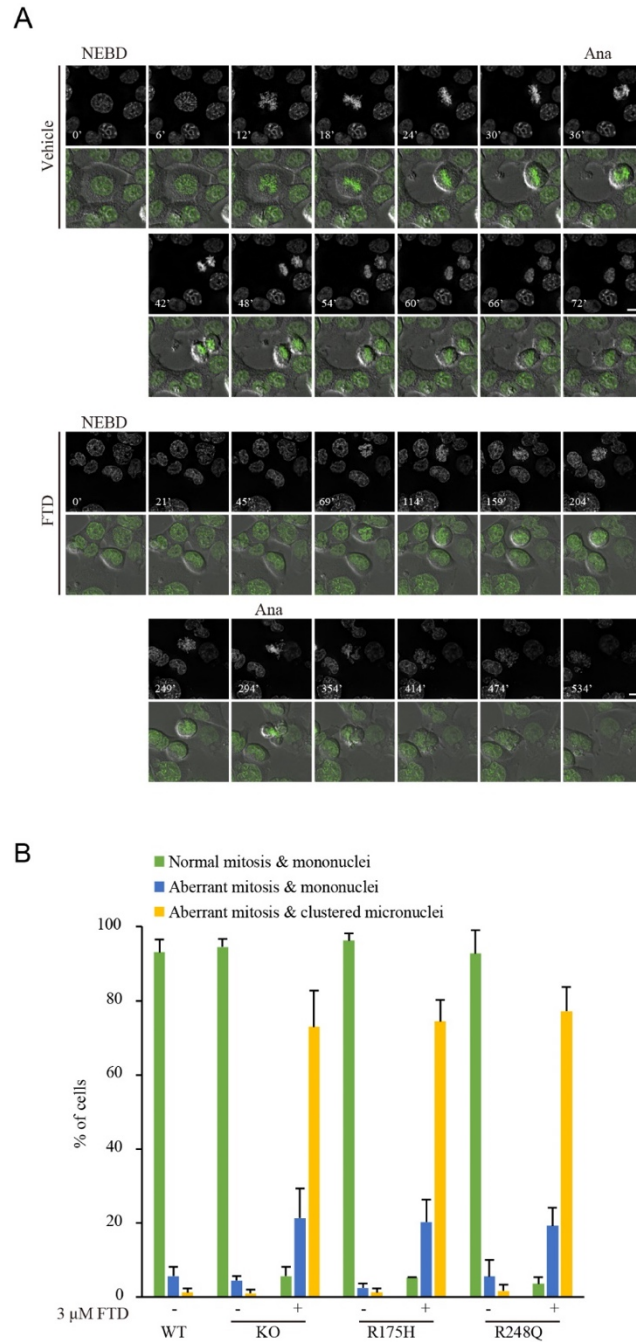
**Figure 36 FTD treatment induced DNA breaks in mitosis**

Cells were fixed and co-stained with the indicated antibodies. Cyclin B1 staining was used to observe anaphase as distinct from prometaphase. Immunofluorescence images show representative normal prometaphase/ normal metaphase/ normal anaphase, and abnormal prometaphase/ abnormal metaphase/ abnormal anaphase treated with 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) in p53 mutant cells. The images were obtained with a Nikon A1R confocal imaging system. Scale bar, 5  $\mu$ m. Data are means + s.d. from three independent experiments ( $\geq 150$  cells per experiment). Prometa indicates prometaphase; meta, metaphase; Ana, anaphase; and ACA, anti-centromere antibody.

## Histone H2B-GFP 発現細胞を用いたライブセルイメージングによる分裂期進行の解析

上述の蛍光免疫染色法では、FTD 処理により p53 ミスセンス変異導入細胞の M 期後期における姉妹染色分体の不分離が高頻度で確認されたが、蛍光免疫染色法によるスナップショットでの観察により得られる情報には限界がある。姉妹染色分体の不分離の原因と考えられる染色体分配異常について、M 期進行における時系列的な表現型に関する情報やその後の細胞運命についての知見を得ることは難しい。そこで、FTD 処理時の M 期進行から M 期完了後について染色体の挙動を観察するために、p53 WT 細胞、p53 KO 細胞、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞について、それぞれ histone H2B-GFP の安定発現細胞株を作成することで染色体を可視化し、ライブセルイメージングによる 1 細胞解析を行った。

薬剤を加えないコントロール (Vehicle) では、いずれの細胞株でもほぼ全ての細胞で、核膜崩壊 (nuclear envelop breakdown, NEBD) から染色体凝縮、姉妹染色分体の赤道面への整列、両極への姉妹染色分体の分離、脱凝縮を経て、2 つの正常核が形成されるという正常な M 期進行の様子が観察された (Normal mitosis & mononuclei) (図 37)。一方、FTD 処理した p53 KO 細胞では、核膜崩壊後、凝縮した姉妹染色分体の赤道面への整列やその後の両極への分配がうまくいかず、コントロール (Vehicle) に比べ M 期の進行に多くの時間を要していた。さらに、姉妹染色分体の両極への分配が不均等であり、細胞質分裂を完了できないまま染色体の脱凝縮が起こった結果、核が分葉化 (多核形成、Aberrant mitosis & clustered micronuclei) する様子が 70%以上の細胞で観察された。FTD 処理した p53 ミスセンス変異導入細胞でも p53 KO 細胞と同じ割合で、上記のような異常な M 期進行と核の分葉化が観察された。



**图 37 Live imaging of p53 mutant histone H2B-GFP expressing cells**

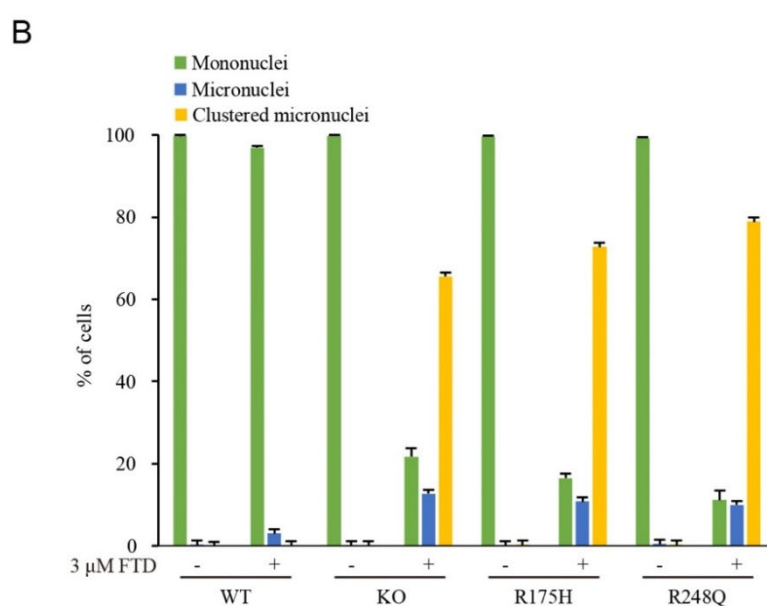
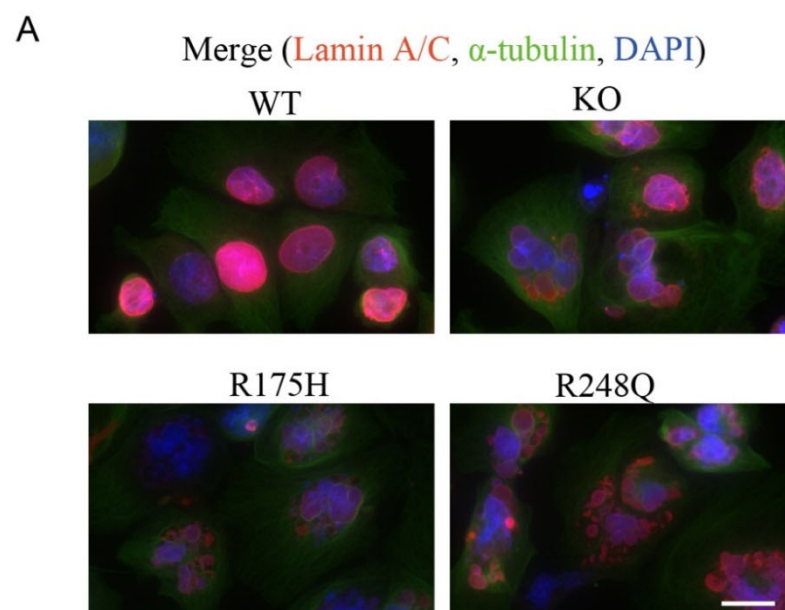
**A**, Selected frames from live-cell imaging of representative normal mitosis and aberrant mitosis treated with 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) in p53 mutant cells expressing histone H2B-GFP. Time (minutes) after NEBD is shown on the images. Ana, onset of anaphase. The images were obtained with a DS-Qi2 camera (Nikon). Scale bar: 5  $\mu$ m. **B**, To quantify, normal mitosis and mononuclei, aberrant mitosis and mononuclei, and aberrant mitosis and clustered micronuclei were counted by observing one cell at a time. Data are means + s.d. from three independent experiments ( $\geq 100$  cells per experiment). WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; R248Q, p53 R248Q cells; GFP, green fluorescent protein; NEBD, nuclear envelope breakdown; and Ana, anaphase.

### 細胞分裂後の多核形成解析

Histone H2B-GFP の安定発現細胞を用いたライブセルイメージングにより、FTD 処理した p53 ミスセンス変異導入細胞で、M 期終了後に多核となる表現型を確認できた。そこで、M 期終了後の核の形態異常を詳細に観察するために、FTD で 4 日間処理した p53 WT 細胞、p53 KO 細胞、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞を用いて、蛍光免疫染色により核膜マーカーとして核膜の裏打ちタンパク質でラミナの構成成分である Lamin A/C を、細胞質マーカーとして細胞骨格を形成する微小管の構成成分である  $\alpha$ -tubulin を、DAPI で核を染色して、三重蛍光免疫染色で 1 細胞毎の核の形態を観察した。

FTD 未処理群ではいずれの細胞でも、そのほとんどの核が単一核 (Mononuclei) として観察された (図 38)。FTD 処理により p53 WT 細胞では単一核が観察されたが、p53 KO 細胞、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞では 60~80% の細胞で分葉化した核 (多核, Clustered micronuclei) が観察された。また、これらの 3 種の細胞では 10% 程度で、大きな核に少数の微小核 (Micronuclei) が検出されるような細胞も観察された。

以上の結果から、p53 ミスセンス変異導入細胞が FTD にさらされた時、核膜崩壊以降の M 期進行において、姉妹染色分体のダイナミクス (赤道面への整列、両極への分離) に異常が生じることで M 期の進行に長い時間がかかり、最終的には姉妹染色分体の両極への分配が不均等であり、細胞質分裂を完了できないまま染色体の脱凝縮が起こってしまい、核の分葉化、多核が発生することが明らかになった。



**Figure 38** Representative immunofluorescence images of lamin A/C,  $\alpha$ -tubulin and DAPI showing clustered micronuclei in p53 mutant cells

**A**, HCT116 p53 WT, KO, R175H and R248Q cells were cultured in the presence of 3  $\mu$ M trifluridine (FTD) for 4 days. These cells were fixed and co-stained with the indicated antibodies. Immunofluorescence images show representative mononuclei in p53 WT and clustered micronuclei in p53 mutant cells. The images were obtained with an all-in-one fluorescence microscope (BZ-X800, KEYENCE). Scale bar, 5  $\mu$ m. **B**, To quantify, mononuclei, micronuclei, and clustered micronuclei was counted. Data are means  $\pm$  s.d. from three independent experiments ( $\geq 300$  cells per experiment). WT indicates p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

## 考察

第 2 章の遺伝子発現プロファイル解析の結果から、p53 ミスセンス変異細胞は p53 WT 細胞とも p53 KO 細胞とも異なる性質を持つ細胞であることが示され、FTD に対する細胞応答や感受性に違いがある可能性が考えられた。しかし、FTD で処理した p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞では、p53 KO 細胞と同程度に Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 が検出され、アポトーシスによる細胞死誘導が確認された。

ミスセンス変異 p53 による新たな機能は、FTD に対する細胞死を抑制するような働きは持たないと予想される。FTD が effector であるロンサーフは、標準化学療法に不応となった転移性大腸癌患者を対象とした国際多施設共同無作為化二重盲検第 III 相試験 (RECOURSE 試験) において、プラセボと比較して全生存期間を有意に延長した。大腸癌では高頻度で p53 ミスセンス変異が確認されるが、様々な前治療を経て薬剤抵抗性および再発・転移性を獲得している癌細胞も、その多くが p53 ミスセンス変異を持つと想定される。FTD はそのユニークな作用メカニズムにより、このような悪性度の高い腫瘍に対しては抗腫瘍効果を発揮していることが期待される。

Fucci 細胞を用いたライブセルイメージング解析により、FTD 処理した p53 ミスセンス変異細胞では、S/G2 期から M 期への移行は見られるものの、多くの細胞で M 期の時間が延長し、最終的に 2 つの細胞への分裂を完了しないまま、M 期を脱出してしまうことが明らかになった。Histone H2B-GFP 発現細胞のライブイメージング解析によりその時の染色体の動きを観察すると、FTD 処理した p53 ミスセンス変異細胞では M 期後期における紡錘体極への姉妹染色分体の分離が見られず、染色体腕部の遊離を伴う顕著な染色体分配異常が確認され、その後の M 期脱出に伴い核の分葉化、多核形成を起こしていた。これらの結果から、p53 ミスセンス変異細胞では FTD を DNA に取り込み、DNA 複製ストレスに起因する DNA 損傷が残った状態の姉妹染色分体が M 期に進行することにより、M 期進行が遅延し、M 期後期における正常な染色体分配が妨げられることにより多核化すると考えられる。

その原因となる DNA 損傷とはどのようなものであろうか。我々は蛍光免疫染色による予備的な検討で、FTD 処理をした p53 変異細胞において、DNA 損傷修復に関与する 53BP1、DNA 二重鎖切断マーカーである  $\gamma$ H2AX、および一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA32 の核内フォーカスが形成されることを見出している (data not shown)。FTD の作用により、DNA 二重鎖切断や一本鎖 DNA 露出などの DNA 損傷が誘導され、それに対する DNA 修復因子が活性化していることが予想される。また、これまでの報告で、HCT116 (p53 WT) 細胞を用いた解析では、FTD 処理によって、コメットアッセイによって検出されるような DNA 鎖切断 (一本鎖、二本鎖とも) が誘導された証拠は得られていない<sup>14)</sup>。p53 WT 細胞と p53 KO 細胞および p53 ミスセンス変異細胞では、FTD によって生じる DNA 損傷に違いがある可能性はあるが、コメットアッセイは染色体 DNA に比較的多くの損傷が誘導されないと差が見出せない解析法であることから、予備検討で確認されたような DNA 損傷がコメットアッセイでは差が見出せないような DNA 損傷である可能性もある。FTD の作用による DNA 複製ストレスの結果生じたと考えられる DNA 二重鎖切断や一本鎖 DNA 露出は修復されないまま不完全な形で残された状態で G2 期さらには M 期に進行し、染色体

分配異常の原因となっているのかもしれない。細胞が弱い複製ストレスにさらされた時、common fragile sites (CFSs) と呼ばれるゲノム上の複製しづらい領域に複製未完了領域が出現し、その後 M 期の染色体上のギャップや切断に変換されたり、分裂後期に Ultrafine bridge を形成し姉妹染色分体の紡錘体極への分離を妨げたりして、染色体不安定性を引き起こすことが知られている。FTD の作用により発生する DNA 損傷とそれに起因する染色体分配異常において、この CFSs 領域を介した染色体不安定性誘発メカニズムが関わっているのか、興味の持たれるところである。M 期において複製未完了な CFSs 領域で起こる DNA 複製 Mitotic DNA synthesis (MiDAS) が FTD 作用時の M 期の染色体上で起こっているのかについての検証が 1 つの切り口となると考えられる<sup>68)</sup>。

Histone H2B-GFP 発現細胞を用いたライブイメージング解析や核膜を検出することが可能な Lamin A/C による蛍光免疫染色によって、p53 KO 細胞、p53 ミスセンス変異細胞において、FTD の作用による染色体分配異常に伴い、大きさ、形態、数が様々な多核となる様子が確認された。多核化を起こした細胞は、その後アポトーシスによる細胞死が誘導されて Cleaved PARP および Cleaved Caspase3 が検出された。では、FTD により多核化した細胞はなぜ細胞死に至るのであろうか。これまでの研究で、微小管ダイナミクス阻害剤（パクリタキセル、エリブリン）により M 期前中期に停止した癌細胞に紡錘体チェックポイント因子 Aurora B の阻害剤を処理することにより、M 期逸脱が起こり多核となることを示されている<sup>69)</sup>。このとき、多核化した細胞はそのまま DNA 複製を開始し、FTD で見られたようなアポトーシス経路を介した細胞死は誘導されなかった<sup>69)</sup>。つまり、多核化そのものは細胞死の引き金にはならず、FTD の作用によって生じる何かが細胞死の引き金となると予想される。その理解のために FTD により誘導される染色体分配異常から細胞死に至る過程の詳細な解析が必要である。1 つの仮説として、FTD の作用による DNA 複製ストレスを起点とする DNA 損傷が細胞死の引き金になっていると考えており、現在、各プロセスでの DNA 損傷の発生状況やそれに伴う DNA 修復因子の活性化状況について詳細に解析を進めている。さらに近年、極微小管上に取り残された染色体に由来する微小核は、Lamin B などの non-core 核膜因子の局在に異常が認められることが報告された<sup>70)</sup>。核膜の完全性を検証することで、Lamin B の局在異常を示す核の構築異常を明らかにすることが可能となった。核膜形成異常により DNA 修復因子が局在することができずに、DNA 複製ストレスを起点とする DNA 損傷の蓄積のみならず、修復機構の不全が起こっている可能性が考えられる。

これらの解析を通じて、FTD の作用による DNA 複製ストレス、染色体分配異常、発生する DNA 損傷とアポトーシス経路を介した細胞死誘導との関連性やそのプロセスの詳細なメカニズムが明らかになると期待される。

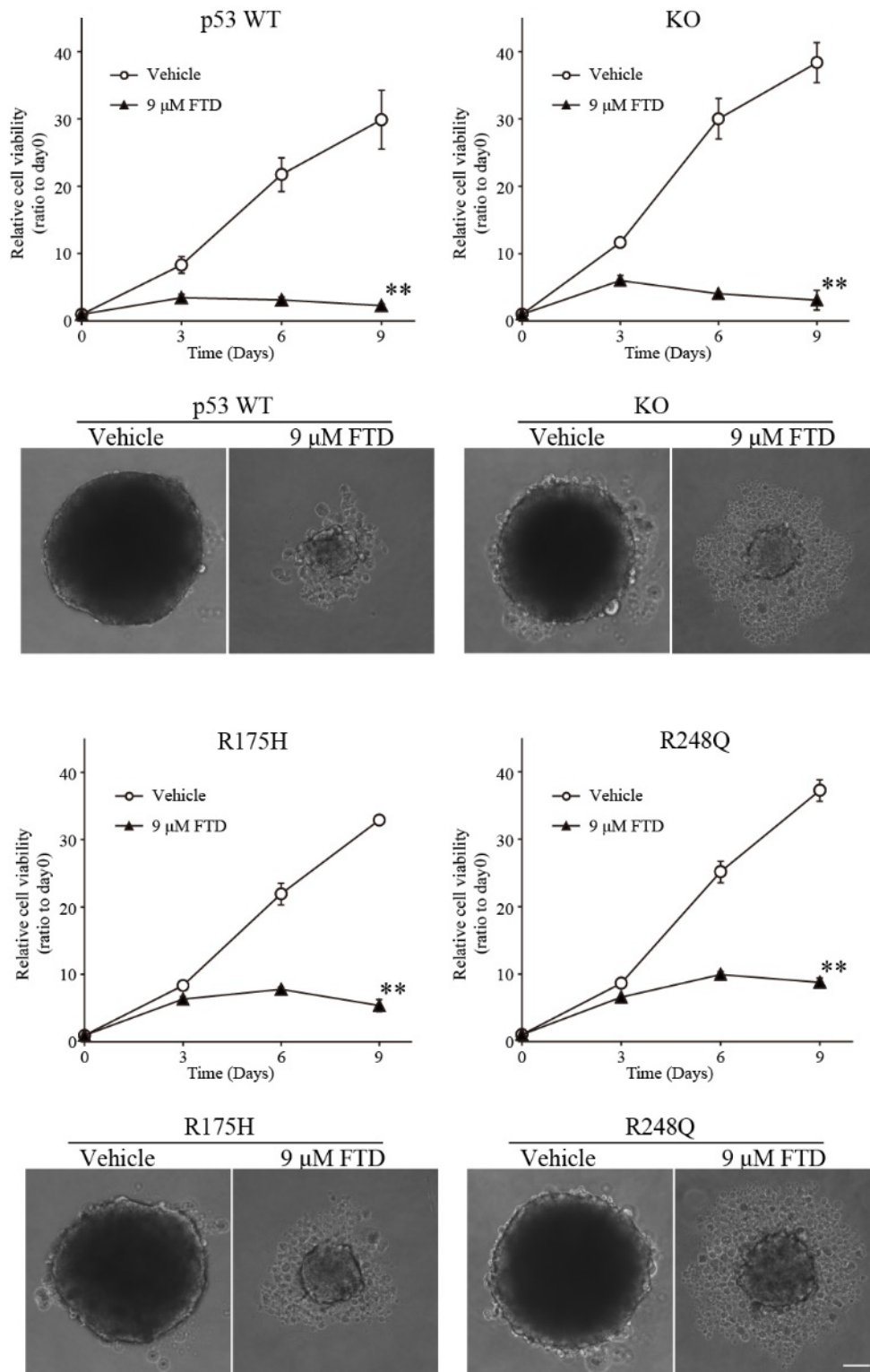
## 第4章 スフェロイド 3D 及びマウスモデルにおけるトリフ

### ルリジンの抗腫瘍効果

#### トリフルリジンのスフェロイド増殖抑制効果

ここまでの解析で、FTD が培養ディッシュ上で増殖する癌細胞に対して増殖抑制効果や殺細胞効果を発揮するメカニズムを明らかにしてきた。実際にヒトに発生する固形腫瘍は立体構造をしていることから、スフェロイド 3D モデルはディッシュ上での 2D モデルと比較して、臨床の病態に近く、さまざまな特徴を反映していることが期待される。具体的には、3 次元的な細胞間相互作用、細胞極性、酸素・栄養・老廃物・薬剤など勾配形成が起こり、2D モデルより複雑な周辺環境が生じる。実際に、スフェロイド 3D モデルは腹膜播種モデルやがん幹細胞モデルとして評価されており、多くの抗がん剤に対し耐性を示すことが報告されている<sup>71)</sup>。

まずスフェロイド 3D 評価モデルを構築するために、Ultra-Low Attachment surface 96-well round-bottom plate を用いて、p53 WT、p53 KO および p53 ミスセンス変異導入細胞のスフェロイド形成能を評価した。それぞれの細胞を 300 細胞播種し 24 時間培養したところ、p53 ステータスによらず、すべての細胞においてスフェロイド形成が確認され、それぞれのスフェロイド形成能に大きな違いは見られなかった。次に、形成されたスフェロイドを 9  $\mu$ M FTD を含む培地で 3 日、6 日、9 日間培養し、その増殖について計測したところ、いずれの細胞由来のスフェロイドに対しても FTD の明確な増殖抑制効果が確認された（図 39）。ただし、p53 WT 細胞および p53 KO 細胞由来のスフェロイドに対する FTD の増殖抑制効果に比べ、p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞由来のスフェロイドに対する FTD の増殖抑制効果が弱い傾向であった。FTD が野生型 p53 を発現する癌細胞でもミスセンス変異を持つ p53 を発現する癌細胞でも抗腫瘍効果を発揮できる一方で、その効果には p53 ミスセンス変異による違いがあるのかもしれない。



**Fig 39 Growth curve of HCT116 p53 WT, p53 KO, p53 R175H and p53 R248Q spheroid cells**

Cell growth was measured by CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay on the indicated days. Data are means  $\pm$  s.d. from three independent experiments. Statistical analysis was done Student *t*-test. \*\*:  $p < 0.01$ . Representative images were taken on the last evaluation day. The images were obtained with a DS-Fi2 camera (Nikon). Scale bar, 100  $\mu$ m. FTD indicates trifluridine; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

### マウス皮下移植モデルにおけるトリフルリジンの抗腫瘍効果

スフェロイド 3D モデルの結果から、p53 ミスセンス変異を持つ癌細胞であっても 3 次元構造を示す腫瘍に対する FTD の抗腫瘍効果が期待された。FTD と FTD の分解を防ぐ TPI (modulator) を配合した FTD/TPI (ロンサーフ) の経口投与による、ヒト腫瘍異種移植モデルであるマウス皮下移植モデルでの抗腫瘍効果は、パクリタキセルやイリノテカンなどの他の細胞障害性薬剤と比較して弱い、薬剤投与終了後も腫瘍増殖抑制効果は長く継続する特徴がある<sup>3,13)</sup>。そこで、樹立した p53 ミスセンス変異導入細胞のマウス皮下移植モデルを用いて、FTD/TPI に対する抗腫瘍効果の評価を行うこととした。p53 WT 細胞、p53 KO 細胞、および p53 R175H 細胞は  $2 \times 10^6$  細胞、p53 R248Q 細胞は  $5 \times 10^6$  細胞、ヌードマウス皮下に移植したところ、いずれの細胞でも生着し、増殖することを確認できた。

これらのマウスモデルに FTD/TPI を経口投与すると、p53 WT 細胞および p53 KO 細胞由来の腫瘍と同程度に p53 R175H 細胞および p53 R248Q 細胞由来の腫瘍の成長を有意に抑制することが確かめられた (図 40)。FTD/TPI が p53 ステータスに関係なく抗腫瘍効果を発揮することが動物モデルにおいても確かめられた。

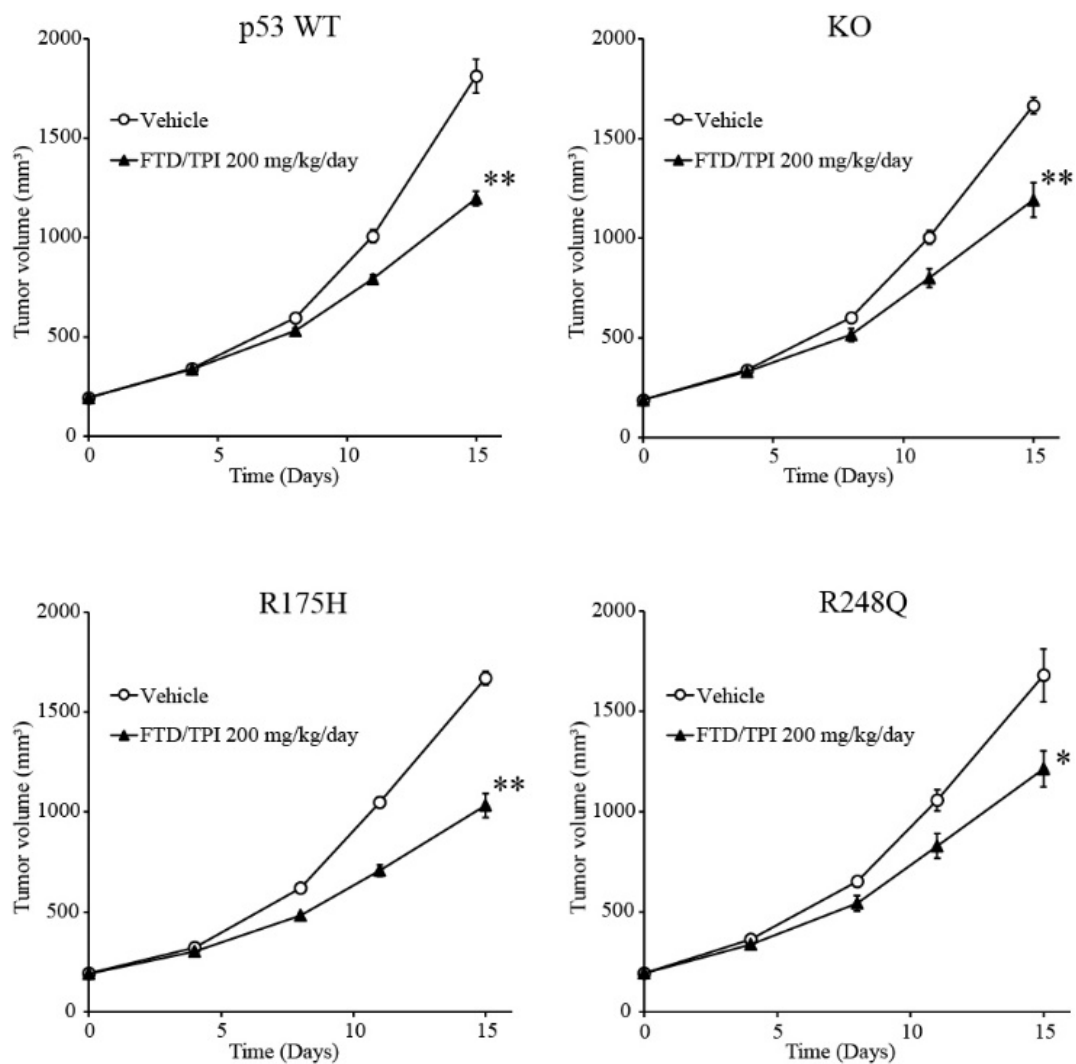


图 40 Growth curve of HCT116 p53 WT, p53 KO, p53 R175H and p53 R248Q xenografts

Data are means  $\pm$  s.e. of 6 individual mice. Statistical analysis was done at day 15. Aspin-Welch's *t*-test. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ . FTD indicates trifluridine; TPI, thymidine phosphorylase inhibitor; WT, p53 wild type cells; KO, p53 knockout cells; R175H, p53 R175H cells; and R248Q, p53 R248Q cells.

## 考察

スフェロイド 3D モデルやヒト腫瘍異種移植モデルは、抗がん剤の持つ治療効果をより臨床現場での治療に近い形で評価するために適したものである。自ら樹立し、培養細胞系で実験を進めてきた p53 ミスセンス変異細胞株を用いて、スフェロイド 3D モデルを構築して、FTD による増殖抑制効果を評価した。FTD は p53 WT 細胞、p53 KO 細胞および p53 ミスセンス変異細胞、いずれのスフェロイドに対しても有意に増殖抑制効果を示した。また、マウス皮下腫瘍移植モデルを構築し、FTD/TPI による腫瘍の増殖抑制効果についても評価したところ、同じく p53 WT 細胞、p53 KO 細胞および p53 ミスセンス変異細胞、いずれの腫瘍に対しても有意に増殖抑制効果を示した。これらの結果は、実際の腫瘍で見られるような 3 次元的な細胞間相互作用、細胞極性、酸素・栄養・老廃物・薬剤など勾配形成がある環境においても、FTD が p53 ステータスに関わらず抗腫瘍効果を発揮することを示すものである。この結果は、FTD/TPI がこれまでの臨床試験において、患者を層別しなくともその治療効果が確認されてきた理由の 1 つなのかもしれない<sup>8,9)</sup>。

ディッシュ上の 2D 細胞培養系では、p53 WT 細胞と p53 KO 細胞および p53 ミスセンス変異細胞とでは FTD 処理時の細胞運命が異なり、FTD による増殖抑制効果に差が見られた。その状況でスフェロイド 3D モデルやヒト腫瘍移植マウスモデルで同程度の増殖抑制効果が見られたことは興味深い。その理由として、FTD 処理により細胞レベルでは細胞老化、細胞死のいずれかが起こるにしても、3D モデルでの今回の解析期間では同程度の増殖抑制効果として現れたことが考えられる。ヒト腫瘍移植マウスモデルにおいて、FTD/TPI は薬剤投与終了後も腫瘍増殖抑制効果は長く継続する特徴があることが示されている<sup>3,13)</sup>。また、薬剤処理により細胞老化を起こした細胞が、その後悪性度を増して再増殖することも報告されている<sup>72)</sup>。p53 ステータスの異なる移植腫瘍に対し FTD/TPI の薬剤投与を終了した後の長期間の腫瘍増殖抑制効果についてさらなる検証が必要である。

## 結論

本研究では、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9システムを用いて、機能獲得型 (gain-of-function, GOF) p53 ミスセンス変異細胞を樹立することに成功した。続いて、樹立した同質遺伝的な細胞の比較で、RNA-seq 技術を応用した網羅的遺伝子発現解析により、遺伝子発現レベルでの p53 の野生型、欠失、ミスセンス変異細胞の違いを明らかにすることができた。特筆すべきは、p53 の GOF 点突然変異のノックインはゲノムワイドな遺伝子発現に影響を与えていたことである。

この特徴的な GOF p53 ミスセンス変異細胞に、トリフルリジン (FTD) による DNA 複製ストレスを与えると、p53 KO 細胞と同様に姉妹染色体の分配異常さらには細胞分裂後に核構造の不全を有する多核化を起し細胞死が誘導された (図 41)。つまり、FTD は GOF 変異 p53 発現による遺伝子発現プロファイルの違いを乗り越えて抗腫瘍効果を発揮できる抗がん剤であることが示された。また、スフェロイド 3D モデル、ヒト腫瘍移植マウスモデルでの検討でも FTD (あるいはロンサーフ, FTD/TPI) の GOF 変異 p53 を発現する腫瘍に対する増殖抑制効果が確認されたことから、ロンサーフ (FTD/TPI) は p53 変異の有無に関わらず抗腫瘍効果が期待できる抗がん剤であることが示唆された。

本研究成果の意義としては、(1) FTD を主成分とする抗がん剤ロンサーフの p53 変異ステータスによる抗腫瘍効果発揮のメカニズムの違いを明らかにしたこと、(2) メカニズムの違いにも関わらず p53 の変異の有無によらずロンサーフが一定の抗腫瘍効果を発揮しうることを明らかにしたこと、さらに (3) 薬剤により DNA 複製ストレスを与え、分裂期染色体分配異常を起こさせ染色体不安定性に伴う細胞死を誘導することが、特に正常な p53 の機能を喪失した癌細胞に対する新たながん治療戦略として有効であることを示したことである。

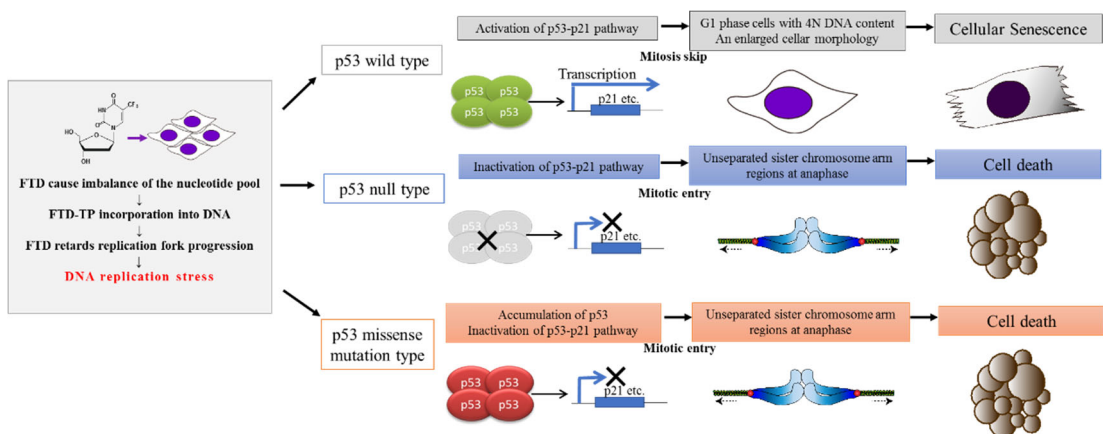


図 41 Schematic model of the effect of trifluridine (FTD)

The response of p53 gain-of-function mutant cells to FTD was a remarkable abnormality of chromosome segregation with severe chromosome bridges during anaphase and subsequent apoptotic cell death.

## 引用文献

- 1) Maehara Y, Soejima Y, Yoshizumi T, Kawahara N, Oki E, Saeki H, et al. The evolution of surgical treatment for gastrointestinal cancers. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(11):1333-1349.
- 2) Kitao H, Iimori M, Kataoka Y, Wakasa T, Tokunaga E, Saeki H, et al. DNA replication stress and cancer chemotherapy. *Cancer Sci*. 2018;109(2):264-271.
- 3) Utsugi T. New challenges and inspired answers for anticancer drug discovery and development. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43(10):945-953.
- 4) Emura T, Nakagawa F, Fujioka A, Ohshimo H, Yokogawa T, Okabe H, et al. An optimal dosing schedule for a novel combination antimetabolite, TAS-102, based on its intracellular metabolism and its incorporation into DNA. *Int J Mol Med*. 2004;13(2):249-255.
- 5) Edahiro K, Iimori M, Kobunai T, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Kataoka Y, et al. Thymidine Kinase 1 Loss Confers Trifluridine Resistance without Affecting 5-Fluorouracil Metabolism and Cytotoxicity. *Mol Cancer Res*. 2018;16(10):1483-1490.
- 6) Langenbach RJ, Danenberg PV, Heidelberger C. Thymidylate synthetase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridylate. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;48(6):1565-1571.
- 7) Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):180-192.

- 8) Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, Nishina T, Komatsu Y, Baba H, et al. TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(10):993-1001.
- 9) Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, Yoshino T, Garcia-Carbonero R, Mizunuma N, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(20):1909-1919.
- 10) Chen X, Qiu H, Chen Y, Wang M, Zhu P, Pan S, et al. A Comparison of Bevacizumab Plus TAS-102 and TAS-102 Monotherapy for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2021;11:690515.
- 11) Liu CJ, Hu T, Shao P, Chu WY, Cao Y, Zhang F. TAS-102 Monotherapy and Combination Therapy with Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2021;2021:4014601.
- 12) Sugiura K, Seo Y, Takahashi T, Tokura H, Ito Y, Tanaka M, et al. Cost-effectiveness of TAS-102 plus bevacizumab versus TAS-102 monotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):184.
- 13) Tanaka N, Sakamoto K, Okabe H, Fujioka A, Yamamura K, Nakagawa F, et al. Repeated oral dosing of TAS-102 confers high trifluridine incorporation into DNA and sustained antitumor activity in mouse models. *Oncol Rep.* 2014;32(6):2319-2326.
- 14) Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, et al.

Trifluridine Induces p53-Dependent Sustained G2 Phase Arrest with Its Massive Misincorporation into DNA and Few DNA Strand Breaks. *Mol Cancer Ther.* 2015;14(4):1004-1013.

15) Kataoka Y, Iimori M, Fujisawa R, Morikawa-Ichinose T, Niimi S, Wakasa T, et al. DNA Replication Stress Induced by Trifluridine Determines Tumor Cell Fate According to p53 Status. *Mol Cancer Res.* 2020;18(9):1354-1366.

16) de Andrade KC, Lee EE, Tookmanian EM, Kesserwan CA, Manfredi JJ, Hatton JN, et al. The TP53 Database: transition from the International Agency for Research on Cancer to the US National Cancer Institute. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):1071-1073.

17) Hwang LA, Phang BH, Liew OW, Iqbal J, Koh XH, Koh XY, et al. Monoclonal Antibodies against Specific p53 Hotspot Mutants as Potential Tools for Precision Medicine. *Cell Rep.* 2018;22(1):299-312.

18) Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):68-76.

19) Soussi T, Wiman KG. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ.* 2015;22(8):1239-1249.

20) Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, et al. Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature.* 2017;545(7653):229-233.

- 21) Sabapathy K, Lane DP. Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(1):13-30.
- 22) Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*. 2015;525(7568):206-211.
- 23) Cao X, Hou J, An Q, Assaraf YG, Wang X. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resist Updat*. 2020;49:100671.
- 24) Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(5):8921-8946.
- 25) Huang Y, Liu N, Liu J, Liu Y, Zhang C, Long S, et al. Mutant p53 drives cancer chemotherapy resistance due to loss of function on activating transcription of PUMA. *Cell Cycle*. 2019;18(24):3442-3455.
- 26) Lee JM, Bernstein A. p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(12):5742-5746.
- 27) Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, et al. Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer Res*. 1996;56(3):556-562.
- 28) Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in

hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(9):3148-3157.

29) Hashimshony T, Senderovich N, Avital G, Klochendler A, de Leeuw Y, Anavy L, et al. CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol*. 2016;17:77.

30) Grant GD, Kedziora KM, Limas JC, Cook JG, Purvis JE. Accurate delineation of cell cycle phase transitions in living cells with PIP-FUCCI. *Cell Cycle*. 2018;17(21-22):2496-2516.

31) Koh SB, Mascalchi P, Rodriguez E, Lin Y, Jodrell DI, Richards FM, et al. A quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. *J Cell Sci*. 2017;130(2):512-520.

32) Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.

33) Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *OMICS*. 2012;16(5):284-287.

34) Shu S, Iimori M, Wakasa T, Ando K, Saeki H, Oda Y, et al. The balance of forces generated by kinesins controls spindle polarity and chromosomal heterogeneity in tetraploid cells. *J Cell Sci*. 2019;132(24).

35) Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*.

1994;265(5170):346-355.

36) Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. 2015;31(7):1120-1123.

37) Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823.

38) Goodarzi AA, Jeggo PA. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv Genet*. 2013;82:1-45.

39) Yu C, Liu Y, Ma T, Liu K, Xu S, Zhang Y, et al. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16(2):142-147.

40) Li Y, Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? *Oncogene*. 2007;26(15):2220-2225.

41) Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(10):701-713.

42) Di Agostino S, Strano S, Emiliozzi V, Zerbini V, Mottolese M, Sacchi A, et al. Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell*. 2006;10(3):191-202.

43) Fontemaggi G, Dell'Orso S, Triscioglio D, Shay T, Melucci E, Fazi F, et al. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-

angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1086-1093.

44) Adorno M, Cordenonsi M, Montagner M, Dupont S, Wong C, Hann B, et al. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell.* 2009;137(1):87-98.

45) Muller PA, Caswell PT, Doyle B, Iwanicki MP, Tan EH, Karim S, et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell.* 2009;139(7):1327-1341.

46) Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011;192(2):209-218.

47) Do PM, Varanasi L, Fan S, Li C, Kubacka I, Newman V, et al. Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev.* 2012;26(8):830-845.

48) Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, Langerod A, Moon SH, Rodriguez-Barrueco R, et al. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell.* 2012;148(1-2):244-258.

49) Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* 2018;50(8):1-14.

50) Grun D, van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163(4):799-810.

51) Yanai I, Hashimshony T. CEL-Seq2-Single-Cell RNA Sequencing by Multiplexed Linear Amplification. *Methods Mol Biol.* 2019;1979:45-56.

- 52) Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, Reinius B, Guillaumet-Adkins A, Smets M, et al. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell*. 2017;65(4):631-643 e634.
- 53) Miyawaki-Kuwakado A, Wu Q, Harada A, Tomimatsu K, Fujii T, Maehara K, et al. Transcriptome analysis of gene expression changes upon enzymatic dissociation in skeletal myoblasts. *Genes Cells*. 2021;26(7):530-540.
- 54) Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
- 55) Risso D, Ngai J, Speed TP, Dudoit S. Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nat Biotechnol*. 2014;32(9):896-902.
- 56) Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010;11(10):R106.
- 57) Smith B, Schafer XL, Ambeskovic A, Spencer CM, Land H, Munger J. Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells. *Cell Rep*. 2016;17(3):821-836.
- 58) Lowman XH, Hanse EA, Yang Y, Ishak Gabra MB, Tran TQ, Li H, et al. p53 Promotes Cancer Cell Adaptation to Glutamine Deprivation by Upregulating Slc7a3 to Increase Arginine Uptake. *Cell Rep*. 2019;26(11):3051-3060 e3054.
- 59) Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, et al. Gain of function

of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004;119(6):861-872.

60) Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004;119(6):847-860.

61) Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, et al. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun*. 2013;4:2935.

62) Johmura Y, Shimada M, Misaki T, Naiki-Ito A, Miyoshi H, Motoyama N, et al. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell*. 2014;55(1):73-84.

63) Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. 2008;132(3):487-498.

64) Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, Ohtawa K, Miyawaki A. Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biol*. 2011;12:2.

65) Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*. 2007;41:169-192.

66) Chan KL, Palmai-Pallag T, Ying S, Hickson ID. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol*. 2009;11(6):753-760.

- 67) Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, Groth P, Weller MC, Shaikh N, et al. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*. 2013;494(7438):492-496.
- 68) Minocherhomji S, Ying S, Bjerregaard VA, Bursomanno S, Aleliunaite A, Wu W, et al. Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature*. 2015;528(7581):286-290.
- 69) Tsuda Y, Iimori M, Nakashima Y, Nakanishi R, Ando K, Ohgaki K, et al. Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora B during tubulin-binding agent-induced mitotic arrest. *Sci Rep*. 2017;7(1):16762.
- 70) Liu S, Kwon M, Mannino M, Yang N, Renda F, Khodjakov A, et al. Nuclear envelope assembly defects link mitotic errors to chromothripsis. *Nature*. 2018;561(7724):551-555.
- 71) Kasagi Y, Harada Y, Morodomi Y, Iwai T, Saito S, Yoshida K, et al. Peritoneal Dissemination Requires an Sp1-Dependent CXCR4/CXCL12 Signaling Axis and Extracellular Matrix-Directed Spheroid Formation. *Cancer Res*. 2016;76(2):347-357.
- 72) Milanovic M, Fan DNY, Belenki D, Dabritz JHM, Zhao Z, Yu Y, et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*. 2018;553(7686):96-100.

## 謝辞

本研究を纏めるに際し、終始御懇篤なる御指導、御高配を賜りました九州大学大学院 薬学研究院 薬剤学分野 大戸 茂弘 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、有益な御助言、御高閲を賜りました九州大学大学院 薬学研究院 グローカルヘルスケア分野 小柳 悟 教授、九州大学大学院 薬学研究院 薬物動態学分野 松永 直哉 教授、九州大学病院 薬剤部 薬学研究院臨床薬物治療学分野 江頭 伸昭 准教授に謹んで感謝いたします。

本研究の開始から論文作成に至るまで、終始絶えず懇切丁寧な御指導、御高配を賜りました九州大学大学院 薬学研究院 抗がん剤育薬共同研究部門 北尾 洋之 教授、飯森 真人 准教授に心より深謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、本研究を遂行するに際し、激励と終始有益なご指導ご助言ご討論をしていただきました公立学校共済組合九州大学中央病院 前原 喜彦 院長に心より深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、温かくご指導ご助言ご討論いただきました九州大学大学院 消化器・総合外科 森 正樹 教授（当時）、佐伯 浩司 教授（当時）、沖 英次 診療准教授、吉住 朋晴 教授に深く感謝いたします。

RNA-Seq 解析の遂行からデータ取得にあたり、詳細な計画、技術指導、データ解析いただきました九州大学大学院 生体防御医学研究所 トランスクリプトミクス分野 大川 恭行 教授、原田 哲仁 准教授、前原 一満 助教、九州大学大学院 生体防御医学研究所 情報生物学分野 須山 幹太 教授、菊竹 智恵 助教、大鵬薬品工業 研究本部 小武内 尚 博士に深く感謝いたします。

動物試験の計画からデータ取得にあたり、綿密な計画、熟練した技術による試験遂行、データ解析いただきました大鵬薬品工業 研究本部 常國 健太 博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに際し、共に切磋琢磨しご協力いただいた九州大学大学院 薬学研究院 抗がん剤育薬共同研究部門 片岡 裕貴 研究員、周 正 研究員、九州大学大学院 医学研究院 消化器総合外科 枝廣 圭太郎 博士、藤本 禎明 博士、邱 仕超 博士、野中 謙太郎 先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するに際し、サポートいただきました九州大学大学院 薬学研究院 抗がん剤育薬共同研究部門、九州大学大学院 医学研究院 消化器総合外科、九州大学大学院 生体防御医学研究所、九州大学 教育・研究支援センターの皆様に深く感謝いたします。

本研究の共同研究を連携して遂行するに際し、綿密なご指導ご助言ご討論いただきました大鵬薬品工業株式会社 研究本部 育薬研究所（当時）武知 貞士 所長、松岡 和明 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行ならびに纏める貴重な機会を与えていただき、終始激励いただきました大鵬薬品工業株式会社 研究本部 宇津木 照洋 専務取締役、相良 武 本部長、水洗 慎司 副本部長、宮寺 和孝 博士、松尾 憲一 博士、岩澤 善一 博士に深く感謝いたします。

本研究を遂行し纏めるに際し、見守り励ましていただきました大鵬薬品工業 研究本部 大久保 秀一 博士、五月女 裕 博士、村口 輝行 博士、南口 和久 博士、上野 裕之 博士、吉村 千穂子 博士、研究本部の皆様に深く感謝いたします。

最後に、私の研究生生活を絶えず支えてくれた妻 明日香、娘 千佳、両親、兄弟、祖母に心より感謝いたします。