

# 論文内容要旨

## 論文題目

網膜芽細胞腫細胞の p53 経路活性化を介した増殖抑制法開発に関する研究

責任講座： 眼科学講座  
氏名： 富樫 敬太

## 【内容要旨】 (1,200 字以内)

**背景：** 網膜芽細胞腫は最も頻度の高い小児眼内悪性腫瘍である。現在、網膜芽細胞腫の治療法はレーザー治療・冷凍凝固療法・放射線治療・局所化学療法・全身化学療法・眼球摘出術などが行われている。様々な治療法の開発により網膜芽細胞腫は生命予後が良好な悪性腫瘍となったが、現在もなお重症例の眼球温存率は低い。また、化学療法や放射線治療による二次がんのリスクもあり、安全性が高く視機能を温存できるような新規治療法が求められる分野である。今回、ドラッグリポジショニングの手法を用いて網膜芽細胞腫に有効な薬剤スクリーニングを行い、予備実験の結果からパーキンソン病の治療薬として開発された CEP1347 に着目し、網膜芽細胞腫細胞に対する CEP1347 の有効性を検討した。

**方法：** 6 種類の網膜芽細胞腫細胞株と正常ヒト繊維芽細胞株 IMR90 を用いて CEP1347 による細胞増殖抑制能を WST-8 法やトリパンブルー染色法を用いて検討した。さらに、その細胞増殖抑制の作用機序についても p53 経路を中心にウェスタンブロット法を用いて検討した。

**結果：** 網膜芽細胞腫細胞株 6 種類中 5 種類で CEP1347 による細胞増殖抑制効果を認めた。とりわけ CEP1347 に感受性の高い網膜芽細胞腫細胞株では CEP1347 処理によって代表的ながん抑制遺伝子 p53 の活性化及びその代表的な標的遺伝子である p21 タンパクの発現が促進された。また、p53 の転写活性に対する阻害薬 Pifithrin- $\alpha$  は CEP1347 による p21 タンパク発現や増殖抑制能を低下させたことから、CEP1347 は網膜芽細胞腫細胞に対して p53 経路依存的な増殖抑制能をもつことが明らかとなった。さらに、CEP1347 に対する感受性を決定する因子を検討したところ、p53 の阻害因子 murine double minute 2 (MDM2) と murine double minute 4 (MDM4) のうち、MDM4 が高発現している網膜芽細胞腫細胞株は CEP1347 の感受性が高い網膜芽細胞腫細胞株と一致していた。また、CEP1347 の網膜芽細胞腫細胞に対する増殖抑制能と MDM4-p53 経路の関連性を検討したところ、MDM4 タンパクを高発現している網膜芽細胞腫細胞株は CEP1347 によって時間・濃度依存的に MDM4 タンパクの発現抑制と連動して p53 経路が活性化されることがわかった。

**結論：** MDM4 が高発現している網膜芽細胞腫細胞において、CEP1347 は MDM4 を抑制し p53 経路を活性化させ細胞増殖抑制能を発揮することを明らかにした。将来、CEP1347 は MDM4 が高発現している網膜芽細胞腫の新規治療薬になりうる可能性が期待される。

令和3年 1月 12日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名：富樫 敬太

論文題目：網膜芽細胞腫細胞の p53 経路活性化を介した増殖抑制法開発に関する研究

審査委員：主審査委員

飯野 光喜 

副審査委員

今田 恒夫 

副審査委員

永瀬 智 

審査終了日：令和3年 1月 7日

### 【 論文審査結果要旨 】

網膜芽細胞腫は最も頻度の高い小児眼内悪性腫瘍である。現在、レーザー治療・冷凍凝固療法・放射線治療・局所化学療法・全身化学療法・眼球摘出術などが行われており生命予後は良好となったが、重症例の眼球温存率は低い。また、患者は小児であり化学療法や放射線治療による二次がんのリスクも高く、安全性が高く視機能を温存できるような新規治療法が求められている。申請者はドラッグリポジショニングの手法を用いて網膜芽細胞腫に有効な薬剤を探索し、パーキンソン病の治療薬として開発された CEP1347 に着目し、網膜芽細胞腫細胞に対する CEP1347 の有効性を検討した。

6種類の網膜芽細胞腫細胞株と正常ヒト繊維芽細胞株 IMR90 を用いて CEP1347 による細胞増殖抑制能を WST-8 法およびトリパンブルー染色法を用いて検討した。さらに、その細胞増殖抑制の作用機序についても p53 経路を中心にウェスタンブロット法を用いて検討した。結果、網膜芽細胞腫細胞株 6 種類中 5 種類で CEP1347 による細胞増殖抑制効果を認めた。特に CEP1347 に感受性の高い細胞株では CEP1347 処理により代表的ながん抑制遺伝子である p53 の活性化及びその主たる標的遺伝子である p21 タンパクの発現が促進されていた。また、p53 の転写活性に対する阻害薬 Pifithrin- $\alpha$  は CEP1347 による p21 タンパク発現や増殖抑制能を低下させたことから、CEP1347 は網膜芽細胞腫細胞に対して p53 経路依存的な増殖抑制能をもつことが明らかとなった。さらに、CEP1347 に対する感受性を決定する因子を検討したところ、p53 の阻害因子の MDM2 と MDM4 のうち、MDM4 が高発現している細胞株は CEP1347 の感受性が高い細胞株と一致していた。また、CEP1347 の増殖抑制能と MDM4-p53 経路の関連

性を検討したところ、MDM4 タンパクを高発現している細胞株は CEP1347 によって時間・濃度依存的に MDM4 タンパクの発現抑制と連動して p53 経路が活性化されることが明らかになった。

審査委員会では、1) 申請者が CEP1347 に注目するに至った過程、2) CEP1347 の小児に対する安全性などの問題点が指摘された。しかし本論文は、MDM4 が高発現している網膜芽細胞腫細胞において、CEP1347 は MDM4 を抑制し p53 経路を活性化させ細胞増殖抑制能を発揮することを初めて明らかにした貴重な研究であり、CEP1347 は MDM4 が高発現している網膜芽細胞腫の新規治療薬になりうる可能性が期待されるとともに、同様な特徴を有する他の癌種への臨床応用も考えられることから学位授与に値すると判定した。

(1, 200字以内)