

## 学位論文審査要旨（課程博士）

論文著者名 RAHMAN MD RATUL

論文題名：Elucidation of the DNA repair mechanisms involved in the repair of DNA damage caused by the Arabinosides and Anti-COVID-19 drugs

（邦題：アラビノシド系抗がん剤と抗 COVID-19 ウィルス治療薬によって引き起こされる DNA 損傷の修復機構の解明（英文））

### 論文審査委員

主査 教授	廣田 耕志	印
委員 准教授	池谷 鉄兵	印
委員 准教授	田岡 万悟	印

#### 1 研究の目的

ヌクレオシド類似体はヌクレオシドと類似した構造を持つ化合物で、抗ウイルス薬として 30 年以上前から使用されてきた。通常、ヌクレオシド類似体は 2 つの異なるメカニズムでウイルスの DNA 複製を阻害する。複製のチェーンターミネーションでは、ヌクレオシドアナログが新生 DNA の末端に取り込まれ、その後の重合反応を阻害する。損傷した鋳型上での複製フォーク停止では、DNA 鎖に組み込まれたヌクレオシドアナログが DNA 損傷として機能し、DNA 複製を阻害する。一方、抗ウイルス薬品として使用される、ヌクレオシド類似体が宿主のゲノム DNA に誤って挿入され、それによって宿主ゲノムの複製が阻害される可能性がある。したがって、宿主ゲノム DNA を忠実に複製するためには、これらを効率的に除去する必要がある。本研究で RAHMAN 氏は、アラビノシドおよびレムデシビルやモルヌピラビルなどの抗 COVID-19 薬に対する細胞の耐性に必要な DNA 修復機構を探索した。

#### 2 研究の方法と結果

1: 複製ポリメラーゼ  $\epsilon$  の校正エキソヌクレアーゼ活性は、CTF18 依存的・非依存的にアラビノシドに対する細胞耐性を促進する。

アラビノシドは、リボース糖の代わりにアラビノース糖を含むヌクレオシド類似体である。Ara-A、Ara-C、Ara-G、Ara-T は、それぞれアデニン、シトシン、グアニン、チミン塩基と結合したアラビノース糖である。Ara-C は急性リンパ性白血病および骨髄性白血病の治療に、Ara-A はヒトヘルペスウイルス感染症の治療に、Ara-G は T 細胞悪性腫瘍に、Ara-T は単純ヘルペスウイルス感染症の治療に使用される。アラビノシドである Ara-C は、新生 DNA の 3'末端に取り込まれた後、複製を妨害することによって DNA 複製のチェーンターミネーターとして機能し、それによってウイルスや癌細胞の増殖を制限する。組み込まれた Ara-CMP

は、ポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ) の校正エキソヌクレアーゼ活性によって効率的に除去されるが、その際、代替クランプローダーCTF18 が極めて重要な役割を果たす。しかしながら、新生 DNA の 3'末端から他のアラビノシドを除去するために CTF18 が必要であるかどうかは、依然として不明である。ここで RAHMAN 氏は、Ara-A に対する細胞耐性の原因となる DNA 修復経路を探索し、Pol $\epsilon$  の校正エキソヌクレアーゼ活性を欠損した細胞 (POLE1exo-/-) が、Ara-A に対して最も高い感受性を示すことを見出した。この活性は Ara-G と Ara-T に対する細胞耐性にも必要であった。CTF18-/-細胞は野生型細胞よりも高い Ara-A 感受性を示したが、それは POLE1exo-/-細胞よりも低かった。Ara-G および Ara-T に対する感受性についても同様の傾向が観察された。これらの結果は、これらのアラビノシドは Pol $\epsilon$  プルーフリーディング エキソヌクレアーゼ活性によって除去され、CTF18 は Pol $\epsilon$  を介した Ara-C の除去には極めて重要であるが、Pol $\epsilon$  を介した Ara-A、Ara-G、Ara-T の除去には重要な役割を果たしていないことを示している。このように RHAMAN 氏は、Ara-C と他のアラビノシド (Ara-A、Ara-G、Ara-T) との間に、新生 DNA の 3'末端からの除去において違いがあることを明らかにした。この研究は、Ara-C に加えて他のアラビノシドを用いた研究をさらに進め、効率的な抗癌剤を開発するための臨床応用の窓を開くものである。

2: 岡崎フラグメントの FEN1 による成熟はレムデシビルに対する細胞耐性に重要である  
レムデシビルは COVID-19 の治療に用いられる 1'-シアノ修飾アデニンヌクレオチドアナログである。この薬剤は当初 C 型肝炎ウイルスを阻害するために開発され、エボラウイルス、ニパウイルス、呼吸器合胞体ウイルス感染にも有効である。この薬剤はウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) 酵素を阻害し、それによってウイルスの増殖を抑制する。さらに、レムデシビルの抗癌作用は、ヒト卵巣癌細胞、前立腺癌、肝細胞癌、悪性黒色腫細胞で確認されている。ヌクレオチドアナログのプロドラッグであるレムデシビルは、細胞内で直接レムデシビルリン酸 (RMP) に代謝され、一連の反応によって律速段階である最初のリン酸化段階をバイパスする。近年、ゲノムワイドな CRISPR-Cas9 スクリーニングやトランスクリプトミクスにより、レムデシビル投与時の細胞毒性経路が明らかにされているが、レムデシビル耐性のメカニズムは解明されていない。ここで RAHMAN 氏は、様々な DNA 修復経路を欠損させた 24 の変異型 DT40 細胞の感受性をモニターすることにより、レムデシビルに対する細胞耐性の原因となる DNA 修復経路を探索した。ランマンシ氏は、FEN1 欠損細胞がレムデシビルに対して最も高い感受性を示すことを突き止めた。FEN1 は塩基除去修復 (BER) に寄与していることから、BER 欠損変異体のレムデシビルに対する細胞感受性を測定したところ、他の BER 変異体はレムデシビルに耐性であることがわかり、FEN1 は BER 以外の役割を通じてレムデシビルに対する細胞耐性に寄与していることが示された。FEN1-/-細胞では、新生 DNA にレムデシビルが組み込まれると、DNA 損傷が増大し、S 期初期に細胞周期が停止することが観察された。さらに、FEN1 欠損細胞ではレムデシビルによって複製フォークの進行が有意に遅くなったことから、レムデシビルによって複製が阻害された場合、複製の進行に FEN1 が直接関与していることが示された。FEN1 は BER とは独立して、レムデシビルに対する耐性化に寄与することから HARMAN 氏は FEN1 の岡崎フラグメント成熟 (OFM) 機能についてさらに調査を行った。FEN1-/-細胞は OFM の遅延を示し、レムデシビルの取り込みは FEN1-/-細胞のこのプロセスを決定的に阻害した。これらの結果から、FEN1 は OFM を促進することにより、レムデシビルの取り

込みに伴う DNA 損傷を抑制する上で重要な役割を果たしていることが示された。この研究は、効率的な臨床応用のための動物モデルだけでなく、ヒトがん細胞に関するレムデシビルのさらなる研究の窓を開くものである。

3 : PARP1、TDP2、BRCA2 はモルヌピラビルに対する細胞耐性に必要である

モルヌピラビルは、ヌクレオシドアナログ N4-ヒドロキシシチジン (NHC) のプロドラッグであり、当初はインフルエンザの治療薬として開発されたが、COVID-9 の治療薬として使用されている。モルヌピラビルは、RNA ウイルスの複製時にコピーエラーを引き起こすことで抗ウイルス活性を発揮する。モルヌピラビルはシチジンと類似したリボヌクレオシド類似体である。複製時に実際のシチジンを使う代わりに、ウイルスの酵素はこれを新しく合成された RNA に組み込む。しかし、モルヌピラビルの除去メカニズムはまだ解明されていない。本研究で RAHMAN 氏は、異なる DNA 修復遺伝子を欠損した 24 の変異 DT40 細胞の感受性を観察することにより、モルヌピラビルに対する細胞抵抗性をもたらす DNA 修復機構を検討した。その結果、PARP1<sup>-/-</sup>、TDP2<sup>-/-</sup>、BRCA2<sup>-/-</sup>および ATM<sup>-/-</sup>細胞のモルヌピラビルに対する感受性を観察した。PARP1 は塩基除去修復 (BER) において極めて重要な役割を果たしていることから、BER 欠損変異体におけるモルヌピラビルに対する細胞感受性を推定したところ、他の BER 変異体はモルヌピラビルに耐性であることから、PARP1 は BER 以外の役割を通じてレムデシビルに対する細胞耐性に寄与していることが示された。さらに、BRCA2 が相同組換え (HR) に関与していることから、HR が欠損しているさまざまな変異体を解析したところ、XRCC2<sup>+</sup>および XRCC3<sup>+</sup>細胞は野生型細胞と比較してモルヌピラビルに対する感受性が上昇していたのに対し、BRCA1 欠損細胞はモルヌピラビルに対して耐性を示した。このデータは、BRCA2 がモルヌピラビルに対する細胞の耐性において、BRCA1 とは独立して HR に寄与していることを示唆している。さらに、TDP1 ではなく TDP2 のみがモルヌピラビルの除去に関与していることも明らかになった。RAHMAN 氏は、モルヌピラビルによる細胞死の防止に PARP1、TDP2、BRCA2 が関わることを発見した。

### 3 審査の結果

RAHMAN 氏は、上記の博士論文の研究で、アラビノシド、レムデシビルおよびモルヌピラビルにより誘導される DNA 損傷への応答機構を発見し、国際的評価の高い DNA Repair 2 報をすでに発表し、1 報をリバイス中である。口頭試問試験を、上記論文審査委員 3 名で 2024 年 7 月 31 日に実施し、RAHMAN 氏の研究者としての能力を検査し、博士 (理学) の学位を取得するのに十分研究能力を持っていると評価した。

### 4 最終試験の結果

上記口頭試問試験の合格を受け、最終試験 (博士公聴会) を 2024 年 8 月 15 日に実施した。RAHMAN 氏による 40 分間の研究発表に続く 20 分間の質疑応答を行い、14 名の理学研究科化学専攻教授会メンバーによる評価を行った。その結果、評価者 14 名全員が合格と判断した。以上の理学研究科化学専攻における審査の結果、RAHMAN 氏を合格と判断した。