

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 323 号		学位申請者	南 謙太郎
審 査 委 員	主 査	宮田 篤郎	学 位	博士 (医学)
	副 査	岸田 昭世	副 査	夏越 祥次
	副 査	小澤 政之	副 査	原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成27年4月23日、学位申請者南 謙太郎君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) RRM1 の発現をノックダウンしたクローン株では CNT1 の発現が上昇するが、トランジェントの系や誘導系のノックダウンでも CNT1 の発現が低下するのか。

(回答) トランジェントの系と誘導系のノックダウンの検討は行っていないのでわからない。今後、トランジェントの系でも実験し、確認しようと考えている。

質問2) Gemcitabine (GEM) 耐性細胞における RRM1 の発現増加は、遺伝子増幅によるものか。

(回答) MGEM6 と MGEM8 では遺伝子増幅が起きており、RRM1 の発現増加は遺伝子増幅によるものだと考えられる。最近では GEM 耐性細胞において RRM1 のタンパク質を分解する E3 ユビキチンリガーゼの RFN2 と Bmi1 の発現低下により RRM1 の発現が増加している報告がある。

質問3) RRM1 の発現増加によって GEM がトラップされるならば、Hydroxyurea (HU) で RRM2 を阻害しても、GEM の最終代謝物 dFdCTP が増えないので感受性が上がらないと思うがなぜ感受性が上がるのか。

(回答) HU で RRM2 を阻害するとリボヌクレオチドレダクターゼの活性が阻害され dCTP の量が減り、dFdCTP の DNA への取り込みが増加し感受性が増加していると考えられる。

質問4) RRM1 の発現が低下すると CNT1 の発現が上昇する機序はなにか。

(回答) 詳しい機序は現在わかっていない。RRM1 のノックダウンにより DNA 合成の主要な経路が使えなくなるので、代わりとして、ヌクレオシド輸送体に関わる salvage 経路で DNA 合成をするために発現が増加していると考えられる。

質問5) HU が RRM2 を阻害する機序はなにか。

(回答) HU は RRM2 の活性化サイトのチロシルフリーラジカルを除去し、酵素を不活化している。

質問6) GEM は耐性が誘導されやすいのか。GEM を研究に選んだ理由はなにか。

(回答) 肺癌において GEM は化学療法の第一選択薬となっており、耐性化が治療を行う上で障害となっているため GEM を選んだ。

質問7) MIA PaCa-2 細胞で実験をしているが、他の肺癌細胞株では検討していないのか。

(回答) 他の複数の肺癌細胞株でも GEM 耐性細胞株の単離を試みたが、うまく単離できず MIA PaCa-2 細胞のみの検討となった。

質問8) RRM1 のノックダウンの実験を MGEM8 で行っても同じ結果が得られるか。

(回答) MGEM8 でも MGEM6 同様に RRM1 の発現が増加しており、RRM1 をノックダウンすることで GEM の感受性は増加すると予想される。

質問9) CNT3 も GEM の輸送に関わっているが CNT3 については検討しているのか。

(回答) 論文には示していないが、MIA PaCa-2 では RT-PCR の結果、CNT3 の mRNA の発現が得られなかったため、

MIAPaCa-2 では CNT3 は関与していないと考えられる。

質問 10) 癌幹細胞も抗癌剤に耐性になることが知られているが、実験に用いた GEM 耐性細胞は、癌幹細胞の特徴を示しているのか。

(回答) 以前に共同研究で GEM 耐性細胞の癌幹細胞性について検討したが、この耐性細胞は膵癌の癌幹細胞の特徴を持ってはいなかった。

質問 11) バクリタキセルや S-1 などが臨床で GEM と併用されているが、併用すると耐性を克服できるのか。

(回答) 現在、GEM 耐性細胞を用いて耐性克服薬剤の検討を行っている。バクリタキセルに関しては検討の結果、相乗効果はなかった。S-1 に関しては論文には示していないが GEM 耐性細胞では 5-FU にも耐性を持っており、併用での相乗効果は望めないと考え実験は行っていない。併用効果が期待できそうな薬剤は抗アレルギー薬のトラニラストがあり、最大無毒性濃度で GEM 耐性細胞のみ GEM の感受性を増加させる。今後さらに薬剤を増やして検討する予定である。

質問 12) 今回の論文以外で GEM 耐性に関わる因子は他にはないのか。

(回答) これまでに、ENT の発現変化や GEM を細胞外に排出する輸送体 multidrug resistance associated protein 7 などの発現増加、GEM の代謝に関わる酵素（デオキシシチジンキナーゼ等）の発現変化が報告されている。

質問 13) GEM は細胞死を誘導するのか。

(回答) GEM は細胞内に取り込まれた後、活性代謝物 dFdCTP になり DNA に取り込まれたあと DNA の伸長の停止を引き起こさせ、細胞死を誘導することが知られている。

質問 14) GEM 耐性細胞は GEM を培地から取り除くと耐性はなくなるのか。

(回答) 通常、耐性細胞はその薬剤を培地から取り除いて長期培養すれば次第に耐性は消失すると考えられる。しかし、この GEM 耐性細胞は RRM1 遺伝子の遺伝子増幅が起きており、培地から GEM を取り除いても簡単には GEM に対する耐性はなくなると予想される。

質問 15) GEM の排出実験は GEM の細胞内への取り込み輸送体 CNT や ENT を阻害して行わないと、排出された GEM がまた取り込まれてしまうと考えられるが阻害して実験を行っているのか。

(回答) GEM の排出実験では CNT や ENT は阻害せず、一度 GEM を取り込ませてから細胞を洗浄後に GEM なしの培地で培養し蓄積量を測定している。排出された GEM の濃度は培地で希釈されて低いと予想されるので再取り込量は無視できると予想される。

質問 16) 各ヌクレオシド輸送体の阻害条件を用いた蓄積実験で、CNT1 強制発現細胞の ENT1 と ENT2 による取り込みが低下するのはなぜか。

(回答) CNT1 強制発現細胞では CNT1 の過剰発現により CNT1 による GEM の取り込みが大幅に増加している。この結果、細胞内の GEM の濃度が増加しているため濃度依存的に GEM を細胞内輸送する ENT による取り込みは低下しているものと考えられる。

質問 17) CNT1 強制発現細胞で GEM の蓄積は親株と同じ量にまで回復しているのに、なぜ GEM の感受性は十分に回復していないのか。

(回答) GEM 耐性細胞では GEM の中間代謝物 dFdCDP と結合する RRM1 が過剰に発現している。このため、CNT1 強制発現細胞で細胞内の GEM が増えたとしても RRM1 と dFdCDP が結合してしまい、最終代謝物 dFdCTP の量があまり増えず、感受性が十分に回復しないと考えられる。

質問 18) GEM の耐性にデオキシシチジンキナーゼの活性は影響するのか。

(回答) GEM の代謝においてデオキシシチジンキナーゼは GEM のリン酸化の律速酵素である。この活性の低下が GEM の耐性に関わっている報告があり、GEM の耐性に影響すると考えられる。しかし、今回の実験で GEM の代謝物などの量を測定しておらず、GEM 耐性細胞で代謝酵素の活性が関わっているかはわからない。今後、GEM のメタボローム解析を行い検討する予定である。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。