

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 468 号		学位申請者	高橋 建吾
審査委員	主査	中川昌之	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	河野嘉文	副査	岸田昭世
	副査	小賤健一郎	副査	原 博満

主査および副査の5名は、平成30年3月7日、学位申請者 高橋 建吾 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) Figure 2 でなぜ CK2 α の実験で 143B、SaOS2、NY、U2OS を使用し、CK2 β で 143B と SaOS2 を使用したのか。

(回答) Figure 1A では CK2 α の発現が 143B と SaOS2 で高かったため、CK2 β の実験でもこれらの細胞を選択した。論文投稿後のリバイスで、CK2 α の発現がさほど高くない 143B と SaOS2 以外の cell line でも CK2 α をノックダウンした後の WST assay の実験を行うべきと指摘をうけた。そのためこのような細胞の選定となった。

質問2) Figure 2 で transfection の時間、WST assay で観察した時間はそれぞれ何時間か。WST は何をみているか。

(回答) WST assay に使用した細胞の transfection は 48 時間であった。WST assay では 72 時間で実験を行った。WST assay では細胞中のミトコンドリア脱水素酵素によるテトラゾリウム塩 (WST-1) のホルマザン色素への変換を吸光度計を用いて計測することで細胞増殖を評価する。

質問3) Figure 3A について間葉系幹細胞の増殖は抑制されていないが正常骨芽細胞では抑制されないのか。

(回答) 正常骨芽細胞においては CX-4945 を用いた実験は行わなかった。

質問4) Figure 5 において縦軸と横軸にそれぞれ FITC-A、PC5.5-A とだけ記載されても内容がわからない。

(回答) アポトーシスが始まり細胞膜内膜のホスファジルセリンが外側に転位し Annexin V-FITC と結合した量を early apoptosis の指標として検出しているのが横軸である。アポトーシスの過程で細胞膜が破壊され DNA の特異的細胞死判定色素である 7-AAD が DNA と結合した量を late apoptosis の指標として検出しているのが縦軸である。

質問5) Figure 6 で *in vivo* による検討では CX-4945 を投与することによる副作用は発生しなかったか。

(回答) 極端に活動性が低下する、下痢をするといった特に目立った変化は動物実験の過程で認められなかった。

質問6) *in vivo* の実験において死因は何であったか。肺転移については検討をしたか。

(回答) 腹腔内での腫瘍の増殖、悪液質、肺転移によるものが考えられるが、顕微鏡で臓器を観察するなどの検討は施行していない。肺転移についての検討はしていない。

質問7) CX-4945 を投与することによる Hedgehog pathway についての検討は行ったか。また Smoothed (SMO) や Notch pathway、PI3K-Akt-mTOR signaling について検討を行ったか。また PI3K-Akt-mTOR signaling に影響が及ぶというのは直接的に基質に関与するのか。CK2 を介して関与するのか。

(回答) 論文には掲載していないが Real-time RCR を施行した結果から CX-4945 投与で GLI1 と GLI2 の発現の低下を確認した。SMO は明らかな差はみられなかった。Notch pathway については検討していない。また PI3K-Akt-mTOR signaling についての検討は行わなかったが、CK2 を介して作用するものとする。

質問8) siCK2 α 、siCK2 β でノックダウンをさせていたとしてもその他の遺伝子に影響が及んでいる可能性がある。複数の siCK2 α 、siCK2 β を用いるか、これらの遺伝子を over expression させる実験は行ったか。

(回答) 複数の siCK2 α 、siCK2 β を用いる検討や、これらを over expression させる検討は行わなかった。よって off-

最終試験の結果の要旨

Target 効果を完全には否定出来ないので、今回は CK2 を介した現象と断定することは出来ない。

質問 9) CX-4945 が骨肉腫細胞の増殖を抑制したといっても CX-4945 が CK2 以外に広く作用を示していたことが考えられるのではないか。阻害薬としての作用機序としては competitive か non-competitive か。

(回答) CX-4945 は competitive に CK2 以外の酵素である FLT3、PIM1、CDK1 等にも作用していると考えられており CX-4945 が CK2 だけを阻害して細胞増殖が抑制されたとは本実験だけでは必ずしも断定することは出来ない。

質問 10) IC50 が論文上では非常に高濃度であると考えられないか。

(回答) *in vivo* の実験は他の癌腫の論文を参考に決定した。IC50 の観点から高濃度でのマウスへの投与であるが経口投与による明らかな有害事象は確認されなかった。今回 IC50 を参考に濃度設定をした検討は行わなかった。

質問 11) Figure 1 の CK2 発現は 143B と SaOS2 の 2 種類では高発現だがその他の 6 種の発現は、コントロールと比べてそれほど高くない。これらは特殊な細胞株ではないのか。Tubulin で補正し定量データを示すべきではないか。

(回答) 143B と SaOS2 の CK2 α の発現が特に高いが、あまり発現が高くない NY と U2OS も使用し WST の実験を行い、NY と U2OS でも CK2 α をノックダウンすることで増殖能が抑制されることを確認した。Tubulin で補正して定量化する検討は今回行わなかったが、本来は実施して確認するべきであり今後検討したい。

質問 12) Figure 2B、D、F で WST-1 assay はその解析時点での細胞数を反映しているだけでその途中の機序としては細胞増殖抑制だけでなく細胞死の誘導も可能性として挙げられるのではないか。

(回答) 今回の WST の実験結果からは細胞の増殖抑制、細胞死の両面の可能性が考えられる。今回細胞死についての解析は施行できなかったが目視にて細胞が浮遊してくるなどの所見は無く細胞死は無いと判断した。

質問 13) Figure 3C で CX-4945 の濃度依存性を示しているがなぜ Figure 3A、B では 10 μ M で実験をしないのか。

(回答) Figure 3A、B について、論文には掲載していないが実際に UBE6T15 に 10 μ M の CX-4945 を投与したところ WST assay で有意に増殖能が低下した。Figure 3A、B は骨肉腫細胞の増殖は抑制して正常細胞は抑制しない CX-4945 の濃度について調査する目的の検討であり、10 μ M では検討しなかった。

質問 14) Figure 3C では CX-4945 は 3 μ M と 10 μ M を使用し Figure 4 では 5 μ M と 10 μ M を使用している。どうして異なる濃度を使用しているのか。

(回答) Figure 3C では実際には 5 μ M でも実験を行っていたが代表的な 3 μ M と 10 μ M を挙げて記載した。Figure 4 では本来であれば 3 μ M についても検討をおこなうべきであったと思われるので今後の検討課題としたい。

質問 15) CX-4945 は CK2 α の阻害剤だが実際に CK2 α の活性が低下を実証している実験データが無い。

(回答) 本来は CK2 α 活性の低下の確認を行うべきであったが、今日では CX-4945 の作用や効果については多数報告され、確立されたものになっていると考えられたため今回は検討を行わなかった。

質問 16) Figure 3C で正常細胞のコントロールは無いのか。

(回答) 実際には UBE6T15 に CX-4945 を 3 μ M で投与した場合増殖能は低下せず、10 μ M で投与した場合は有意に増殖能が低下した。本来は示すべきであったが正常細胞に対する CX-4945 の効果については確認を行っている。

質問 17) 今回、CK2 を分子標的として研究を開始した理由は何か。

(回答) CX-4945 投与の臨床試験はすでに肝内胆管癌、多発性骨髄腫等ですでに臨床試験に使用され良好な結果が得られている。したがって CX-4945 を用いることで骨肉腫に対する新規の治療薬として早期に創薬が期待できるのではないかと考えた。

質問 18) *in vivo* で CX-4945 の投与量は文献的を元に 150mg/kg/day と決定したとのことであるが、人間に換算すると 1日 9g 程度となる。1日の内服量としては多すぎるのではないか。

(回答) 臨床試験では内服量は多くて 1回 1000mg、1日 4回と設定されており実際には量が多すぎることは無いと考えられる。

質問 19) CX-4945 は様々な pathway に影響を及ぼす様だが、主にどの経路に関係していると考えられるか。

(回答) CK2 は多くの基質を有するので、どの pathway に関与しているかについては多様な見解があり、一概に断定できないが、多発性骨髄腫の臨床試験に関する報告では PI3-Akt-mTOR pathway の関与が示唆されている。

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。