

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	486号	学位申請者	坂口 大
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査	谷本 昭英
	副査	武田 泰生	副査	速見 浩士
<p>主査および副査の5名は、平成30年9月11日、学位申請者 坂口 大 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。</p> <p>質問1) TCGA データベースにおける BRD4 高発現 (あるいは低発現と中等度発現) の定義は何か。  (回答) TCGA データベースの淡明腎細胞癌患者 534 名を BRD4 発現に応じて三分割し上位 1/3 を高発現群とした。</p> <p>質問2) JQ1 が BRD4 を抑制するメカニズムはどのようなものか。  (回答) JQ1 はリジンのアセチル化修飾を模倣した構造をもち、BRD4 蛋白がもつアセチル化リジン結合ポケットに拮抗的に結合し、BRD4 が標的遺伝子のプロモーター領域に結合するのを阻害する。</p> <p>質問3) ChIP assay において培養細胞をホルマリンで固定する意味はなにか。  (回答) クロマチン DNA と DNA 結合蛋白が剥がれないように DNA-蛋白架橋の目的でホルマリン固定を行っている。</p> <p>質問4) BRD4 はどのような DNA motif に結合するのか。  (回答) BRD4 のプロモドメインはアセチル化リジン認識 motif として機能するが、結合標的側の DNA motif については検証していない。過去の報告においても明確にこれを示したものはない。本研究での標的遺伝子においてどのような DNA motif が存在するかは興味もたれ、今後の検討課題としたい。</p> <p>質問5) SCG5、RGS19、SPOCD1 など BRD4 の標的遺伝子の promoter region には、質問4の motif が含まれたか。  (回答) 本研究では標的遺伝子の promoter region に質問4の motif が含まれているかどうか検証できていないが、非常に重要な指摘であると思われる今後、プロモーターアッセイを行って検証したい。</p> <p>質問6) SCG5、RGS19、SPOCD1 など、BRD4 の標的遺伝子の promoter region を用いた luciferase assay は行ったか。  (回答) BRD4 が結合する DNA motif が明らかでないため luciferase assay は行っていない。今後、検証したい。</p> <p>質問7) 培養細胞において BRD4 の細胞内局在は確認したか。  (回答) 今回の研究では細胞内局在まで確認していない。今後、蛍光免疫染色などで検証したい。</p> <p>質問8) 腎癌切除材料のホルマリン固定パラフィン切片で BRD4 の免疫染色による発現は確認したか。  (回答) スニチニブ耐性腎癌病理検体は臨床的に取得が困難で、検体が少ないため十分な評価ができないと考え今回、免疫染色は行わなかった。今後、検体数が蓄積されたら検討したい。</p> <p>質問9) BRD4 の免疫染色で腎癌の予後判定は可能か。  (回答) 今回は検証していないが可能性はあると思われるので、腎癌病理検体の免疫染色で今後検証したい。</p> <p>質問10) BRD4 は clear cell RCC のみで発現しているのか。papillary や chromophobe RCC での発現もみられるのか。  (回答) TCGA データベースにおいて、papillary や chromophobe RCC でも同等に発現していることを確認している。</p> <p>質問11) 遊走能を評価するために行われた wound healing assay とは具体的にどのような方法か。  (回答) 細胞を高度過密集培養してピペットチップで線状に創傷を作り 24 時間後の closure rate を比較評価した。</p> <p>質問12) Figure 4F, G, H において mock と si-control という2つのコントロールをおいた理由は何か。  (回答) mock は transfection 試薬のみの添加である。siRNA control との比較は核酸導入による予期しない遺伝子発現抑制効果 (off target 効果) の有無を確認するために行っている。</p> <p>質問13) Figure 4C, 7 に normalized to GUSB とあるが、それが必要な理由と具体的な方法は何か。  (回答) サンプル間で PCR の増幅効率が一定とした条件で比較するため、定量したい遺伝子だけでなくハウスキーピング遺伝子である GUSB をコントロールとして同様に定量し、各々の Ct 値の比率を計算し発現を比較している。</p> <p>質問14) プロモドメイン阻害剤として JQ1 はどのような経緯で発見あるいは開発されたのか。  (回答) 元々、稀少で致死率の高い NUT midline carcinoma の原因遺伝子である NUT 遺伝子と BRD4 が融合遺伝子を形成していることが解り、この癌の治療戦略として BRD4 に親和性の高い阻害剤の開発研究が進み JQ1 が開発された。</p>				

## 最終試験の結果の要旨

質問 15) BRD4 の標的遺伝子として挙げられた 4 つの遺伝子はスニチニブ投与によって発現が上昇しているようにも思えるが、耐性化に伴い発現が上昇しているのか、それとも自然獲得されているものなのか。

(回答) その点を明らかにするためにはこれらの遺伝子がスニチニブ耐性化に関与しているかを示す必要があるが、本研究ではそこまで行えていない。今後、これらの遺伝子の knock down によりスニチニブへの耐性化が抑制されるかどうかを動物実験で確認するなど、さらに検証したいと考えている。

質問 16) BRD4 は分裂増殖に関わる遺伝子を標的としていると思われるが、骨髄など正常細胞においても BRD4 は転写活性因子として機能しているのか。

(回答) 今回は BRD4 の癌遺伝子的機能に着目しているが、心疾患や感染症を初め、非癌領域においても転写因子としての BRD4 の機能を示す報告は多数あり、正常細胞においても重要な転写活性因子として働いていると考えている。

質問 17) JQ1 の正常細胞への影響は報告されているか。また in vivo での 50 mg/kg の用量はどのように決定したか。

(回答) 臨床試験からは消化管幹細胞分化抑制に起因する消化管症状や好中球減少や血小板減少などの血液毒性が報告されている。JQ1 50 mg/kg の用量は過去の報告で最も一般的に使用されている用量であったことから決定した。

質問 18) スニチニブ耐性腎癌細胞を使用しているが、他のマルチキナーゼ阻害剤に対する交差耐性はあるのか。

(回答) 今回の研究ではスニチニブ耐性 786-o 細胞における交差耐性まで検証できておらず、今後検討したい。

質問 19) Supplementary Fig. 3C で A498 と Caki1 の浸潤能だけが抑制されなかった理由はなにか。

(回答) 浸潤能抑制が起らなかった原因については正確に検証していない。RNA-seq 解析の結果から抽出した 14 遺伝子の中で、浸潤能に関与する遺伝子が少なかったことが関連している可能性があり、今後検証したい。

質問 20) 使用したスニチニブ耐性腎癌細胞において親株と比較してトランスポーターの発現変化は確認したか。

(回答) トランスポーターの発現変化は確認していない。親株と耐性株の比較では、耐性株で HIF2 $\alpha$  が高発現していること、またメタボロミクス解析において活性化している代謝経路が全く異なることを確認している。

質問 21) BRD4 は核内蛋白質であるが、JQ1 は核膜を通過する化合物と考えて良いか。

(回答) 本研究で実際に検証はできていないが JQ1 の BRD4 への既知の作用機序から、核膜を通過すると考えている。

質問 22) Western blot 法では核内だけで無く、細胞質を含めた total の BRD4 蛋白発現をみているのか。また TCGA データベースの mRNA も核内だけで無く細胞質を含めた total の発現をみているのか。

(回答) Western blot における蛋白および TCGA データベースにおける mRNA ともに total の BRD4 発現をみている。

BRD4 の細胞内局在や動態は重要と思われる今後、核分画のみの Western blot や免疫蛍光細胞染色などで確認したい。

質問 23) BRD4 の癌遺伝子的機能と p53 との関連は何かあるのか。

(回答) 知りうる限りでは p53 との関連を論じた報告はなく、本研究でも検証していないため、今後検討したい。

質問 24) 遊走能、浸潤能アッセイを行う際に JQ1 による cell viability への影響を考慮したか。

(回答) 遊走、浸潤アッセイを行う際には cell viability の影響がでないように条件を設定して行った。例えば、遊走能アッセイでは細胞培養プレートに過密集に近い状態まで培養した後に JQ1 を添加し、増殖能抑制の影響が可能な限りでないように条件設定を行った。

質問 25) SU-R-786-o の Xenograft アッセイで vehicle 群の腫瘍体積が plateau の時期があるが、何か理由があるのか。

(回答) 十分な検証はできていないが、Xenograft 作成のための細胞懸濁液を注射して間もない初期に、皮下の炎症性変化を腫瘍サイズとして測定した影響で、結果的に観察初期の腫瘍体積変化が plateau になった可能性がある。

質問 26) JQ1 の遊走・浸潤能抑制に関与する代表的な分子としてそれぞれどのようなものを想定しているか。

(回答) ARHGAP22 が外部環境に応じて癌細胞のアメーバ様遊走を活性化する機能が報告されており遊走能に関わる代表的な分子と想定している。また本研究では十分な解析を行わなかったが、COL13A1 が代表的な ECM として膀胱癌等において癌細胞の浸潤に関与する報告があることから、浸潤能に関わる代表的な分子と想定している。

質問 27) スニチニブへの耐性化の克服までは明らかとなっていないが、JQ1 とスニチニブとの併用は考えているか。

(回答) 本研究ではスニチニブ耐性化の克服までは証明することができていない。そのため、今後、スニチニブと JQ1 の併用により、スニチニブへの耐性化が抑制されるかどうか今後、動物実験等で検証したいと考えている。

質問 28) Xenograft アッセイでは、JQ1 の投与はどのタイミングで開始しているか。

(回答) Xenograft 作成のために細胞懸濁液をマウスの背部皮下に注入した翌日から投与を開始している。

質問 29) JQ1 の投与は Xenograft の生着を大きく阻害することはなかったと考えて良いか。

(回答) SU-R-786-o、786-o いずれも JQ1 投与群でも腫瘍は生着したため、生着への阻害作用は少ないと考えている。

質問 30) スニチニブとの併用のみならず、他の作用機序の抗癌剤と JQ1 の併用療法も有望である可能性があるか。

(回答) 悪性中皮腫でのシスプラチンと JQ1 の併用、膀胱癌での HDAC 阻害剤と JQ1 の併用など、スニチニブ以外の薬剤との併用療法の有効性を示す報告も認められ、他剤との併用療法も有望である可能性は十分あると考えている。

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。