

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 503 号	学位申請者	齋藤 嘉信
審査委員	主査	中川 昌之	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 堀内 正久
	副査	佐藤 雅美	副査 河原 康一
<p>主査および副査の5名は、平成31年2月19日、学位申請者 齋藤 嘉信 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) UBE6T15を間葉系幹細胞のコントロール細胞として使用した理由は何か。</p> <p>(回答) UPSの起源はよくわかっていないが、本研究に使用した細胞株では間葉系細胞マーカーであるビメンチンが陽性であり、また一般的にもUPSは間葉系細胞由来の腫瘍と考えられている。当教室で以前使用されたことがある間葉系幹細胞株としてUBE6T15を保存してあったため本研究においてコントロールとして使用した。</p> <p>質問2) GBS-1細胞株をxenograft modelに選択した理由は何か。</p> <p>(回答) 動物保護の観点からin vivo実験における細胞株は一種類のみを使用した。in vitro実験において細胞株をアルファベット順に並べており、他の細胞株を選択する理由がなかったため一番初めにくるGBS-1を使用した。論文のreviseの際、査読者よりp53 nullであるNara-H細胞を使用した際の反応性の違いを調べるよう要求されたため同細胞株を使用した動物実験も行ったが、結果は同等であった。</p> <p>質問3) MAPK経路、Wnt β-catenin経路以外でFOSL1を制御するメカニズムは報告されているか。</p> <p>(回答) アセチル化クロマチンリーダーであるBETファミリーに含まれるBRD4を阻害するJQ-1はその下流の標的遺伝子であるFOSL1の発現を減少させることが報告されている。これよりFOSL1の発現制御はクロマチンのアセチル化により制御されている可能性があるが、HDAC阻害剤ではアセチル化を増加させることで遺伝子発現を増加させるのに対し、JQ-1はアセチル化のリーダーを阻害することで遺伝子発現を減少させるという逆のメカニズムをとる可能性がある。FOSL1の制御がダイレクトなクロマチンのアセチル化によるものであるか、発現変動した転写因子によるものかを判断するためにはさらなる検討が必要と考える。</p> <p>質問4) 近年エピジェネティックなメカニズムでmicro RNAなどのいわゆるnon-coding RNAを制御しているという報告があるが、本研究ではmicro RNAについての検討は行ったか。</p> <p>(回答) 本研究ではmicro RNAについての検討は行っていない。</p> <p>質問5) HDAC阻害剤のresponder, non-responderについてバイオマーカーとなる遺伝子の検討は行ったか。</p> <p>(回答) HR23Bの発現がHDAC阻害剤の感受性と相関することが報告されている。本研究においてはHR23Bの発現については検討していないが、軟部肉腫においてHR23Bは12.5%の症例で発現が亢進しているとされ、臨床的にHDAC阻害剤反応性の腫瘍も多くはないが存在すると思われる。</p> <p>質問6) p53とp21がindependentに挙動することは、珍しいことではないのか。</p> <p>(回答) HDAC阻害剤を投与することで、p53が上昇、結果としてp21が上昇しG1細胞周期停止を起こすという流れが古典的なHDAC阻害剤の作用メカニズムであったが、trichostatin A(TSA)やvorinostat(SAHA)の誘導体をはじめとした数多くの新規HDAC阻害剤が導入されるにつれ、そのような現象が一般的でないことが明らかになった。細胞株、薬剤により異なるが、p21とp53がパラレルに動かないという現象は近年数多く報告されている。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問7) 今回生じた現象は LBH589 特有のものであるのか、それとも他の HDAC 阻害剤においても生じるのか。

(回答) 今回他の HDAC 阻害剤を使用した検討は行っておらず、他の薬剤でも同様の現象が生じるかどうかについては不明である。しかしながら神経芽細胞腫に対し SAHA, TSA 処理を行うことで Fra-1 及び転写因子 AP-1 を形成する際のパートナーとなる *c-Jun* の発現を生じさせ増殖能を低下させることが報告されており、本研究によって観察された現象は他の腫瘍においても同様に観察される可能性があることを示唆するものである。

質問8) p21 の knockdown や、*FOSL1* の過剰発現は HDAC 阻害剤の有効性を変化させるか。

(回答) 本研究においては評価していないが、他の細胞株において p21 の knockdown や *FOSL1* の過剰発現が腫瘍細胞の HDAC 感受性を低下させるということは報告されている。

質問9) 本検討において LBH589 を使用した理由は何か。

(回答) HDAC 阻害剤は一般的に血液腫瘍に対しての有効性は高いが、固形腫瘍に対しての単剤での使用成績は不良であるという報告が多い。血液腫瘍と軟部肉腫との共通点として、染色体の転座により生じた融合遺伝子を持つものがあるという点がある。HDAC は血液腫瘍において融合遺伝子と複合体を形成することにより分化関連遺伝子の抑制を行うことが報告されている。UPS においても融合遺伝子の発現が報告されており、これが本検討において HDAC 阻害剤である LBH589 を使用した理由である。

質問10) RT-PCR で β actin, western blot で tubulin をコントロールに使用している理由は何か。

当教室で慣例的に行われていたため、同 housekeeping gene を選択した。今後は揃えて行うことを検討する。

質問11) 増殖能に対する有意差検定は 72 時間のみで行っているのか。またどのような統計学的な検定を行ったか。

(回答) データはノンパラメトリックなデータであったので、Kruskal-Wallis 検定を行った後に post hoc 検定として Steel 法を行った。

質問12) LBH589 はどのように代謝されるのか。また、代謝物が活性を持つプロドラッグではないのか。

(回答) 代謝は CYP3A4 で行われると報告されており、またプロドラッグではなく LBH589 自体が抗腫瘍活性を持っていると報告されている。

質問13) p53 のアセチル化はどのような機序で生じるか。

(回答) HDAC はヒストン以外のいわゆる非ヒストンタンパク質のアセチル化も行うことが知られており、p53 もこの基質に含まれる。その他の報告では、p53 は紫外線や γ 線などの物理刺激のほか、細胞ストレスに対して histone acetyltransferase である p300/CBP, PCAF, TIP60, hMOF などのタンパク質が活性化することによりアセチル化されると報告されている。

質問14) early apoptosis と late apoptosis を分ける意義はあるのか。

(回答) 現象論として、細胞膜中のホスファチジルセリンは通常フリッパーゼの作用により細胞質側に分布するが、アポトーシスが生じることによりフリッパーゼが作用しなくなり、ホスファチジルセリンは細胞外側に分布するようになる。このような状態が early apoptosis の状態であり Annexin V はこのホスファチジルセリンに結合することにより early apoptosis を検出する。アポトーシスの進行に伴い細胞膜、核膜が断片化し DNA が露出することでこれに intercalate する 7-AAD が結合可能となる。これが late apoptosis の状態である。これらに分けることに臨床的な意義はないと考えるが、細胞がアポトーシスを生じる段階の形態学的変化を表しているものとする。

質問15) ヒトにおける投与経路は経口であるが、なぜ今回腹腔内投与を行ったのか。

(回答) 過去の in vivo 研究の報告において、腹腔内投与で行ったものが多かったこと、投与の簡便さ等を考慮して本研究では同投与経路を選択した。

質問16) LBH589 の血中半減期はどのくらいか。また副作用は何か。

添付文書上は初回投与時で 15.4 ± 2.3 時間となっている。50% で血小板減少、下痢、26% 程度で貧血、1% 程度で心毒性 (QT 延長) が報告されている。

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。