

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 520 号	学位申請者	杉田 智
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 武田 泰生
	副査	堀内 正久	副査 速見 浩士
<p>主査および副査の5名は、令和元年6月19日、学位申請者 杉田 智 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) HIF1<math>\alpha</math>の RT-qPCR について、一般的に HIF-1<math>\alpha</math>の発現制御はユビキチン-プロテアソーム系による HIF-1<math>\alpha</math>の分解によるとされているが、本論文では HIF-1<math>\alpha</math>の mRNA の発現にて評価されている。RAS による HIF-1<math>\alpha</math>の発現制御は転写制御によるものと考えてよいか。</p> <p>(回答) Salirasib が HIF-1<math>\alpha</math>の発現を低下させるという報告が2つあり、その機序の考察として1つはユビキチン-プロテアソーム系によるもの、もう一つは不明であるとされていた (Blum R <i>et al.</i> Cancer Research 2005, Hamciri-Grossman M <i>et al.</i> Oncotarget 2015)。本研究ではタンパク発現解析に加えて mRNA レベルでの発現解析も行った。</p> <p>質問2) Salirasib 処理にて T24, BOY 細胞にダイナミックな metabolic reprogramming が観察されているが、双方の細胞において Warburg 効果 (好氣的解糖) は増強、減弱のどちらの方向にシフトしたのか。</p> <p>(回答) Salirasib 処理した群において GAPDH などの解糖系に関わるタンパクが有意に低下しており (Table2)、Warburg 効果は減弱の方向にシフトしたと推測される。</p> <p>質問3) HRAS をほぼ完全に knockdown しても、T24, BOY 細胞の増殖、遊走、浸潤活性はある程度残っている。T24 細胞における HRAS G12V 以外の変異を有するか。BOY 細胞における変異は知られているか。</p> <p>(回答) T24 細胞は HRAS 変異以外に p53 や TERT (Telomere Reverse Transcriptase)の変異を有すると報告されている。BOY 細胞が有する mutation は分かっていない。</p> <p>質問4) 100<math>\mu</math>M の Salirasib 処理にて cell viability は10%程度にまで低下しているにも関わらず、cell migration 活性は50%程度残っている。この解離をどの様に考察するか。</p> <p>(回答) 細胞増殖能実験は Salirasib 処理 72 時間後の評価で、遊走能実験は 48 時間後の評価であり、処理条件の違いが影響した可能性がある。</p> <p>質問5) Xenograft model の実験に何故 HRAS 変異を有する T24 細胞を用いずに BOY 細胞を用いたのか。</p> <p>(回答) T24 細胞は Xenograft model の実験に向かない細胞とされている。今回の研究でも T24 細胞用いて Xenograft model の実験を試みたが生着しなかったため BOY 細胞を用いた。</p> <p>質問6) Salirasib が in vitro の実験で抗腫瘍効果を示したが in vivo の実験で抗腫瘍効果を示さなかった理由は何か。</p> <p>(回答) 明らかな原因は分からないが、in vitro に抗腫瘍効果を発揮するのに高濃度の Salirasib が必要であったため、in vivo で使用した量では抗腫瘍効果を発揮する十分な濃度が得られなかった可能性がある。</p> <p>質問7) T24 細胞と BOY 細胞の表現型の違いはあるか。</p> <p>(回答) 形態学的に若干の違いがあるが、T24 細胞、BOY 細胞ともに強い増殖、遊走、浸潤能を有する細胞株である。</p> <p>質問8) RAS の活性化のメカニズムは何か。</p> <p>(回答) 正常な状態では不活性型 GDP 結合 RAS は GEF (guanine nucleotide exchange factor) によって活性型の GTP 結合 RAS となり、GAP (GTPase-activating protein) の作用により自らの GTPase 活性で不活性型に戻る。変異型 RAS では GTPase が不活化しているため常時活性型となる。</p> <p>質問9) HIF-1<math>\alpha</math>とがん化の関係はどのように考えるか。</p> <p>(回答) HIF-1<math>\alpha</math>の高発現が乳癌や前立腺癌の癌化に関わるとの報告がある。</p> <p>質問10) Salirasib の RAS 阻害以外の作用機序があるか。</p> <p>(回答) Salirasib の作用機序はファルネシル化阻害であり選択的に RAS の活性化を阻害すると思われるが、細胞増殖能実験では Salirasib と HRAS knockdown では差異があるように思われ RAS 阻害以外の作用機序がある可能性はある。</p> <p>質問11) 化学物質によっておこる膀胱癌において RAS mutation の違いはあるか。</p>			

(回答) 化学物質による膀胱癌と RAS mutation の関係は分かっていない。

質問 1 2) 膀胱癌の性差はあるか。

(回答) 膀胱癌は男性に多く、罹患数は女性の 3 倍以上である。

質問 1 3) RT-qPCR の cDNA の作成の項における「各遺伝子の random RT-primer」とはどういう意味か。

(回答) 指摘のように「各遺伝子の」を削除し「random RT-primer を使用し cDNA を作成した。」とすべきである。

質問 1 4) Bonferroni-adjusted Mann-Whitney U 検定とはどのような検定法か。

(回答) 多重比較における有意水準  $\alpha$  エラーを少なくするために、有意水準を調整しておこなう検定方法である。

質問 1 5) RAS は阻害剤の開発が難しいとされている理由と Salirasib の阻害作用の機序は何か。

(回答) RAS は酵素の不活性型の変異体である、GTP への親和性が高い、蛋白質表面に疎水的な深いくぼみがないなどの理由で undruggable と表現され、阻害剤の開発が難しい理由とされている。Salirasib の作用機序は RAS の機能発現に必要な C 末端のファルネシル化阻害である。

質問 1 6) RAS mutation においてホモ接合、ヘテロ接合の表現型への影響はあるか。

(回答) RAS 変異は優性変異であると考えられ、ホモ接合、ヘテロ接合でも RAS は常に活性化された状態となりがん化に影響すると思われる。

質問 1 7) 膀胱癌の早期発見のためにはどのような社会的な仕組みが必要か。

(回答) 膀胱癌の診断ツールとして尿細胞診が使われている。浸潤性や異型度の高い癌では 80~90% の感度であるが、異型度の低い癌の感度は 30~50% と低い。我々は尿中マイクロ RNA を測定することで非侵襲的かつ感度・特異度ともに優れた腫瘍マーカーの開発に着手している。早期発見のため尿細胞診より感度の高い診断ツールが検診などに組み込まれることが必要と思われる。

質問 1 8) 臨床検体で HRAS 変異の評価は可能か。それによって治療方針を決定するようなことが可能になるか。

(回答) 臨床検体で HRAS 変異の評価は可能である。現時点で HRAS 変異と膀胱癌の臨床所見との関連は不明であるが、将来的に他の癌種のように HRAS 変異の情報が治療方針の決定等に影響を及ぼすようになる可能性はある。

質問 1 9) HRAS の発現の高低が、生存期間や悪性度といった臨床所見にどう影響するか。

(回答) 膀胱癌患者のある一定の確率で HRAS 変異があるとの報告はあるが、HRAS の変位の有無や HRAS 発現が生生存期間などの臨床病理学的所見と相関するという報告はない。

質問 2 0) XTT 解析とはどのような解析か。

(回答) 細胞にテトラゾリウム的一种である XTT 試薬を添加すると細胞の還元反応により橙色のフォルマザン色素が形成される。それを吸光度測定により定量化し生存率が評価できる。

質問 2 1) Salirasib は DMSO で溶解されている。DMSO 自体に細胞障害性があるが、実験への影響はどう考えるか。

(回答) Salirasib は添付文書にしたがって 0.1% DMSO で溶解した。また 0.1% DMSO での細胞への影響は見られなかった。実験については mock には DMSO を添加しており、その影響を考慮して実験している。

質問 2 2) iMPAQT はどの点が新しい技術なのか。今後プロテオーム解析を使った実験系が主流となってくるか。

(回答) iMPAQT は従来のターゲットプロテオミクスの一度に多数の定量的タンパク解析ができないという弱点を克服した技術である。現在普及している RNA-seq などのトランスクリプトーム解析よりプロテオーム解析の方がより細胞の表現型に近い解析である。今後プロテオーム解析が普及し、プロテオーム、トランスクリプトームともに解析できるようになると相補的な情報が得られ有用と考える。

質問 2 3) Salirasib は Rho kinase family などの他の GTP 結合タンパクへの影響はあるか。

(回答) Ras はファルネシル化を受けるのに対し、Rho kinase family などの多くの GTP 結合タンパクはグラニル化を受けて、細胞膜へ移行し活性化される。Salirasib の作用機序はファルネシル化の阻害であり、Rho kinase family への影響はないと思われる。

質問 2 4) 論文の Table に示されている ND は何を示すのか。

(回答) Salirasib 処理群において発現が減少したタンパクのうち Salirasib 処理群で検出限界以下のものを ND (not detectable (set as 0)) とした。

質問 2 5) RAS の下流には MAPK や AKT 経路などが知られているが、なぜ HIF1 $\alpha$  に注目したのか。

(回答) RAS が HIF1 $\alpha$  の高発現を介して癌代謝リプログラミングに関わるという報告があり HIF1 $\alpha$  に注目した。

質問 2 6) MAPK 経路の不活化については評価したか？

(回答) 今回の MAPK 経路の不活化については評価していない。RAS の下流の不活化については今後評価したい。

質問 2 7) プロテオーム解析では酸化的リン酸化、解糖系ともに抑制した結果だったが、予想していた結果だったか？

(回答) 解糖系の抑制を予想していたが、酸化的リン酸化については予想していなかった。

質問 2 8) 乳酸や ATP は実験室レベルでの測定が可能だが評価したか。

(回答) 代謝の解析において重要であり、乳酸や ATP についても今後評価したい。

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。