

## 最終試験の結果の要旨

|      |            |       |       |               |
|------|------------|-------|-------|---------------|
| 報告番号 | 総研第 1520 号 |       | 学位申請者 | 大迫 洋一         |
| 審査委員 | 主査         | 橋口 照人 | 学位    | 博士 (医学 歯学・学術) |
|      | 副査         | 古川 龍彦 | 副査    | 武田 泰生         |
|      | 副査         | 谷口 昇  | 副査    | 速見 浩士         |

主査および副査の5名は、令和元年8月29日、学位申請者 大迫 洋一 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) Fig.1 B, E で sunitinib を使用した患者と使用していない患者で miR の発現の違いは検討しているか。

(回答) TCGA データベースでは実際には sunitinib が投与された患者は存在すると思うが、それが抽出できないため解析不能である。sunitinib 投与群と非投与群のデータが公開されれば、さらに詳しい解析が可能であると考えられる。自験例での解析では、殆どの症例が sunitinib 投与前に手術を行ったものである。sunitinib 投与は通常は転移を有する腎癌に対して行われるため、生検による耐性腎癌検体は倫理的問題から取得が困難である。

質問 2) TCGA データベースでは、年代が古い症例では sunitinib 投与の症例は少ないと考えられるか。

(回答) sunitinib が米国で承認された 2006 年以降は、投与患者が増えていることが予想される。TCGA データベースで病理学的診断と診断時の年次が抽出可能な腎癌患者のデータは 537 例あり、その中で sunitinib 投与の可能性のある M1 か N1 の患者データは 91 例あった。この中で診断時の年次が 2006 年以降である、34 例については sunitinib の積極的な使用が予想される。

質問 3) 行われた治療法に関する情報は TCGA の database には入っていないか。

(回答) 抽出可能な TCGA データの中に治療法についての検討は含まれていない。

質問 4) Fig.1 B は median で分けているが、別の方法で分けたら違う pattern になるのではないか。

(回答) 本論文中では oncolnc データベース上の 506 例の TCGA コホートの結果を記載している。TCGA データベースで我々が抽出可能な 232 例のコホートでは miR-99a-3p の発現を median で分けた場合は発現が高い群が有意差をもって OS (overall survival) を延長させた ( $p=0.0467$ )。また z-score で発現高値群を  $n=119$ 、低発現群を  $n=113$  例で分けた場合でも、 $p=0.0485$  と有意差があった。TCGA の 506 例の患者データが全て入手できれば、median では有意差はなかったものの z-score では有意差が得られる可能性がある。

質問 5) Didox の RRM2 への阻害はどのような作用機構か。

(回答) Didox は過去の報告でフリーラジカル消去および鉄キレート化特性によりリボヌクレオチドレダクターゼを不安定化することによりその活性を発揮するとされる。

質問 6) RRM2 は多量体で機能する酵素だが、RRM2 が高いとき、RRM1 の発現はどうなっているか。

(回答) 本実験では RNA level でも蛋白 level でも RRM2 と RRM1 の発現の比較実験は行っていない。過去の報告では急性白血病患者の白血病芽球細胞において RRM1 と RRM2 の発現に有意な相関があるという報告がある一方、非小細胞性肺癌では RRM1 と RRM2 の発現レベルに有意な相関はなかったとする報告もあり、一定の見解は得られていない。腎癌については TCGA データベース上で RRM1 と RRM2 の発現解析が共に得られた 273 例について検討したところ有意な正の相関が認められた ( $p<0.0001$ ,  $R=0.3$ )。スニチニブ耐性腎癌については今後の検討課題としたい。

質問 7) RRM2 を高発現したときに、sunitinib に耐性になるかという検討はおこなったか。

(回答) RRM2 が sunitinib 耐性化に関与しているかを示す実験は行っていない。今後、RRM2 を強制発現させた細胞株を用いて sunitinib 耐性化が得られるか動物実験で検証したい。

質問 8) sunitinib 耐性とこの miR-99a-3p の関係はどう理解しているか。

(回答) miR-99a-3p は、sunitinib 投与で発現が変化した miR の中から抽出したもので、sunitinib 耐性株に transfection することで IC50 が下がったという結果を *in vitro* で確認した。本実験では miR-99a-3p が RRM2 を制御することにより sunitinib 耐性に関与している可能性を示したが、他の機序があるかどうかを今後の実験で検証したい。

質問 9) Fig. 1A で miR-1-3p は miR-99a-3p よりもさらに増殖能を抑制しているがなぜ miR-99a-3p に注目したのか。また 786-o 株と SUR-786-o 株と比較した場合に SUR-786-o 株で増殖抑制効果が高いものを選択するべきではないのか。

(回答) TCGA データベースに基づく解析で miR-99a-3p の発現は生存期間に寄与していたこと、また miR-99a-3p は transfection により 786-o 株と比較して SU-R-786-o 株の方で更に増殖能を抑制することを認めたため候補として選択した。

質問 10) Fig. 1C で A498 株に関しては miR-99a-3p の発現がむしろ control より高い。この細胞株も論文によると human の RCC の株だということだがどう解釈しているか。

(回答) 十分な検証はできていないが、A498 株は他の腎癌細胞株と異なり VHL 遺伝子の deletion (c.426\_429delTTGAC/c.425\_429delTTGAC) が報告されている。腎癌は遺伝子解析でいくつものバリエーションが報告されているため miR-99a-3p の発現が上昇している細胞株はあり得ることである。

質問 11) Fig. 2B で apoptotic cell は、786-o 株に比べて SUR-786-o 株の方が有意に上がっているように見えるが有意差はあるか。

(回答) 今回の論文では 786-o 株と SUR-786-o 株のそれぞれの transfectant 間での直接比較でアポトーシス誘導の有意差は示さなかったが、指摘に従って検証したところ SU-R-786-o 株では 786-o 株より有意差をもって apoptosis が強く誘導されることがわかった。

## 最終試験の結果の要旨

質問 12) この実験では *miR-99a-3p* が 786-o 株に比べて SU-R-786-o 株で低いから、細胞株に導入することで、apoptosis をより誘導するという考察は行っていないのか。

(回答) 再検証したところ SU-R-786-o 株では 786-o 株より有意差をもって apoptosis が強く誘導されることがわかった。指摘のような考察は十分に考えられる。

質問 13) Fig3 で *RRM2* を候補遺伝子として挙げているが、このタンパクに関しては、発現はどこで、どの組織・臓器で発現するか、もしくは ubiquitous に発現するものなのか、あるいは癌で特異的な発現するものなのか。

(回答) The Human Protein Atlas データベースによると、*RRM2* 蛋白は細胞内では細胞質基質に ubiquitous に存在することが示されている。また癌で特異的に発現を認めるものではなく、正常臓器でも発現を認め、臓器別では消化管、腎、膀胱、精巣、膵、骨髄、リンパ組織で発現が高い。一方、脳や内分泌組織、肺、肝、脾、筋組織、脂肪組織では発現が低い。

質問 14) Fig. 4A の *RRM2* の発現は 786-o 株と SU-R-786-o 株の比較では、統計学的な検討はしていないか。

(回答) *miR-99a-3p* を transfection することで 786-o 株と SU-R-786-o 株の *RRM2* の発現量に有意差があるか再検証おこなったが有意差はなかった。*RRM2* の制御が *miR-99a-3p* 以外にも存在する可能性があり今後検証したいと考える。

質問 15) discussion で他の癌で *RRM2* が関与するような cascade を挙げているが、腎癌においては特異的な cascade はあるのか。

(回答) 今回の実験では *miR-99a-3p/RRM2* の下流における pathway の検討は行っていない。また、過去の報告でも腎癌における *RRM2* の詳細な解析の報告はない。一方、腎癌において、sunitinib を含めた TKI (tyrosine kinase inhibitor) の耐性について HIF が関与することは以前より報告されている。その為、本文 discussion でも挙げた過去の子宮頸癌の報告にあるような *RRM2* から HIF を制御する pathway が腎癌においても認める可能性はある。*miR-99a-3p/RRM2* が関与する腎癌特異的な cascade の解析と合わせて今後のさらなる検討課題としたい。

質問 16) この sunitinib 耐性株はどの程度の耐性になっているのか。例えば 1000 倍耐性になっているとか。

(回答) *in vivo* で作成した sunitinib 耐性株を初代培養して *in vitro* で耐性を確認している。具体的には sunitinib を 0 $\mu$ M、0.6 $\mu$ M、1.3 $\mu$ M、2.5 $\mu$ M、5 $\mu$ M、10 $\mu$ M の濃度となるように 786-o 株と SU-R-786-o 株にそれぞれ添加して、2.5 $\mu$ M 以上の濃度で生存率に有意差を認めた。786-o 株の sunitinib の IC50 が 1.38 $\mu$ M であるのに対して、SU-R-786-o は 3.04 $\mu$ M であり、約 2.2 倍の耐性であった。

質問 17) この耐性株は何回ぐらい耐性化を確認したか。

(回答) sunitinib 耐性株を *in vivo* で作成後、それを初代培養し *in vitro* で耐性を確認した後に、再度 mouse に皮下注射し sunitinib を投与し、耐性化の維持を確認している。当教室の過去の報告でも、786-o 株に比べてこの耐性株は metabolomics 解析で活性化している代謝経路が全く異なるという確認も行っている。

質問 18) 実際に親株で *RRM2* を抑えると apoptosis を起こすが、耐性株でも殆ど同じメカニズムでより強く *RRM2* が発現しているから耐性化しているというふうに解釈をしているのか。

(回答) 本実験では *RRM2* が耐性化に直接関与するかどうかの詳細な解析は行っていない。*RRM2* を強制発現することでより sunitinib 耐性化が進むかどうかを今後、動物実験で確認するなどさらなる検討を行っていききたい。

質問 19) 例えば *VEGFR* の発現の状況が変わるとかは調べたか。

(回答) 本実験では *RRM2* の下流の pathway の解析、検討は行っていない。今後の検討課題と考える。

質問 20) Fig. 1C で *miR-99a-3p* 発現が normal に比べて 786-o 株と SU-R-786-o 株の発現はかなり低いのがこれについてはどう考えるか。

(回答) 御指摘のようにこれだけ発現が低い miR の機能について検討することについては議論が別れるところと考える。今後は比較的 *miR-99a-3p* の発現が高い Caki1 株などその他の腎癌細胞株でも機能解析を検討したいと考える。

質問 21) Fig. 1C 右側の図で確かに耐性化すると *miR-99a-3p* がほぼゼロに落ちているがこの差を重視しているのか。

(回答) 御指摘のように *miR-99a-3p* の発現が非常に低いレベルで比較であるため、この有意差が重要な意義を持つのかは議論があるところだと思う。今回は 1 つの細胞株の sunitinib 耐性株を使用した解析なので、例えば正常腎細胞より *miR-99a-3p* の発現が高かった A498 株、また比較的発現の高い Caki1 株で、sunitinib 耐性株において親株より *miR-99a-3p* の発現が低いことを示せば、意義のある結果と言えると思う。さらなる検討をおこないたい。

質問 22) 正常細胞での *miR-99a-3p* の発現は組織特異性があるのか。

(回答) 大規模ゲノムワイド関連解析手法と *in silico* スクリーニング解析により、ヒトにおいて複数種の miR の組織特異性が過去の論文で示されているが、今回の *miR-99a-3p* については調べる限り見いだせなかった。

質問 23) *miR-99a-3p* の source についての検討は。例えばどういう遺伝子から出てくるのか。どういう状況で正常 level が維持されて、また癌化の際には低下する、どういう機構で癌化と関係しているのかの検討は行っているのか。

(回答) 今回の実験では *miR-99a-3p* のホスト遺伝子 (*LINC00478*) の発現は確認していないが、*miR-99a-3p* と同じ領域にコードされているのでホスト遺伝子も発現低下している可能性があると考え。本文でも挙げているようにプロモーター領域のメチル化や脱アセチル化により *miR-99a-3p* の発現が制御されている可能性はあると考えるが、今回は検証できていないので今後検討したい。

質問 24) Fig. 5 で cleaved PARP の発現上昇が示されている。*RRM2* を抑制してしまうと分裂が止まることが予想されるが、それとここで示されている apoptosis への signal はどういう流れでつながっているのか。分裂が止まれば apoptosis が誘導されるのか。

(回答) 今回の実験では 786-o 株については *RRM2* をノックダウンすることで S-phase arrest を示しているが、SU-R-786-o 株では G0/G1 phase arrest を誘導した。これらの細胞間で異なる cell cycle arrest と apoptosis との間の signal についての解析は本実験では検討できていない。Cell cycle arrest が誘導された細胞の中で DNA 損傷修復が不可能な場合は結果的に apoptosis に至る細胞も含まれると考えるが、今回の実験では cell cycle arrest は細胞間で異なる結果となっており、また有意差は示したがその差も比較的軽微であるため、cell cycle arrest による影響というよりは他の経路からの apoptosis 誘導の影響が大きいと考えている。

質問 25) *miR-99a-3p* は腎細胞癌に特異的なのか。他の癌腫でも *RRM2* との関連の報告があるか。

(回答) *miR-99a-3p* は過去に大腸癌や前立腺癌でも正常細胞に比べて発現低下を示した報告がある。しかし *miR-99a-3p* と *RRM2* との関連を示した報告は全ての癌腫で本報告が初めてである。

質問 26) 今回の実験では passenger strand に注目しているが *RRM2* に *miR-99a* guide 鎖も両方関わっているか。

(回答) 本実験では guide 鎖である *miR-99a-5p* が今回の *RRM2* を制御しているかについては解析実験は行っていない。

TargetScan Human 7.1 で *miR-99a-5p* を検索したところ、候補遺伝子として *RRM2* は挙がってこなかった。このことは guide 鎖は *RRM2* 制御に関与していないことを予想させる。

質問 27) 論文の中で採った組織を RNA later に保存しているが、なぜ RNA later を使用するのか。

(回答) 採取した組織をすぐに凍結保存することが難しい為、RNA later を用いて保存している。RNA later は水性・非毒性の組織保存用試薬で、非凍結サンプル中の細胞性 RNA を in situ で安定化させ、保護する。組織中の RNA を 37 度で 1 日、25 度で 1 週間、4 度で 1 か月以上保存できる。また -20 度または -80 度で長期間保存可能となる。

質問 28) これはつまり抽出しやすくするのか。それとも保存するためのものか。

(回答) RNA の質および量を損なわずに長期間保存が可能と考える。

質問 29) apoptosis assay では apoptotic cell と early apoptotic cell という 2 つがあるが、これはどうやって見分けているのか。

(回答) apoptosis が起こると細胞膜内層に存在するフォスファチジルセリンが細胞表面に出てくるためアネキシン V に染色され、Figure での R2, R4 の細胞集団となる。さらに後期 apoptosis では細胞膜構造が崩壊し核が PI に染まるため R2 の細胞集団となる。

質問 30) これは flow-cytometer でみているのか

(回答) 核酸導入 72 時間後に Annexin V, プロピディウムイオダイド(PI)で細胞を染色し、アポトーシス細胞数を Flowcytometer (CyAn ADP analyser) を用いて計測している。

質問 31) 今回の実験で、増殖抑制が示されているが、mTOR 阻害剤の耐性株で示されているなら理解ができるが、主に血管新生を抑制する sunitinib に対する耐性株で、今回の実験で増殖抑制を抑制したところはどう理解しているか。

(回答) sunitinib はマルチキナーゼ阻害剤であり、血管新生以外にも腫瘍増殖に関与する PDGFR(platelet derived growth factor) や、KIT(KIT proto-oncogene), CSF-1R(colony stimulating factor 1 receptor), FLT-3(fms related tyrosine kinase 3)ならびに RET(ret proto-oncogene)も標的としていることが示されている。その為、今回の結果は血管新生の抑制では無くそれ以外の分子の抑制によるものと考えられる。

質問 32) この sunitinib 耐性で発現が低下している *miR-99a-3p* は、その他の TK inhibitor の sorafenib, axitinib の耐性株でも抑制されている可能性はあると考えるか。

(回答) 今回の実験ではその他の TKI に対する耐性株での検討はできていないが、今回の SU-R-786-o 株が交差耐性をもつかどうかを含めて今後の検討課題としたい。

質問 33) この論文では増殖能、apoptosis、コロニー形成能を調べているが、遊走能や浸潤能は確認されているのか?

(回答) 本実験では遊走能・浸潤能に関して検討を行っていないが、遊走、浸潤に対しても作用する可能性があるか今後確認したい。

質問 34) sunitinib の作用機序を考えた上で、作用機序のどこに、どのように作用して *miR-99a-3p* の腫瘍抑制効果が得られるのか。

(回答) 今回の実験では *miR-99a-3p/RRM2* のさらに下流については解析できていない。可能性としては *RRM2* が *HIF* から *VEGFR* を発現亢進させるといった報告が子宮頸癌であるので *RRM2* の発現亢進により sunitinib の標的である *VEGFR* が発現上昇し sunitinib の耐性化に関与していると考えている。

質問 35) *RRM2* の関わっている作用・細胞の中での役割と、*VEGF* の signal が、どこかで cross talk しているということか。

(回答) 本実験で確認は行えていないが、今後検討したいと考えている。

質問 36) XTT assay と、colony formation assay、これは本質的には何が異なるか。

(回答) XTT assay は細胞増殖能をみていて、colony formation は colony 形成能を確認することで悪性形質転換した細胞を in vitro で測定できると考えている。

質問 37) *miR-99a-3p* を transfection することによって sunitinib 耐性の細胞株の sunitinib に対する感受性が restore されたということをもってこの miR が tumor suppressor の character、作用・機能を持つものというふうに結びつけて良いと考えるか。

(回答) 本実験では *miR-99a-3p* を transfection することで、sunitinib の IC50 が下がったため、sunitinib 耐性化に *miR-99a-3p* の発現が関与している可能性が示せたと考えている。しかし、今回の実験は in vitro のみであり、また用いた細胞は 1 種類のみである。更に裏実験も行っていないため、今後はこれらの実験にて検証したい。

質問 38) sunitinib 耐性化と metabolic reprogramming というところはどのように整理しているか。

(回答) 過去の当科の論文で、SU-R-786-o 株と 786-o 株とをメタボロミクス解析で比較し、SU-R-786-o 株において代謝が解糖系から TCA サイクルへとシフトする代謝リプログラミングが示されている。

質問 39) *RRM2* が various oncogene による cellular transformation を enhance すると述べているがこれはどのような oncogene か。

(回答) 過去の報告で *RRM2* が *RAS* や *RAC* などの oncogene と協同して形質転換さらに悪性の可能性を決定する新規の腫瘍進行決定因子であることが示されている。

質問 40) Fig. 6 は *RRM2* inhibitor を細胞株に入れると、増殖能が落ちることを示しているが、こうならない理由が予想されるのか。(回答) 本実験では *RRM2* の発現が亢進している腎癌細胞株とスニチニブ耐性株のみを使用して実験をおこなっている。正常腎細胞においてもこの阻害剤を使用して、増殖能が低下しないことを示せたらより良い実験系であると考えている。今後検証したいと考える。

質問 41) Fig 3 で、Caki1 株は *RRM2* の mRNA の発現が非常に高いがこの細胞は sunitinib に対して耐性を示すか。

(回答) 動物実験でマウスに sunitinib を投与して Caki1 株に対する効果を見たが、やはり 786-o 株より縮小しにくい印象がある。また当初縮小しても、比較的早期に増大傾向が認められる印象から、可能性として Caki1 株は sunitinib の効果が得られにくい細胞株であることが考えられる。

質問 42) *miR-99a-3p* と *RRM2* この 2 つの因子を 786-o 株と SUR-786-o 株に強発現もしくは knockdown しても、この細胞間での結果というのは差が無かったということではいいか。

(回答) 今回の論文の中では 786-o 株と SU-R-786-o 株との間での直接比較は検証しなかった。再度検証をおこない、786-o 株と SU-R-786-o 株を比較したところ、*miR-99a-3p* の導入、また *RRM2* のノックアウトのどちらにおいても SU-R-786-o 株は有意に増殖能を抑制し、apoptosis を誘導した。Colony 形成については 786-o 株と SU-R-786-o 株で有意差は認めなかった。

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。