

学力確認の結果の要旨

報告番号	総論第 40 号	学位申請者	西澤 由紀彦
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査 河野 嘉文
	副査	中村 典史	副査 上野 真一

主査および副査の5名は、令和2年8月25日、学位申請者 西澤 由紀彦君に面接し、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) 5-Aza-CdR はメチル化修飾を解除するという認識でよいのか？

(回答) 5-Aza-CdR は DNA メチルトランスフェラーゼを阻害し、DNA のメチル化を解除する薬剤であるため、その認識でよいと考える。

質問2) 5-Aza-CdR は TP 以外のメチル化修飾には影響を与えないのか？

(回答) 具体的な検討はしていないが、影響は与えている可能性が高いと考えている。実際に、5-Aza-CdR が海外で適応を取得している骨髄異形成症候群においては、がん抑制遺伝子である p15 が高度にメチル化修飾を受けており、5-Aza-CdR がメチル化を解除することで抗腫瘍効果を示すことが報告されている。

質問3) 今回の発表で解明した Sp-1 結合サイトのメチル化は、5-FU の耐性メカニズムとしてありえるのか？

(回答) 耐性メカニズムとしての TP 遺伝子の Sp-1 結合サイトのメチル化の報告はないが、TP は 5-FU の代謝活性化を行う酵素であるため、可能性としてあり得ると考えている。

質問4) TP は悪性因子であるとの認識だが、増強させてもいいものなのか？

(回答) TP は血管新生因子であり、腫瘍のアポトーシスを抑制するといった報告もあり、悪性因子として知られている。その一方で、5-FU を活性化する因子でもあり、今回の検討のような 5-FU を用いる場合は誘導のメリットのほうが大きいと考えている。

質問5) 発表であった、MSP 法での検討を論文に掲載しなかったのはなぜか？

(回答) MSP 法では-1116 の Sp-1 結合サイトの検討を行っているが、ポイントミュレーションで-1116 サイトを欠損させた遺伝子を用いてルシフェラーゼアッセイでの検討を行った結果、当サイトは TP の発現への影響が少ないという結果が得られたため、論文に掲載しなかった。MSP 法自体は行えていたため、今後、他の2つのサイトのどちらが重要であるか検討を進めたいと考えている。

質問6) A549 の TP 酵素活性のデータを論文に掲載しなかったのはなぜか？

(回答) A549 の結果は KB3-1 細胞、yumoto 細胞の検討の2倍のタンパク質を添加して得られた結果であり、実験条件が異なるため論文に掲載しなかった。

質問7) 5-Aza-CdR は 500nM での検討だが、人体においてあり得る濃度なのか？

(回答) 5-Aza-CdR は海外では Decitabine という商品名で販売されており、その臨床試験より 20mg/m² を1日1回で使用した際に C_{max} は 147ng/mL との報告がある。この濃度は 644nM であり、当研究で使用した 500nM は、生体内でも十分あり得る濃度である。

質問8) ビダーザと 5-Aza-CdR はどう違うのか？

(回答) ビダーザ (5-azacytidine) は 5-Aza-CdR に対し、2位の酸素がある分子であるため、DNA のみでなく RNA にも取り込まれ、タンパク質障害での抗腫瘍効果も知られる薬剤である。本実験では脱メチル化作用をクリアに観察しなかったため 5-Aza-CdR を使用している。

質問8) *In vitro* での検討だが、臨床で実用するために何が障害となると考えているか？

(回答) 5-FU は血液がんでの適応が無く、一方 5-Aza-CdR は国外を見ても固形がんの適応がない薬剤である。2剤併用を行うためには、新たな適応の取得が必要と考えている。また、5-Aza-CdR と 5-FU の併用は *in vitro* での報告のみであり、*in vivo* での研究報告がないため、今後動物実験を視野に入れた検討を進めていきたいと考えている。

質問9) TP の酵素活性の実験で、yumoto 細胞が 5-Aza-CdR により TP の酵素活性誘導が見られなかったのは、メチル化修飾を受けていないからという認識でよいのか？

(回答) ご指摘の通り、yumoto 細胞で誘導がかからないのは、TP promoter の上流の3ヶ所の Sp-1 結合サイトのメチル化修飾がされていないためと考えており、bisulfite sequence 法により確認を行った。

質問10) 酵素活性の検討の縦軸の吸光度は絶対値、相対値どちらなのか？

学力確認の結果の要旨

(回答) 当検討は生成したチミンの量を吸光度計で測定しているが、KB3-1 細胞での検討において、5-Aza-CdR 未処理の値が検出限界以下で検出され、相対値の表記が困難であったため、絶対値での表記を行った。

質問 1 1) 今回 FdUMP の量または TS の発現量の変化等は検討しているか？

(回答) 今回の実験系では行っていないが、分子腫瘍学分野から報告されている論文で、KB 細胞の TP 強制発現株において 5-FU 処理時による細胞内の FdUMP の含有量が増強しているとの報告があるため、本実験系においても同様の現象が起きていると考えている。また TS の発現量においても検討は行っていないが、5-FU の耐性化メカニズムで一番報告が多い機序が標的である TS の増強であることから、本実験系でも発現が変化している可能性はあると考えている。

質問 1 2) 5-Aza-CdR 以外の脱メチル化剤での検討は行っているか？

(回答) 我々の検討では 5-Aza-CdR のみでの検討となるが、学位審査後に改めて調べたところ、大腸がん細胞株において、脱メチル化作用のある薬剤として知られる 5-azacytidine が 5-FU のアポトーシスを増強するという報告 (Fenaux et al. Lancet Oncol. 10(3): 223-232, 2009.) があった。この報告では詳細な機序の解析は行われていないが、我々の検討と同様に、5-azacytidin による脱メチル化作用が 5-FU の抗腫瘍効果を高めていると考察されており、我々の得られた結果を支持するものであると考えている。

質問 1 3) Sp-1 結合サイト以外の転写因子結合サイトの脱メチル化の影響はどう考えているか？

(回答) Sp-1 以外に TP の制御因子として STAT1 が知られているが、今回の検討では 5-Aza-CdR により誘導された TP は、Sp-1 のノックダウンにより、ほぼ消失したため、他の転写因子の関与は少ないと考えている。

質問 1 4) 臨床で使用されているビダーザの副作用はどんなものがあるか？

(回答) ビダーザの副作用として骨髄抑制や肝機能障害が知られている。同様の副作用は 5-FU でも報告があるため、2 剤併用するにはこれら副作用に十分注意が必要と考える。

質問 1 5) TP はアポトーシスを抑制する作用があると認識しているが、今回はアポトーシスシグナル等の検討は行ったか？

(回答) TP はシスプラチンによるシトクロム c の放出を抑制するとの報告があるが、今回検討は行っていない。今後研究を続ける上で、検討していきたいと考えている。

質問 1 6) なぜ TP に注目をしたのか？

(回答) TP は 5-FU を代謝活性化する酵素の 1 つであり、中皮腫組織での報告になるが、腫瘍化すると TP の DNA が高度にメチル化修飾を受けているとの報告がなされているため着目した。

質問 1 7) TP は抗がん剤の種類によってキャラクターが変わるという認識でよいか？

(回答) その認識でよいと考える。TP は血管新生因子でありアポトーシスを抑制する作用が報告されており、基本的には悪性因子であるが、5-FU を代謝活性化するため、5-FU 使用時には有用なものになると考えている。

質問 1 8) TP を発現している yumoto 細胞と、TP 発現が低い KB3-1 細胞との 5-FU 感受性の比較は行っているか？

(回答) KB3-1 細胞のほうが感受性が高いという結果を得ているため、TP の発現と 5-FU の感受性は必ずしも一致するものではないと認識している。

質問 1 9) yumoto 細胞の TP 発現を低下させたときには、5-FU の感受性は低下するか？

(回答) 検討を行っていないが、低下する可能性が高いと考える。

質問 2 0) 臨床で安全に使用する上で、両薬剤の至適濃度に対し今回の研究から言えることは何かあるか？

(回答) 細胞での検討のみなので、臨床で用いる上での具体的な数値を示すには検討が足りないと考えている。ただ、今回使用した薬剤濃度は実臨床でみられる範囲の濃度であるため、ある程度の安全性は担保できていると考える。

質問 2 1) KB3-1 細胞を中心に検討を行っているが、他の細胞ではどうなのか？

(回答) データは提示していないが、A549 でも検討を行っており、同様の結果を得ている。しかしながら ChIP アッセイは条件検討が難しく、KB3-1 細胞の結果しか得られていない。

質問 2 2) 核内移行の検討はどういった可能性を考慮し検討しているのか？

(回答) Sp-1 の核内移行のメカニズムは明らかになっていないが、核内移行に関与する因子の DNA がメチル化修飾を受けており、5-Aza-CdR 処理による賦活化を受け Sp-1 の核内移行が活性化されている可能性が考えられたため、可能性を否定するため行った。

質問 2 3) MTT アッセイでのみの検討だが、DNA の合成に与える影響等は見ていないのか？

(回答) 今回の検討では MTT アッセイのみで評価を行った。5-FU の作用が TS の機能を阻害することで得られるため、より正確な薬効を見るため DNA 合成の変化の確認が必要と考える。今後研究を続けるうえで検討したいと考えている。

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同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (西澤 由紀彦) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。