

## 最終試験の結果の要旨

|      |           |       |       |        |
|------|-----------|-------|-------|--------|
| 報告番号 | 総研第 590 号 | 学位申請者 | 品川 憲徳 |        |
| 審査委員 | 主査        | 杉浦 剛  | 学位    | 博士(歯学) |
|      | 副査        | 西谷 佳浩 | 副査    | 松口 徹也  |
|      | 副査        | 佐藤 友昭 | 副査    | 嶋 香織   |

主査および副査の5名は、令和3年2月2日、学位申請者品川 憲徳 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) ゲムシタピン(GEM)の適応はなにか。

(回答) GEM は膵癌、非小細胞肺癌、胆道癌、尿路上皮癌、乳癌、卵巣癌、再発悪性リンパ腫に適応がある。

質問2) GEM を口腔癌に使用した場合、耐性出現はありうるか。

(回答) 口腔癌患者の切除標本から採取した口腔癌細胞を用いた抗癌剤感受性試験で、GEM 耐性の検体があったとの報告がある。

質問3) GEM 耐性は獲得によるものか、それとも癌の特性によるものか。

(回答) どちらもありうる。RRM1 の発現上昇以外にも取り込み輸送体の発現低下、代謝酵素の低下、異化酵素の発現、排出ポンプの発現などの機構があり、どの機構で耐性が起こるかは細胞の特性にも左右される。

質問4) 口腔癌と GEM の関係を述べているのに実験で膵癌細胞を用いたのはなぜか。

(回答) 耐性機構獲得のメカニズムは口腔癌も膵癌も同様な機構が働いていると考え、実験しやすい GEM 耐性が問題となっている膵臓癌細胞株を用いた。

質問5) メタンスルホン酸エチルを用いて GEM 耐性株を作製しているが一般的な方法か。また同様にして口腔癌細胞から耐性株を作製できるのか。

(回答) 一般的な方法である。口腔癌からも耐性株を作製できると考えられる。

質問6) 3つのRR阻害薬の機能の違いは。なぜこれらの薬剤を実験に用いたのか。

(回答) RRM2 は2価鉄とチロシルフリーラジカルを含有し、この構造の安定が酵素活性に必須である。HU は RRM2 内のチロシルフリーラジカルを還元し、構造を不安定化させ RRM2 の機能を抑制する。3-AP は RRM2 の2価鉄をキレートすることで不安定化させると共に、3-AP と鉄との結合が ROS を発生させ、RR を直接損傷する。TRL はプロテアソームによる RRM1 タンパクの分解を誘導する。RRM1 および RRM2 それぞれに作用の異なったこれら薬剤により GEM 耐性の抑制にどう作用するのかを調べるために選択した。

質問7) 3-AP の濃度を色々変えて実験を行っている理由は何か。

(回答) 3-AP 0.1 $\mu$ M を無毒性濃度として設定したが、GEM 耐性細胞株は3-AP に対しても耐性を持っていたため、MIAPaCa-2 には 0.1 $\mu$ M、GEM 耐性細胞株には 0.12 $\mu$ M を適用し、耐性の補正を試みた。また GEM との併用実験では3-AP 0.1 $\mu$ M に効果を認めず、0.3 $\mu$ M に濃度を上げることにより効果が現れるか調べるためにこの濃度を用いた。

質問8) 他の薬剤と組み合わせた場合、3-AP の濃度を変えたことによる影響はあるのか。

(回答) TRL+3-AP 0.1 $\mu$ M および TRL+3-AP 0.3 $\mu$ M の GEM との併用効果を比較すると、差を認めなかった。

## 最終試験の結果の要旨

質問9) 薬剤の RR 抑制作用はどこで起きているのか。

(回答) RRM2 が主に核内に局在することから RR 阻害薬の RR 抑制作用は核内で働いていると考えられる。

質問10) RRM1, RRM2 は2量体を作っている。それを6:2、6:6と表現しているのは、単なる比率の問題なのか、あるいは構造として RRM2 の数が多くなるほど不活性化が進むということなどがあり得るのか。

(回答) size exclusion chromatography を用いた GEM 存在下でのヒト RR の構造を調べた過去の報告では、RRM1 単量体、RRM1 および RRM2 それぞれの2量体、RR 活性化状態で RRM1 の2量体が3つおよび RRM2 の2量体が1つの複合体(今回6:2と表している)、RR 不活性化状態で RRM1 の2量体が3つおよび RRM2 の2量体が3つの複合体(今回6:6と表している)、これら5種の RR の構造が確認されたと報告されている。

質問11) GEM 耐性細胞株が3-AP に対しても耐性を持っているということは、どういうメカニズムか。GEM と併用効果がないということに関連してどのように解釈するか。

(回答) 3-AP による RRM2 の阻害効果が RRM1 過剰発現している細胞では低下していることは予想される。RRM1 のノックダウンで3-AP に対する耐性が低下するか調べればエビデンスが得られる可能性があると考ええる。

質問12) HU で RRM2 タンパクの発現が上がるというのは報告されている事実なのか。

(回答) HU 耐性の白血病細胞で RRM2 の上昇が以前から報告されている。

質問13) RR が活性状態か、不活性状態かを調べる方法はあるか。

(回答) RR の基質である放射性標識のリボヌクレオチドを用いて合成されるデオキシリボヌクレオチドの量を測定することで RR 活性を測定できる。

質問14) 併用実験で、RR 阻害薬の処理と GEM の処理との間に時間差を作ることで結果に違いが出てくるのではないか。

(回答) RR 阻害薬の処理時間の違いで結果に違いが出る可能性はあり、検討する価値があると考ええる。

質問15) GEM との生存解析では3-AP の濃度を0.1, 0.12, 0.3  $\mu$ Mで行っているのに、タンパク、mRNA の実験でなぜ0.1、0.12という濃度で確認しなかったのか。

(回答) そのように同じ条件での実験を行うべきであった。

質問16) TRL 併用で RRM1 タンパクが減少、mRNA が上昇している。このことの検証実験としてどのようなことをすべきか。

(回答) TRL はプロテアソームによる RRM1 のタンパク分解を誘導する可能性が報告されている。タグのついたユビキチンを遺伝子導入して RRM1 のユビキチン化が TRL の存在下で増加するかどうかを観察する。プロテアソーム阻害剤を用いて RRM1 のタンパク分解が抑制されるかどうか、また RRM1 タンパク質の分解が抑制されたときに mRNA がどうなるか観察という実験が考えられる。

質問17) MGEM6 および MGEM8 の性質に違いはあるのか。

(回答) MGEM6 の方が MGEM8 より RRM1 の発現が高く、これに一致して GEM への耐性度も高い。以前様々な抗癌剤に対する耐性を調べた結果、Ara-c や 5FU に対しては MGEM8 の方が耐性度が高く、核酸の代謝酵素の発現の違いなど、異なる性質を持っている可能性が示唆される。

質問18) 臨床的に今回用いた RR 阻害剤を併用して使用する上での制約はあるか。

(回答) 実際の臨床応用で有用かどうかを判断するためには臨床試験が必要である。HU と TRL は既に臨床で使用されているので併用できる可能性は高いと考えられる。3-AP については現在臨床研究が行われている段階なので、新規薬剤と比較すると使用できる可能性は高いと考える。

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(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。