

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 673 号	学位申請者	玉井 元規
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	井上 博雅	副査
	副査	家入 里志	副査
<p>主査および副査の5名は、令和4年8月31日、学位申請者 玉井 元規 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) 1年ほどかけて GEM 耐性膀胱癌細胞株を樹立しているが、BOY や T24 における獲得した耐性の程度は想定範囲なのか。</p> <p>(回答) GEM 耐性の目標は IC50 での濃度差において3倍以上を目標としており、本研究の耐性濃度は想定以上と考えている。</p> <p>質問2) 親株の GEM 耐性濃度に差があるが、細胞株の種類による耐性の獲得容易度に差が生じる可能性はあるか。</p> <p>(回答) BOY と T24 では遺伝的背景の違いがあり、例えば Harvey-RAS (HRAS) に関して、BOY は wild type で T24 は mutation である。T24 の親細胞は oncogene がドライブしているため開始時点で GEM が効きにくい可能性があったという要因を考えている。</p> <p>質問3) 親株の GEM 耐性濃度に差があるが、ターゲットとなる分子を選定する上で BOY と T24 を同等に扱って問題はないのか。</p> <p>(回答) 候補分子は各親株と耐性株を比較し、発現の差が2倍以上のものを抽出している。同じ細胞株内での比較であるため問題ないと考えている。</p> <p>質問4) miR-99a-5p の形質導入における評価の内、耐性株だけではなく、親株に対しても評価を行っているのか。</p> <p>(回答) 親株においても同様に形質導入の有無での評価は行っており、耐性株同様、細胞機能の抑制を認めている。</p> <p>質問5) GEM 耐性の改善を認める SMARCD1 のノックダウン率はどれくらいか。またノックダウンした状態では IC50 はどのくらいか。</p> <p>(回答) SMARCD1 の si-RNA でのノックダウンは PCR において 80% 以上であることを確認している。またノックダウンした状態での IC50 については、IC50 の算出方法の都合上、transfection と GEM 投与の併用では正確に算出・比較できないため今回検討していない。</p> <p>質問6) GEM 耐性や GC 療法に耐性となった臨床検体における miR-99a-5p や SMARCD1 の発現は確認しているのか。</p> <p>(回答) TCGA データベースにおいて GC 療法を含む GEM 投与歴の有無で発現を解析したが、有意な発現差は認めなかった。現時点では GC 療法に耐性となった臨床検体の保有数が少ないため、今後の研究課題とさせていただきたい。</p> <p>質問7) 膀胱癌は罹患率・死亡率に関し、人種差はあるのか。また細胞株の由来元の人種の違いが耐性獲得等に影響を及ぼすのか。</p> <p>(回答) 膀胱癌の米国登録データベースにおいて、進行した病期で発見される確率や生存率がアフリカ系人種で悪いという報告がある。細胞株由来の人種による影響の可能性はあり得ると考えるが、他の要因の可能性もあり、厳密に追求するのは困難と判断している。</p> <p>質問8) 臨床的には膀胱癌の深達度によって治療が変わるが、MIBC と NMIBC を比較した際に悪性度の変化や細胞レベルで形質変化は認めるのか。</p> <p>(回答) 細胞レベルでの形質変化については TCGA データベースにおいて、例えば今回のターゲットである miR-99a-5p は MIBC と NMIBC で発現に有意差を認めていることから、細胞レベルで形質変化していると考えている。</p> <p>質問9) GEM 耐性株を樹立する際に使用した GEM 濃度は臨床的に用いる濃度を考慮しているか。</p> <p>(回答) in vitro における GEM 耐性株の作成は、親株を基準に IC50 にて3倍以上の耐性濃度を獲得することを目標に作成している。そのため臨床的投与量を目安に設定はしていない。また in vivo における GEM 投与量は、マウスにおける有効用量域 (80-160mg/kg) に設定している。</p> <p>質問10) miR-99a-5p について、他の癌種においてはどのように発現しているのか。</p> <p>(回答) PubMed において検索できる文献においては、癌抑制的に機能する報告が多く、正常組織と比較して癌にて発現が低下している報告が多い。</p> <p>質問11) GEM 耐性と細胞老化に関して、一旦老化した細胞が再度老化状態から目覚めるといったメカニズムはどのようなものが考えられるか。</p> <p>(回答) p53 や H3K9me3 を標的とした際に、老化からの脱却時に Wnt 依存性の増殖能を増強し、細胞周期を再突入させるという報告がある。</p>			

質問 12) GEM 耐性ができるメカニズムは、遺伝子の突然変異によるものか、それとも耐性のある細胞が選別され増殖した結果のどちらなのか。

(回答) 本研究では GEM 投与を中断することにより耐性濃度が低下していくことから、genetic な変化ではなく epigenetic な変化と考えている。

質問 13) GEM 耐性細胞株は CDDP に対しても薬剤耐性を生じるのか。

(回答) 今回作成した GEM 耐性細胞株では CDDP に対し交差耐性認めていないことを確認している。

質問 14) GEM は全ての癌種に効果があるのか。

(回答) GEM が全癌種に効くかどうかを検討した報告を見つけることはできなかったが、全癌腫に一定の効果を認める作用はないと考えている。

質問 15) *miR-99a-5p* は他臓器癌と比較して、膀胱癌において高発現しているのか。

(回答) 今回の研究では膀胱癌においてのみ発現を調査しているため、他臓器癌における統計的発現の程度は不明であるが、膀胱細胞においては一定の発現をしており、TCGA データベースにおいて、正常膀胱組織と比較して膀胱癌にて発現が有意に低下しているのを確認している。

質問 16) SMARCD1 が転写を調節するといったメカニズムは、タンパク質量に依存するのか、それともタンパク質の修飾等に依存するのか。タンパク質量に依存する場合、他のタンパク質に入れ替わることで作用が変わるといったメカニズムは判明しているのか。

(回答) SMARCD1 を含む SWI/SNF 複合体は、構成するタンパク質の種類によって癌抑制因子や癌促進因子として機能する報告がある。今回、si-RNA にてタンパク質としての SMARCD1 を減少させることで phenotype を認めていることから、タンパク質量依存的に作用していると考えている。

質問 17) 細胞老化に関する分子メカニズムは判明しているか。

(回答) p16<sup>INK4</sup>、p21<sup>CIP1</sup>、p53 や H3K9me3 などのサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKs) により、細胞周期の進行が停止するとされている。

質問 18) 細胞老化に関して、実際に細胞の老化様態の形質的变化は確認したのか。

(回答) 細胞の形態について、老化の観点からの定量的評価は行っていない。

質問 19) 細胞死の経路として、老化に誘導される場合はアポトーシスの実行遺伝子の欠失が原因の 1 つとして考えられるが、今回使用した細胞株においてアポトーシス実行遺伝子について、特にカスパーゼ 3、カスパーゼ 7、カスパーゼ 9 は確認しているのか。

(回答) 今回の研究ではカスパーゼの発現は確認していないが、SMARCD1 のノックダウンにてアポトーシスが誘導されなかったことを確認している。しかしながらその状態で GEM を加えたところアポトーシスの有意な誘導を認めており、アポトーシスの実行遺伝子は欠失していないと考えている。

質問 20) SMARCD1 が p53 と結合して転写を調整しているといった報告はあるのか。また免疫沈降等での結合を確認した報告はないのか。

(回答) SMARCD1 が p53 の転写標的であることを示唆する報告はされているが、直接的結合を確認した文献を見つけることはできなかった。

質問 21) Xenograft モデルにおいて、摘出腫瘍の並びが左から順に縮小しているが、羅列に問題はないのか。

(回答) 摘出腫瘍は時系列ではなく、36 日目のエンドポイントにおける一時点での摘出腫瘍 (n=5) であるため、問題ないと判断している。

質問 22) 論文 Introduction 内の記述において、臨床では MIBC と比較して NMIBC でより再発率が高いとされているのは間違いないのか。

(回答) NMIBC の臨床的治療法は経尿道的膀胱腫瘍切除術になり、細胞レベルでの残存率が高いとされ、再発率が MIBC と比較して高いとされる。

質問 23) 貴研究室で樹立された BOY について、元となった患者は化学療法による治療歴があるのか。また今回の研究にその影響はあり得るのか。

(回答) BOY は 1986 年に当研究室で樹立された。患者は術前に放射線治療を行い、膀胱全摘術を施行され、その後化学療法を施行されている。そのため、化学療法の影響は受けていない。仮に現在主流の GC 療法に曝露されていた場合は、今回の研究において影響が生じると考えている。

質問 24) 老化が可逆的であったとのことだが、臨床においては薬剤耐性を認めた場合、それは可逆的ではないため、それらとの関係性はどうか。

(回答) *in vitro* において、化学療法により癌細胞を細胞老化に誘導する報告があり、臨床において薬剤耐性を生じることが「癌細胞の細胞老化からの脱却」と判断するのであれば、再び細胞老化状態に誘導できれば薬剤耐性を解消できる可能性があると考えている。

質問 25) GEM を継続的に投与して耐性株を樹立しているが、投与を中断した場合はどのくらいで耐性は消失するのか。

(回答) GEM 耐性株において、GEM 刺激中断にて耐性が低下するのは確認しているが、親株レベルまでの低下は確認できていないため不明である。

質問 26) 癌細胞と細胞老化に関する考え方は一般的なのか。また、癌細胞に細胞老化を誘導させて治療に結びつけるといった研究はされているのか。

(回答) 一般的には癌細胞は不老細胞とされているが、近年、老化様変化を生じることが報告されている。臨床的には実用化されていないが、細胞老化による senescence-associated secretory phenotype (SASP) 的機序にて免疫チェックポイント阻害薬の効果が上昇したとされる研究報告がある。

質問 27) 今回の研究において p53 の発現は確認したのか。

(回答) 今回の研究では p53 の発現は確認していない。今後の研究課題とさせていただきたい。

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。