

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 716 号	学位申請者	中川 俊輔
審査委員	主査	石塚 賢治	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英	副査 榎田 英樹
	副査	吉満 誠	副査 鈴木 紳介
<p>主査および副査の5名は、令和6年8月1日、学位申請者 中川 俊輔 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。</p> <p>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) 小児 ALL で MDM2 の発現が増強している報告はあるのか? P53 と MDM2 は同時に評価しないと結果の解釈に影響してくると思われる。  (回答) 小児 ALL と MDM2 の発現増強についての知識がない。(追加回答) 小児 ALL では一般的に MDM2 は発現しており (<i>Med Pediatr Oncol.</i> 2005), MDM2 の発現が増強している報告もある (<i>Oncotarget.</i> 2016)。MDM2 の評価は研究を補完するために重要な要素と思うが、今回は検討していない。</p> <p>質問2) この細胞株は TP53 は野生型だが MDM2 はどうか。MDM2 の定常での蛋白発現があるのか。  (回答) 今回 MDM2 の発現について詳細を検討していない。(追加回答) NALM6 と RS4;11 それぞれで MDM2 蛋白は発現している (<i>Int J Mol Sci.</i> 2023, <i>Eur J Med Chem</i> 2021)。文献や COSMIC 等のデータベースで調べた範囲では NALM6 と RS4;11 の MDM2 において意義のある変異は報告されていない。</p> <p>質問3) 免疫染色の方法について、Triton X は核膜の透過性もあがるのか?  (回答) そのように考えている。</p> <p>質問4) 免疫染色の Nucleophosmin というのはどういう物質なのか?  (回答) 核小体に特異的に存在する蛋白で、核小体の広がりを確認するためにこの蛋白を使用した。</p> <p>質問5) RPL11 の WB 用の検体はあるのに免疫染色では利用しなかった?  (回答) 当時は免疫染色に使用可能な RPL11 抗体がなく、WB 用の抗体では免疫染色を試していない。</p> <p>質問6) 患者サンプルを用いた薬剤感受性試験や蛋白発現解析について、患者検体はどのように保存したサンプルなのか? その細胞は生きてるのか?  (回答) 患者から採取した骨髄を単核球分離し、-130 °C で保存していたもので、viable な細胞である。</p> <p>質問7) TP53 mutant な ALL 細胞株はあるのか? また、TP53 mutant 細胞株を用いて裏実験を行うのも一つの考え方か?  (回答) TP53 mutant な ALL 細胞株はあり、ご指摘の通り TP53 mutant 細胞株を用いた実験は裏付けに有用と思う。しかし、今回は TP53 変異株を用いた実験を行っていない。</p> <p>質問8) 核小体ストレス応答を誘導する具体的な薬剤の報告や候補はあるか?  (回答) 共同研究として核小体ストレス応答に特異的な薬剤開発に取り組んでいる。また、RPL11 の発現を増強させる方法を検討しており、RPL11 を増加させる方法がみつかれば核小体ストレス応答を増強させられるのではないかと考えている。</p> <p>質問9) 血液腫瘍に関するデータベースはあるのか? 成人の ALL に関するデータベースはあるのか?  (回答) 特に小児においては、利用できるようなデータベースがなかった。成人の ALL のデータベースも患者数が少なく、患者背景も多彩だったので、今回は研究としては行っていない。</p> <p>質問10) 発現量が同じでも核内に移行する機序が異なっていて、例えば rRNA の発現抑制が起こりにくくなるような耐性を獲得するような ALL はあるか?  (回答) RPL11 の局在変化が抑制されるような耐性機序についての知識を持っていない。(追加回答) 調べた範囲でそのような機序は報告されていない。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 1) 再発例で RPL11 がダウンレギュレーションしているが、その機序はどう推測しているか？

(回答) メチル化などによって発現が変化しているのではないかと推測している。

質問 1 2) 治療中の患者検体を調べられれば、リアルタイムに薬剤抵抗性を評価できるのではないか？

(回答) 実現できれば非常に有用な検査になると思う。

質問 1 3) ActD に対する薬剤耐性株で免疫染色などの実験を行っているか？

(回答) 興味を持っているが、今回はそのような実験を行っていない。

質問 1 4) MDM2 が P53 の発現を抑制するが、P53 の発現が亢進すると下流の MDM2 の発現も亢進する。P53 と MDM2 はどのような関係なのか？

(回答) MDM2 と P53 がお互いを制御し合っているので、P53 が増加する時もお互いの発現が増加しながら相対的に P53 が増加し抗腫瘍作用を発揮すると理解している。

質問 1 5) Nucleophosmin の移行は Reversible なのか？

(回答) 核小体の核質への移行は Reversible と報告されている (*J Submicrosc Cytol Pathol*, 1988) ので、Nucleophosmin の移行も Reversible と推測される。

質問 1 6) MDM2 阻害剤が一番効いているようだったが、現在の MDM2 阻害剤の臨床使用状況はどうか。

(回答) 白血病でも臨床試験が行われているが、開発は順調に進んでいるようではない。正常血球への毒性が臨床応用の障害になっているのではないかと考えている。

質問 1 7) 今回 ALL で得られた知見と、固形がんの核小体ストレス応答とで何か違いがあったか？

(回答) 固形がんの細胞株と比較して白血病細胞株のほうが低濃度の ActD で細胞死が得られた。

質問 1 8) メトトレキサートがよく効いていたようにみえるが何か理由が考えられるか？

(回答) メトトレキサートの抗腫瘍作用は DNA 合成阻害と RNA 合成阻害の両方があり、ALL では RNA 合成阻害のほうが抗腫瘍作用として影響が大きい可能性が考えられる。

質問 1 9) 核小体ストレス応答を全く誘導しない抗腫瘍薬はあるか？

(回答) MDM2 阻害剤はその一つと思われる。

質問 2 0) RPL11 は Diamond Blackfan 症候群や 5q マイナス症候群の原因遺伝子だが、遺伝子変異で RPL11 が失活しているような変異があるのか？

(回答) 調べた範囲ではそのような細胞の情報はなかった。

質問 2 1) MDM2 阻害薬が臨床試験などでヒトを対象にして効果があるか情報があるか？

(回答) 2009 年ごろに臨床試験が行われた報告があった。(追加回答)現時点で、白血病では Phase I の報告のみで、Phase II の臨床試験の結果はまだ報告されていない。

質問 2 2) DNA damage 等の他のストレス・作用機序がなく、P53 の活性亢進だけで細胞死が誘導できるか？つまり、actinomycin-D の作用は P53 の活性亢進だけではなく、P53 の活性亢進に加えてその他のストレス・作用機序があり、それらが協働して抗腫瘍効果を発揮するのではないか？

(回答) 白血病細胞株は 2 nM 程度の低濃度の actinomycin-D で細胞死を誘導できた。5 nM 程度の低濃度の actinomycin-D は核小体ストレス応答に依存した抗腫瘍効果とされており、MDM2 阻害剤の効果を含めて推測すると、P53 の活性化で細胞死を誘導できるのではないかと考えた。しかし、actinomycin-D の作用機序には DNA 挿入も知られているため、P53 の活性亢進だけで細胞死が誘導されるのが、その他のストレス・作用機序も作用するのかを明らかにすることは、今後の研究を進めるためにも重要と考える。

質問 2 3) TP53 の変異があれば ActD は全く効かないのか？

(回答) Actinomycin-D は TP53 の変異があれば効かないと考えている。

質問 2 4) Actinomycin-D がよく使われるがんは TP53 が変異していないということか？

(回答) 小児がんで actinomycin-D が使用されるのは横紋筋肉腫があげられる。小児がん全体的に TP53 の変異頻度は少なく、横紋筋肉腫も TP53 の変異が少ないので、現在の治療である actinomycin-D を含めた 3 剤だけの治療である程度の治療成績を上げられているのではないかと考える。

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(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。