

## 最終試験の結果の要旨

|   |           |       |       |
|---|-----------|-------|-------|
| 報告番号  | 総研第 270 号 | 学位申請者 | 新里 能成 |
| 審査委員  | 主査        | 夏越 祥次 | 学位    |
|   | 副査        | 中川 昌之 | 副査    |
|   | 副査        | 井上 博雅 | 副査    |
| <p>主査および副査の5名は、平成26年1月23日、学位申請者 新里 能成 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) glioblastoma(GBM)の治療は、抗がん剤の単剤で行われるのか。多剤併用はされないのか。<br/> (回答) 基本的には、最初は temozolomide(TMZ)単剤で行うが、再発時には、多剤併用となる。</p> <p>質問2) MLH1 を過剰発現させた場合には、TMZ に感受性になるのか。<br/> (回答) そのように期待して、MLH1 過剰発現株の作成を何度か試みた。しかし、そのような細胞株を作成できなかった。MLH1 を過剰発現させるとアポトーシスが誘導される、という報告もあり、そのような理由で導入株が作成できなかったと考えている。</p> <p>質問3) MSH6/MSH2 ではなく MLH1/PMS2 の変化が、TMZ 耐性により重要であるのはなぜか。<br/> (回答) 実際にエンドヌクレアーゼの作用を持ち、DNA 修復をスタートさせる作用を持つのは MLH1/PMS2 の方であり、これらの発現変化の方が、耐性というよりクリティカルな変化をもたらしていると考えられる。</p> <p>質問4) MLH1 の発現制御はどのような機構で行われているのか。<br/> (回答) MLH1 の発現制御のメカニズムはまだ十分には解明できていない。プロモーターのメチル化を、メチル化特異的 PCR で検討したが、プロモーターの明らかなメチル化は検出しなかった。転写因子や microRNA が、MLH1 の発現制御に関わっているのではないかと考えており、検討が必要である。</p> <p>質問5) 临床上、TMZ 耐性克服としての治療戦略はどのようなものが考えられるか。<br/> (回答) 一つは、MLH1 の発現制御機構を解明し、MLH1 の発現を回復させる手段を開発することで、TMZ 耐性を克服できると考えている。また、TMZ は、グアニンの N7 位にメチル基を付加する作用も有しているため、メチル化を受けたグアニンの一部は、塩基除去修復(BER)を介して修復されていると考えられている。この系を阻害することでTMZ の効果を増強させることができる可能性がある。実際、我々が作成した TMZ 耐性株を用いて、BER 阻害剤である PARP 阻害剤と TMZ を併用させることで、TMZ の効果のある程度回復できることを確認している。このことから、再発した GBM に、TMZ と BER 阻害剤を併用することで、TMZ の治療効果を再度引き出せる可能性がある。</p> <p>質問6) 無益な修復が起こることによってアポトーシスが誘導される機序は、どのようなものか。<br/> (回答) TMZ によって生じたミスマッチを修復するため G2/M arrest が起きるが、TMZ によって付加されたメチル基がある限り修復できない (=無益な修復) ため、最終的に DNA 断裂がおきアポトーシスが誘導される。</p> <p>質問7) MMR の機能不全が起きているということは、TMZ による DNA の変異が生じやすい状態にあることが考えられる。TMZ 耐性株において、重要な遺伝子に変異が生じている可能性はないか。<br/> (回答) 今回の研究では、直接検討は行っていない。しかし、TMZ で治療を行った low grade glioma の症例において、治療後に AKT-mTOR 経路および Rb 経路に関連する遺伝子に高頻度に変異を生じる、という報告があり、我々の TMZ 耐性株においてもそのような重要な経路の遺伝子に変異が生じている可能性がある。</p> |           |       |       |

## 最終試験の結果の要旨

質問 8)今回使用した臨床症例は、治療の経過におけるどのような段階の症例なのか。

(回答) 新規に診断された GBM 症例を使用している。TMZ の影響を正確に検討するために、TMZ 投与前に他の抗がん剤を使用されたもの、TMZ 以外の抗がん剤を併用されたもの、は含んでいない。

質問 9)MMR は、glioma において多段階発癌に関係するのか。

(回答) そのような報告はない。TMZ に対する耐性化のみに関与していると考えている。

質問 10)他の癌でも、MMR が抗がん剤に対する耐性化に関与するか。

(回答) 5-FU やシスプラチンに対する耐性に MMR が関与している、という報告が有る。

質問 11)今回論文で使用された U373、U105、LN229 といった GBM 細胞株の MGMT の発現状況はどうなっているか。

(回答) いずれの細胞株も MGMT は発現していない。

質問 12)MGMT の発現のないことが、今回の TMZ 耐性株の耐性獲得機序にかなり影響しているのではないかと。

(回答) MGMT の発現がない細胞株を用いたことによって、MMR が影響を受けやすかった可能性はある。

質問 13)臨床検体での検討で、MGMT の発現ではなく MLH1・PMS2 の発現の方が、再発に強く相関するのは何故か。

(回答) GBM が TMZ に対する耐性を獲得する過程で、MGMT を変化させるより、MLH1 の発現の方が変化させやすい機構が存在する可能性があるが、その点に関しては、さらなる検討が必要である。

質問 14)PMS2 発現が蛋白レベルで不安定性を生じる機序は、どのようなものか。

(回答) MLH1 が PMS2 の蛋白の安定性に与える影響を検討した論文が過去にある。その論文では、PMS2 の蛋白の安定性に、MLH1 と二量体を形成することが必要であることを証明している。今回作成した TMZ 耐性株においても、同様の機序が働いていると考えてられる。

質問 15)GBM は、microsatellite instability(MSI)が生じやすい癌腫か。

(回答) GBM で MSI を検討しているような報告は少数で、一貫した見解は得られていない。

質問 16)cell line や臨床検体を用いて MMR の機能的な評価は行ったか。

(回答) 親株と TMZ 耐性株を比較する形で、MSI の評価を行ったが、TMZ 耐性株において MSI は生じていなかった。過去の論文より、MMR 構成因子の発現低下だけでは MSI は生じないことが分かっている。TMZ 耐性株では、MLH1、PMS2 の発現が完全に欠失したわけではなく、生理的に生じるようなミスマッチの修復に対応できる程度の能力はまだ残っているために MSI は生じなかったのではないかと考えている。

質問 17)親株(U251)細胞に TMZ を処理した際、MLH1 遺伝子の発現の動きと蛋白の動きに乖離があるのは何故か。

(回答) TMZ を処理したあと 48~72 時間になると、U251 ではアポトーシスが誘導されてくる。このため、この時間帯の細胞は、正常な機能を有した細胞ではなく、そのために遺伝子と蛋白の発現の相関が見られなくなっている、と考えている。

質問 18) siRNA を導入して MLH1 をノックダウンした際の、遺伝子と蛋白の発現低下が相関していないのはなぜか。

(回答) PMS2 に対する siRNA を導入した際に、PMS2 の蛋白発現低下も若干ではあるが MLH1 の蛋白の安定性に影響を与えている。MLH1 蛋白の発現低下によって PMS2 の蛋白発現が低下するが、この PMS2 の発現低下が MLH1 の蛋白の安定性に作用することが考えられ、お互いの影響が定常状態になったところで蛋白発現が安定すると考えられる。このため、MLH1 の蛋白の発現低下が、遺伝子の発現低下の度合い以上に起こったものと予想している。

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。