

報告番号

香大医博甲 第752号

様式107

## 学位論文審査の結果の要旨

令和2年5月13日

審査委員	主査	上野正樹		
	副主査	松岡陽子		
	副主査	鈴木康之		
願出者	専攻	機能構築医学	部門	(平成27年度以前入学者のみ記入) 臓器制御・移植学
	学籍番号	15D703	氏名	喜田裕介
論文題目	Inhibition of cell-surface molecular GPR87 with GPR87-suppressing adenoviral vector disturb tumor proliferation in lung cancer cells 肺癌細胞におけるGPR87抑制アデノウイルスベクターを用いた細胞表面分子GPR87の抑制による腫瘍増殖の阻害			
学位論文の審査結果	合格 ・ 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			
<p>[要旨]</p> <p>背景/目的: 肺癌は予後不良疾患で、新規治療薬として新しいターゲットを特定する必要がある。GPR87は、細胞表面分子Gタンパク質共役受容体ファミリーのひとつであり、正常細胞では発現は低く、肺腺癌やいろいろな扁平上皮癌では高発現とされている。腫瘍特異的発現と細胞表面の位置により、分子標的薬となる可能性がある。またH3.3(H3F3A)によってコードされ、GPR87発現を促進し、H3.3の遺伝子発現は、GPR87と正相関があるとされている。本研究では、GPR87発現細胞株において遺伝子発現の阻害実験により抑制の効果を調べ、GPR87過剰発現肺癌に対する遺伝子治療の可能性を検討した。</p> <p>方法: 悪性細胞株20株の遺伝子発現を確認し、GPR87過剰発現肺癌細胞株のH358およびPC9を阻害実験にかけた。GPR87遺伝子を標的とするショートヘアピンsiRNAを、アデノウイルスベクター(Ad-shGPR87)を用いて、ネガティブコントロールとしてスクランブル配列に対してshRNAを発現するアデノウイルスベクター(Ad-shScramble)をCOS-TPC法を用いて作成した。遺伝子およびタンパク質の発現を評価するために、リアルタイムRT-PCRおよびウエスタンブロット分析を実施した。In vitroでは細胞生存率をMTT assayを、in vivoではH358細胞由来の腫瘍をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍異種移植片を形成後、皮下移植した。Ad-shGPR87とAd-shScramble群に分け、腫瘍内注射を行い腫瘍体積の検討を行った。</p> <p>結果: GPR87遺伝子発現は、mean±SD: 93.8±140.4%、median: 18.7%でみられ、medianをカットオフとすると50%(10/20)の悪性細胞、特に肺癌細胞(70%、7/10)でGPR87過剰発現を認めた。H3F3Aの遺伝子発現は、GPR87遺伝子発現と正の相関があり(<math>R^2=0.575</math>、<math>p=0.005</math>)、GPR87遺伝子発現はH3F3A高発現細胞でH3F3A低発現細胞よりも有意に高かった(<math>p&lt;0.0001</math>)。Ad-shGPR87は、GPR87を過剰発現するH358およびPC9細胞において遺伝子およびタンパク質の発現を抑制し(<math>p&lt;0.005</math>)、細胞増殖を段階的に有意に抑制した(<math>p&lt;0.005</math>)。ヌードマウスにおけるAd-shGPR87は、GPR87を発現するH358異種移植片に対して有意な抗腫瘍効果があった(<math>p&lt;0.05</math>)。さらに、Ad-shGPR87感染後、両方の細胞でKRASおよびc-Myc発現の有意な減少を確認した。</p> <p>結論: GPR87は癌細胞の増殖に重要な役割がある可能性があり、肺癌治療の新規標的としての可能性がある。</p>				

本研究に関する学位論文審査委員会は令和2年5月12日に行われた。  
以下に示す様々な質疑応答が行われたが、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. スライド11に対して、GPR87の性質説明としては、リガンドとしてどのようなものがあるか。生理作用は、共役しているGαは何か。
2. アデノウイルスベクターを送達手段として選んだ理由。またアデノは静注すると肝臓などに高発現するが、薬物治療が必要な4期からでも腫瘍内注射を想定しているか。
3. GPR87はGs共役型なのか。今回、標的としたシグナル分子はチロシンキナーゼ受容体の下流シグナルに思えるが、測定までの思考プロセス（科学的合理性）は。
4. 肺癌診療ガイドライン2019年版の図において、どの患者群を対象とするか。Second line やthird lineでの使用やEGFR障害剤など拮抗症例に対して有効か。
5. テーラーメイド治療の恩恵を受けられていない肺癌患者の割合は。
6. 治療薬の50%はGPCRをターゲットにしているが、具体的にはどの薬剤か。また、そのような薬剤無効例に対して、今回のウイルスベクターは効果があるか。
7. H3F3AにコードされるH3. 3はGPR87の発現の促進は、どのような機序か。
8. GPR87やH3F3Aの発現は、KRAS、EGFR、ROS1、BRAF、ALK等の遺伝子異常や、PD-L1の発現とは何らかの関りはあるか。
9. GPR87阻害よりも H3F3Aを阻害する方が有効である可能性はあるか。
10. GPR87や H3F3A の正常細胞における機能。
11. GPR87は肺や気管支の正常細胞ではどの程度発現しているか。
12. 経気管支投与した場合、adenovirusが正常肺や気管支に及ぼす影響はあるか。GPR87発現がある正常細胞は、感染した場合に特別な悪影響が懸念されるか。
13. 小細胞肺癌細胞株では検討はしているか。
14. In vivoの実験で、腫瘍の組織学的検討はしているか。
15. 個々の肺癌症例でGPR87の発現程度の評価法は生検か。ヒトの肺癌では腫瘍内にheterogeneityがあるのではと思われるが、GPR87発現程度を生検で十分評価できるか。
16. Table1では、様々な肺癌培養細胞での結果が示されており、これらの結果の違いは、肺癌に、heterogenousな遺伝子異常が起きていることを示しているのか。特定の単独の遺伝子治療では難しいことを意味しているのか。また、悪性中皮種細胞株における結果のばらつきは、上皮型や二相性といった組織学的特徴をいくらかは反映しているのか。
17. Figure1では、H358株とPC9株の値が高いが、これはp53遺伝子変異が影響しているのか。Figure1の右側のMESO-1は、MESO-4で良いか。このMESO4は、MESO1と比較し何が違うのか。p53変異は。
18. Figure 5の(A)と(B)で、GPR87抑制によるKRASとc-Mycの発現への影響がH358株とPC9株で同じようにみられるのに、Figure 5の(C)と(D)で、GPR87抑制によるAktとCyclin-D1の発現への影響がH358株とPC9株で異なっているが、この違いのメカニズムは。
19. 今回の結果から、香川大学医学部呼吸器外科教室としては、どのような遺伝子治療戦略を練っていくのか。

本論文は細胞表面分子GPR87に関する研究であり、抑制実験を行うことで遺伝子・タンパク質の発現を測定し、分析することで肺癌細胞株増殖への抑制効果を証明した。今後の新たな肺癌治療につながる可能性が示唆され、本審査委員会では審査委員全員一致して博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	Anticancer Research			第 40 巻, 第 2 号
(公表予定) 掲載年月	2020年 2月	出版社(等)名	International Institute of Anticancer Research	

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。