




学位論文審査の結果の要旨

令和 4 年 10 月 27 日

審査委員	主査	岡野 圭一			
	副主査	辻 晃仁			
	副主査	矢島 俊樹			
願出者	専攻	医学専攻	部門	(平成27年度以前入学者のみ 記入)	
	学籍 番号	16D720	氏名	中原 麻衣	
論文題目	Effect of lenvatinib treatment on the cell cycle and microRNA profile in hepatocellular carcinoma cells. 肝細胞癌の細胞周期とマイクロRNAを介したレンバチニブの治療効果の検討				
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格      不合格      (該当するものを○で囲むこと。)				

〔要旨〕

進行した切除不能な肝細胞癌の予後は不良であり、長期に渡ってその標準治療薬は Sorafenib のみであったがその効果は限定的である。チロシンキナーゼ受容体阻害薬である Lenvatinib は切除不能な肝細胞癌 (HCC) の治療薬として臨床試験で Sorafenib との非劣勢が示され、その効果が期待されている。Lenvatinib の主な作用機序は、血管新生と腫瘍 FGF シグナル伝達経路の阻害であるが、それ以外にも様々なチロシンキナーゼを阻害する。microRNA (miRNA) は、細胞周期制御因子およびシグナル伝達経路を標的として直接的・間接的に細胞周期の進行を制御している。しかし、肝細胞癌における細胞周期および細胞周期関連分子を介した Lenvatinib の抗増殖作用の詳細なメカニズムは解明されていない。そこで本研究では、in vitro および in vivo の HCC 細胞株および腫瘍組織におけるレンバチニブの抗腫瘍効果およびその作用機序を検討した。1) HuH-7、Hep3B、Li-7、PLC/PRF/5 を用いて in vitro および in vivo の Lenvatinib の抗腫瘍効果を評価した。2) Lenvatinib の細胞周期および細胞周期関連分子に与える影響をフローサイトメトリー解析、Western blotting を用いて検討した。3) Lenvatinib を添加した HCC 細胞およびエクソソームにおける miRNA の変化を調べた。HuH-7 と Hep3B の細胞増殖は Lenvatinib によって抑制されたが、Li-7 と PLC/PRF/5 細胞は抑制されなかった。HuH-7 と Hep3B は、FGF19 と FGFR4 を豊富に発現しており、そのことが Lenvatinib に対する感受性が高い理由として考えられる。Lenvatinib 感受性の細胞では cyclinD1 の抑制を介して G0/G1 期での細胞周期停止が誘導されていた。Lenvatinib 感受性の細胞株では Lenvatinib 添加前後で細胞およびエクソソームともに miRNA は異なるクラスターを形成しており cyclinD1 をターゲットとする miR-218-5p をはじめとして複数の癌細胞の増殖抑制に関わる miRNA の有意な上昇を認めた。感受性が低い PLC/PRF/5 細胞では、Lenvatinib 添加前後で有意変化した miRNA が見られたものの、cyclinD1

をターゲットとする上記のmiRNAは変化していなかった。細胞間のLenvatinibに対する感受性の違いには、FGFRの発現の違いの他に細胞周期停止に関与するmiRNAが関与していると考えられる。結論として、Lenvatinibはその感受性HCC細胞において、細胞周期停止を誘導miRNA、細胞増殖および腫瘍成長を直接阻害することによって抗腫瘍効果を発揮する。

本研究に関する学位論文審査委員会は令和4年10月25日に行われた。

審査においては以下に示す様々な質疑応答が行われ、それぞれに対して適切な回答が得られた。

1. Lenvatinib感受性細胞ではFGFR19, FGFR4が過剰発現していたとのことだが他の癌種では同様の報告はされているか。FGFR19, FGFR4はバイオマーカーとして有用か。  
→Lenvatinibより先に使用されて来た甲状腺癌等でも報告されている、効果予測のバイオマーカーとして有用と考えられ今後研究を進めていきたい。
2. SorafenibはLenvatinibと同じ様な作用機序の薬剤であるがこちらでも細胞周期停止を導くか。  
→Sorafenibでは既に細胞周期停止の機序は多く報告がある、当科過去の研究では他の抗癌剤等多くの薬剤でもHCCに対して細胞周期停止を介した増殖抑制を報告している。
3. 免疫チェックポイント阻害薬とLenvatinib併用療法についてHCCでの効果はどうか。  
→併用データは持ち合わせていないが臨床での他癌腫の既報も合わせて効果は期待できる。
4. 4つの細胞株でLenvatinibへの感受性の違いが出た理由は。  
→FGFR19, FGFR4発現違いやAkt等の他、細胞の分化度や背景のウイルスなども影響している。
5. FGFR19, FGFR4について実際の発現変化の検討はしているか。  
→Western blottingでの検討を始めているが結論には至っていない。
6. 細胞増殖抑制のメカニズムの一つとしてアポトーシスの検討は今回行っているか。  
→今回はアポトーシスについてフローサイトメトリー等の検討はできていない。  
他癌腫でのこれまでの検討と同様に
7. 多くのmiRNAが挙げられているがどれが有用か。  
→基礎実験では現時点ではより重要なものは絞れていない。2種類については遺伝子導入による抑制実験を行ったがWestern blottingで有意なFGF・FGFR関連の変化は見られなかった。
8. FGFR19, FGFR4のバイオマーカーとしての有用性、血清や組織など臨床像でどのような人に効いていると考えているか。  
→背景肝でNBNCが増えている現状を見るとそこに効果が高いポイントとなるのではないかと考えている。保存血清を使用して効果があった方、なかった方を今後検討していきたい。
9. HBV, HCV感染が減っているのにHCCは減少していないが遺伝子異常は発癌のきっかけになるか。そのことは一般的に知られている段階の情報はあるか。  
→肝臓臨床家で一般的な情報というところは把握できていない。HCV肝炎を背景にして肝硬変が進行し発癌するのと異なり、NASH等は慢性肝炎でそれほど線維化が進んでいない肝臓でも発癌して治療する症例を多く経験しておりその背景にはそのような遺伝子異常があるのではないかと考えている。
10. Lenvatinibは甲状腺癌ではどれも効果が高い印象はあるが肝癌ではばらつきが大きいと感じる、肝癌そのものの種類によるのかそれとも細かい遺伝子異常が関わっているのか。  
→もちろん脈管浸潤など効きにくいものがあるが、臨床では同じような臨床像でも効く効かないの違いがあり個々の遺伝子異常が大きく影響すると考える。
11. 細胞のmiRNAとexosomeのmiRNAの結果は共通していたか、全く異なる変化だったか。臨床での遺伝子パネルでの組織とリキッドバイオプシーは相関が見られるが。  
→今回の実験結果では双方が違った変化となった、共通点の解析も行ったが有意なものは挙がっていない、ただし多くのmiRNAが挙がっておりFDRのcut offをかなりtightにして絞っていたため範囲を広げての検討もすべきだったと考えている。
12. 変化したmiRNAで胃癌で報告があるものが挙がっていたが胃癌でもLenvatinibによる効果をみているものか。  
→胃癌でのmiRNAの報告は別の薬剤での結果であったためLenvatinibの基礎的効果はまだ確認できていない。

13. 他の癌腫でも Lenvatinib で同様の miRNA 変化は報告されているか。  
 →腎癌等臨床的に使用されてきた癌腫では同様の miRNA 変化が報告されている。
14. 今後この研究を臨床応用していくためのアイデアは。  
 →HCCの治療において薬剤の選択、免疫チェックポイント阻害薬後に使っていく分子標的治療薬は多岐にわたっており個々の症例でどれを選択すべきか、そこに今回効果があった細胞で変化したmiRNAやチロシンキナーゼの発現の違いをバイオマーカーとしてオーダーメイドの治療に生かせるよう研究を続けていきたい。

本研究では肝細胞癌での重要な治療薬となっているLenvatinibに関してその腫瘍抑制効果を基礎的に検討したもので結果に対する十分な考察もなされており、本審査委員会では審査員全員一致して博士論文に相応しいものと判断し合格とした。

掲 載 誌 名	Biomedical Reports		
	第 17 卷, 第 4 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2022年 8月	出版社 (等) 名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は, 1, 500字以内にまとめてください。