




学位論文審査の結果の要旨

令和4年5月18日

審査委員	主査	辻 晃 仁 		
	副主査	西山 佳宏 		
	副主査	河形 尚 		
願出者	専攻	医学系研究科	部門	(平成27年度以前入学者のみ記入)
	学籍番号	17D713	氏名	琢磨 慧
論文題目	Antitumor Effect of Regorafenib on MicroRNA Expression in Hepatocellular Carcinoma Cell Lines			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

〔要旨〕

【背景と目的】肝細胞がん(HCC)は、肝臓の原発性悪性腫瘍の中で最も多く見られる腫瘍であり、重要な医療問題である。進行したHCC患者における標準的な全身化学療法はマルチキナーゼ阻害剤のSorafenibやLenvatinibに依存し、臨床上でRegorafenibは二次治療として使用されている。しかしRegorafenibの抗腫瘍効果のメカニズムについての検討は多くない。今回我々はRegorafenibの抗腫瘍効果のメカニズムについて検討した。

【方法】1) HCC細胞株を用いRegorafenibの細胞増殖抑制効果をMTT assayで検討した。2) HCC細胞株HuH-7に対しRegorafenibの細胞周期に与える影響をフローサイトメトリーで解析し細胞周期関連分子の発現をWestern blotting法で検討した。3)ヌードマウスを用いてRegorafenib抗腫瘍効果の有用性を検討した。4) RegorafenibのHCC細胞増殖に関連するmicroRNA(miRNA)を同定するために2555遺伝子が搭載されたアレイチップを用い網羅的に解析した。5) real time PCR解析結果より細胞周期関連分子の発現低下に関連するmiRNAを特定し、miRNA mimicを用いてその効果をWestern blotting法で確認した。

【結果】HuH-7細胞株にてRegorafenib添加により濃度依存性に細胞増殖抑制効果を認めた。フローサイトメトリーからG1アレストが確認され、G1期からS期に関連する細胞周期関連分子であるcyclin D1の発現抑制が認められた。in vivoの検討においてもRegorafenib投与群の有意な抗腫瘍効果を見出すことができた。miRNAの解析においてRegorafenib投与群は異なるクラスターを形

成し、Regorafenibの抗腫瘍効果に関連するmiRNA分子を確認した。中でもmiR-3714はcyclin D1の発現抑制に関連することが報告されており、real time PCRにて発現の有意差が確認され、miR-3714 mimicをHuH-7細胞に遺伝子導入した際にもcyclin D1の発現抑制が認められた。

【結語】RegorafenibはHCCにおいて細胞内、エクソソーム内のmiRNAの変化及びレセプター型チロシンキナーゼ活性の低下を介して細胞周期のG1期からS期に関連するcyclin D1低下を導くことにより、癌細胞増殖抑制を誘導する機構があると考えられ、本研究はその機構にcyclin D1をターゲット遺伝子とするmiR-3714が関連する可能性があることを示唆する。

令和4年5月18日に行われた学位論文審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

1) 細胞周期の解析やmiRNAの解析に関してHuH-7細胞株を選択した理由はどのようなものか。

(回答)第一にレゴラフェニブのHuH-7に対する感度の高さがある。临床上におけるレゴラフェニブの有効血中濃度から算出した指摘実験濃度は3~5 μ MでありHuH-7は細胞増殖アッセイの結果よりこの濃度でレゴラフェニブに感度を示す細胞株であった。第二に、ヒト肝細胞癌腫由来のHuH-7細胞株は初代肝細胞に代わる簡便な実験材料として広く利用されており、細胞の品質管理に必要な全ゲノム情報が提供され世界中で多くの先行研究が行われていることが挙げられる。第三に、HuH-7は血清やタンパク質を含まない培養が可能であり、遺伝子導入が容易であることが挙げられる。HuH-7はHBVの複製成功やHCVのレプリカシステムに基づき、最近の肝炎ウイルスの研究、特に複製や発がん機構の解析に広く利用されている。また、HuH-7はHCCへのmiRNAトランスフェクションに関する多くの基礎研究でも使用されており、in vitroでのトランスフェクション成功率の高い細胞株として度々報告されてきた。これらの理由より本研究にHuH-7が最も適した肝細胞癌株と考えて選択した。

2) miR-3714の機能を止めるような試薬はあるのか。

(回答)阻害剤の存在を確認しているが、今回の検討には用いることができていない。さらに阻害剤を入れての検討ができていればより良い結果が得られたであろうと助言頂いた。

3) miR-3714を用いての今後の展望はどのようなものか。

(回答)今回の検討でHuH-7細胞株に対してレゴラフェニブを投与することでcyclin D1の抑制により細胞周期の停止に導くことが確認できたが、cyclin D1の上流のpathwayとの関連についてはwestern blotでの検討を行ったものの有意な結果が得られなかった。

今後、miR-3714とcyclin D1の上流のpathwayとの機能解析を進め、miR-3714が細胞周期の停止に導く作用の詳細が解明できれば、新たな創薬や有効予測マーカーの開発に結び付けることができると考えている。

4) miR-3714によってcyclin D1の異常が引き起こされるならば血清を用いて調べる事が可能か。

(回答)可能ではないかと考えている。今後は複数の肝細胞癌患者の血清を用いてmiR-3714の増減と治療効果および予後予測マーカーとしての有用性について解析を進めたいと思っている。

- 5) ソラフェニブやレンバチニブなどの肝細胞癌に対して用いられる他の分子標的薬もレゴラフェニブと同じメカニズムで抗腫瘍効果をもたらすのか。

(回答)現時点で分子標的薬の抗腫瘍効果に関しては複数の作用が文献上報告されており、不明な点も多い。特にレゴラフェニブに関しては報告の全体数が少ない。今回の研究よりcyclin D1の抑制による細胞周期の停止がレゴラフェニブの抗腫瘍効果のメカニズムの1つと考えられ、同様のメカニズムを他の分子標的薬も持ちうる可能性はあると思われる。

- 6) 肝細胞癌のアルゴリズムでTACEと薬物療法の位置関係をどう捉えているか。

(回答)アルゴリズム上は肝内に4個以上の複数の腫瘍がある場合にTACEと薬物療法の両者の選択肢が同時に存在する。その中でも、薬物療法は原則としては肝予備能がChild-Pugh Aの場合に限られ、TACEは肝内の腫瘍に脈管侵襲がない場合に限られる。その他にも、薬物療法は初期投与の場合こそ入院で経過観察を行っているが継続可能な場合は外来通院のみで治療を長期間継続することができ、長期の入院による拘束を嫌う患者のQOLを妨げない治療法とも考えることができる。

- 7) 今回の6種類の肝細胞癌株を選んだ理由は何か。昨今は非ウイルス性肝細胞癌が増加しているが非ウイルス性肝細胞癌の細胞株を選んでいるのか。

(回答)今回使用した肝細胞癌株は、先述したHuH-7以外の細胞株も多くの先行研究に用いられ国内において流通が多く入手が簡便な細胞株を選択した。

非ウイルス性肝細胞癌株に特化した細胞株を選択はできていないが、今後非ウイルス性肝細胞癌が増加しそのような細胞株の流通が増加した場合にはその細胞株を用いても検討したいと考えている。

- 8) レゴラフェニブが他臓器の癌へもたらす抗腫瘍効果も肝細胞癌と同じなのか。

(回答)レゴラフェニブは複数の抗腫瘍効果のメカニズムを報告されており、他臓器の癌腫にもおいても実際に結腸癌や消化管GISTなどに対して臨床上で用いられている。しかしその抗腫瘍効果のメカニズムの全容はわかっておらず、まだ不明な点も多い。今回のcyclin D1の抑制による細胞周期の停止を起こす抗腫瘍効果が他臓器の癌においても同様に働く可能性はあると思われる。

- 9) miR-3714は他の癌腫、例えば胆道癌や食道癌などに対しても同様の抗腫瘍効果をもたらすのか。

(回答)miR-3714に関しては文献的報告がほぼ無く他の癌腫に対しても同様の抗腫瘍効果を

もたらずのかは不明である。数少ないmiR-3714の報告の中には、子宮内膜症の治療効果にmiR-3714が関連する可能性があるという検討が他施設より報告されている。

しかし、Seed 配列上でmiR-3714とcyclin D1との結びつきは確認できているため、miR-3714がcyclin D1と結びつくことにより何らかの作用をもたらす可能性は予想できる。

10) レゴラフェニブがアポトーシスを誘導していない結果をどう捉えているか。

(回答)実際にレゴラフェニブがアポトーシスを誘導して抗腫瘍効果をもたらす報告も複数存在する。本研究でフローサイトメトリーによるアポトーシスの検討も行ったが、残念ながらその結果では有意な差は得られなかった。そこでcyclin D1の抑制による細胞周期の停止について有意差が得られたことに着目し、その観点からmiRNAの解析を進めることでcyclin D1に結びつくmiR-3714を導くことができた。

11) ウイルス性肝細胞癌が減少して非ウイルス性肝細胞癌が増加してきた背景はどのように考えているか。

(回答)肝炎ウイルスに対してDAAによる治療が主流となりウイルス性肝細胞癌の数は大きく減少し、その一方で生活習慣病の増加によって非ウイルス性肝細胞癌の増加が引き起こされることが同時に進行したために現状の分布へ変遷してきたと考える。

12) NASHをベースとした肝細胞癌株を樹立できれば臨床的な背景と近づいた検討ができるのではないか。

(回答)御指摘頂いたとおりと考える。今後そのような細胞株の流通が増加すればまた同様の検討を行いたいと考える。

掲 載 誌 名	International Journal of Molecular sciences 第 23 卷, 第 3 号		
掲 載 年 月	2022年 1月	出版社 (等) 名	Multidisciplinary Digital Publishing Institute

(備考) 要旨は, 1, 500字以内にまとめてください。