



Title	肝芽腫におけるシスプラチン耐性に関わる新規バイオマーカーの探索 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤好, 直
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14173号
Issue Date	2020-06-30
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/78904
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Sunao_Fujiyoshi_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏名 藤好 直

	主査	准教授	七戸	俊明
審査担当者	副査	教授	近藤	亨
	副査	教授	園下	将大
	副査	教授	青山	英史

学位論文題名

肝芽腫におけるシスプラチン耐性に関わる新規バイオマーカーの探索
(Study on the novel biomarkers of CDDP-resistance in Hepatoblastoma)

申請者は、肝芽腫におけるシスプラチン（CDDP）耐性に関わる新規バイオマーカーの候補を検索すべく、初めにシスプラチン耐性に関連する遺伝子の選択を行った。肝芽腫患者の切除検体から抽出した DNA を用いてメチル化ビーズアレイを行い DNA メチル化傾向と CDDP 耐性の関連を調べ、CDDP 耐性患者で有意に高メチル化している遺伝子を選択した。細胞実験では、肝芽腫細胞株の HuH6 を用いて CDDP 耐性株を作成し、発現アレイを行い耐性株で低発現している遺伝子を選択した。これらの実験結果を統合し CDDP 耐性に関連する遺伝子として CSF3R を選択した。次に、Bisulfite pyrosequencing 法により術前 CDDP 感受性患者の切除標本における CSF3R のメチル化率を測定し、高メチル化が早期再発に関連することを示した。これらの結果より、肝芽腫患者の治療において CSF3R の高メチル化は術後化学療法における CDDP 耐性のバイオマーカーとなり得る可能性を示した。

審査にあたり、まず、副査の青山教授より CDDP 感受性症例 38 例のうち、メチル化アレイに 6 症例を用いたが、その選択の基準についての質問があり、申請者は臨床データに偏りがないように配慮しつつ検体量の多い 6 症例を選出したと回答した。続いて、本研究の臨床応用を想定した場合、術後に CSF3R 高メチル化群と診断された場合にはどのような治療法を考えているかとの質問があり、申請者は現時点では ITEC 療法や大量化学療法と骨髄移植の併用、肝移植が考えられると返答した。また、今回抽出された 18 候補遺伝子の中で、検討を加えなかった 13 遺伝子も候補となりうる可能性があるかとの問いに対し、可能性はあるが今回は検体量の限界により最も関連の強い 1 遺伝子に絞ったと回答した。次に副査の園下教授より先行研究で RASSF1A の高メチル化と CDDP 反応性の関連を報告しているが、今回新たに候補遺伝子を探した理由と、本研究と RASSF1A の関連について質問があった。

これに対して、申請者は先行研究では臨床データや病理組織学所見とメチル化率を比較しているのに対し、本研究では再発に着目し CDDP 抵抗性とメチル化異常の関連を研究した旨、本研究で RASSF1A は抽出できず関連は示せなかったが今回の検討のみで結論することはできない旨を説明し、本件は博士論文の考察に追加すると回答した。続いて、CDDP 耐性株の樹立方法の提示を求められ、0.01 $\mu\text{g/ml}$ から 2 $\mu\text{g/ml}$ まで濃度を漸増し細胞の死滅を防ぐため非暴露時間を挟んだと回答した。また、最終暴露濃度が 2 $\mu\text{g/ml}$ であったが、RNA 採取前の処理時の CDDP 濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ であった理由を問われ、暴露継続しても生存可能な濃度が 2 $\mu\text{g/ml}$ であり、耐性株の IC50 が 20 $\mu\text{g/ml}$ 程度であったため、48 時間暴露してもある程度細胞が生存する 10 $\mu\text{g/ml}$ に設定したと回答した。さらに患者の体内での CDDP 濃度と実験に用いた濃度の妥当性の問いに対し、患者体内での CDDP の薬物動態のデータは持っておらず、博士論文に記載を追加したいと回答した。次に副査の近藤教授より、CDDP 耐性株における CDDP 暴露後の CSF3R の発現上昇の解釈についての質問があり、これに対して、申請者は CDDP 環境に耐えるために CSDF3R の発現が上昇し、非存在下はメチル化により発現が低下したと考察するが、メカニズムについては解明できていないと回答した。また、患者標本での CSDF3R 発現の検討に関する質問に対し、今回使用出来た検体は DNA のみであり本研究の限界であると返答した。

最後に主査の七戸准教授から、本研究で女性患者が高メチル化を示し予後不良傾向であったが、これをどのように考察するかとの質問があった。これに対し、申請者は肝芽腫発症の男女比は 2:1 程度だが、予後と性別の関連は報告されておらず、限られた症例数での偏りの結果である可能性があるかと返答した。さらに、本研究の臨床応用への展望について問われ、CSDF3R の CpG のメチル化率を 54%で閾値とし、高メチル化と低メチル化の群別化を行ったところ再発率に差が出たことから、メチル化率で群別化することで術後化学療法選択の指標になり得ると回答した。

この論文は、小児の固形腫瘍の一つである肝芽腫患者の集学的治療において、術前 CDDP 治療後の手術治療により採取された切除検体の CSF3R の高メチル化が、術後化学療法における CDDP 耐性のバイオマーカーとなり得る可能性を示したことにおいて高く評価され、今後の肝芽腫治療の発展に大きく寄与することが期待される。

審査院一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。