HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	TRUE Gene silencing法を用いたcyclin D1の発現抑制による頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖抑制［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	飯塚, さとし
Description	配架番号：2132
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11650号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58861
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Iizuka_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　飯塚　さとし

審査担当者　主査　准教授　濵田　淳一
副査　教　授　畠山　鎮次
副査　教　授　廣瀬　哲郎
副査　教　授　佐邊　壽孝

学 位 論 文 題 名

TRUE Gene silencing 法を用いた cyclin D1 の発現抑制による
頭頸部扁平上皮癌細胞の増殖抑制
(Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing)

学位申請者は，申請者が所属する教室のこれまでの研究成果に基づいて，頭頸部癌の治療標的として細胞周期関連蛋白である cyclin D1 に着目し，その有用性について以下の基礎腫瘍学的解析を行った。

本研究では, cyclin D1 の発現を抑制するために新しいバイオテクノロジーである tRNase ZL（tRNA 3'processing endoribonuclease)-utilizing-efficacious gene silencing（TRUE gene silencing）法を選択した。tRNase ZL は tRNA 前駆体や小さな tRNA 前駆体に類似した RNA 複合体を認識し切断する酵素である。まず，ヒト cyclin D1 mRNA の二次構造を解析し，tRNase ZL によって認識・切断されることが予測される部位を 6 箇所選び，それぞれに対して構造の異なる 3 種類の small guide RNA（sgRNA）を設計・合成した。各々の sgRNA を培養ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 および HSC-3 細胞に導入し, cyclin D1 の発現量を mRNA およびタンパク質レベルで調べたところ，sgRNA による cyclin D1 の発現抑制効果は標的部位ならびに sgRNA の構造に依存することがわかった。また，sgRNA はトランスフェクション試薬を用いなくても，細胞内に取り込まれ，cyclin D1 の発現を抑制することが示された。さらに，効果的な sgRNA の導入は，Rb のリン酸化抑制，細胞周期の G1/G0 期停止，DNA 合成の低下およびアポトーシス関連酵素カスパーゼ 3/7 活性の増加を誘導した。また，sgRNA の導入は，抗癌剤であるシスプラチンによる HSC-3 細胞の殺細胞効果をさらに増強することがわかった。

審査にあたり，まず副査の畠山教授から，sgRNA による cyclin D1 発現抑制とアポトーシス誘導との関連性についての質問があった。申請者は，「cyclin D1 の過剰発現が抗アポトーシス蛋白である Bcl-2 の発現を増加させ，ひいては caspase3 の活性が抑制される」ならびに「cyclinD1 の発現抑制が Bcl-2 の減少を介して caspase3 を増加させる」との既報を取り上げ，本研究においても同様の機序によりアポトーシスが誘導された可能性があるとの回答をした。

副査の廣瀬教授から，7 ヌクレオチド程度の短い sgRNA の標的 mRNA に対する特異性について質問があり，申請者は以下の回答を行った。RNA 切断酵素である tRNseZL は導入された短鎖 sgRNA とその対合 mRNA 配列に加えて近傍の T-stem-loop 部分も同時に認識する。従って，実際には十数ヌクレオチドが認識配列となることから，短鎖 sgRNA であっても十分高い特異性を有すると考えられる。また，tRNaseZL と sgRNA の細胞内局在についての質問があった。申請者は，tRNaseZL と sgRNA の細胞内局在の検討は今後の課題であると答えた。

副査の佐邊教授は，多くの癌種で cyclin D1 が過剰発現しているが過剰発現が必ずしも癌化に関与していないことを指摘し，この事実を踏まえた上で，あらためて本研究で cyclin D1 を治療の標的に選択した理由について尋ねた。この質問に対して，まず申請者は，頭頸部癌の一部では cyclinD1 の発現レベルと予後の間に逆相関関係があることを示す論文を紹介した。そして，この事実に基づき，cyclinD1 の発現抑制が癌細胞の増殖をはじめとする悪性形質の抑制に結びつくと着想し，本研究を行ったと回答した。

主査の濵田准教授から，sgRNA の臨床応用への可能性および課題について質問があった。申請者は，培養系の実験ではあるが，sgRNA と抗癌剤との併用による抗腫瘍活性がそれぞれ単独で使用した場合に比べより高かったことから，これらの併用は臨床応用へと道を開かせる可能性があると回答した。あわせて，現時点では sgRNA の細胞への取り込み機構の詳細が不明であり，また副作用などについても調べていないことから，臨床応用にはさらなる検討が必要であることにも言及した。

本論文は，頭頸部癌の生物学的理解を深め，頭頸部癌の診断・治療に新たな展開を導くものと期待される。

審査員一同は，これらの成果を評価し，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充分な資格を有するものと判定した。