HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	化学療法耐性卵巣癌に対するEZH2阻害剤の相乗効果に関する検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	遠藤, 大介
Description	配架番号：2282
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12541号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65999
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Endo_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　生殖内分泌・腫瘍学分野　　博士(医　学)　　氏 名　　遠　藤　大　介

	主査	教授　近　藤　　亨
審査担当者	副査	教授　櫻　木　範　明
	副査	教授　篠　原　信　雄
	副査	教授　秋　田　弘　俊

学 位 論 文 題 名

化学療法耐性卵巣癌に対する EZH2 阻害剤の相乗効果に関する検討
(Studies in the synergistic effect of EZH2 inhibitor on chemoresistant ovarian cancer)

本学位論文はエピジェネティクス異常と卵巣癌の予後との関連の中で、化学療法後の臨床検体におけるEZH2発現亢進が予後不良と相関することを示し、卵巣癌細胞株を用いた*in vitro*および*in vivo*の解析により、特異的EZH2阻害剤とパクリタキセル（PTX）併用群で単剤投与群よりも統計学的に有意な腫瘍抑制効果を示し、治療終了後も効果が持続することが示唆された。

審査にあたり，まず副査の櫻木範明教授から、選択的EZH2阻害剤はこれまで複数開発され、臨床試験段階の薬剤もあるなかで、この研究ではまだ動物実験段階のGSK343を用いて検討を行ったのはどういった理由からかという質問があった。申請者は、GSK126が第1相、Tazemotostatは第1/2相臨床試験の段階であるが、いずれも悪性リンパ腫、悪性ラブドイド腫瘍を対象とし、単剤投与での試験であること、また、卵巣癌における作用機序や他剤との併用効果あるいは既存薬剤の耐性解除効果は明らかにされていないことから、GSK343に関する研究には新規性があると考えたためと回答した。また、今回選択した臨床検体については、自然耐性、獲得耐性を分けて検討した方が良いのではないかとの質問に対しては、今回は症例数の関係からどちらも含めて解析を行ったが、EZH2等の発現態度に双方で違いがある可能性はあり、厳密には分けて考えるのが妥当かもしれず、今後の検討課題としたいと回答した。

副査の篠原信雄教授からは、MTT細胞障害性アッセイの結果について、PTXが0のときでも細胞の生存率に差があるようだが、最初から細胞の生存に差があるものを比較しているのではないかという質問に対して、各種細胞培養は、24時間のGSK343単剤処理の後に各濃度のPTXを加えており、PTXが0の点はGSK343単剤を0 μM、1 μM、5 μM、10 μMで用いた場合の比較である。この結果からGSK343の濃度依存的な細胞障害性が示唆されると回答した。*In vivo*でGSK343単剤の効果も検討されているが、*In vitro*、*In vivo*の両方で、GSK343単剤の効果は期待できるかと

の質問に対して、卵巣癌での検討は少ないものの、EZH2阻害剤単剤での効果は既報でも示されており、今回の検討でも単剤の効果は有意ではないもののある程度期待できると考えられる。臨床で用いる場合には、すでにファーストラインとしてTC療法（カルボプラチン＋パクリタキセル）を行っている患者で、セカンドラインとしてパクリタキセル単剤等へのEZH2阻害剤併用を想定していると回答した。

続いて副査の秋田弘俊教授からはリンパ腫ではEZH2変異がある腫瘍を対象として阻害療法の開発が進められているが、卵巣癌で変異、あるいは遺伝子増幅による過剰発現の報告はあるかという質問があり，申請者はホットスポットであるY641の変異は卵巣癌での報告はないが、過剰発現は報告があるため、阻害が治療につながると考えられると回答した。また、同一患者の化学療法前後の組織で、EZH2の発現には変化があったかという質問に対して、治療前、後双方でEZH2は7割程度の頻度で発現しており、化学療法後に発現強度が増強した症例、逆に低下した症例はそれぞれ若干名であったが、一定の傾向は見られなかったため、個々の症例で化学療法後にEZH2発現が増強するかを統計学的に議論することは難しいと回答した。さらに、H3K27トリメチル化抑制の検討で、RMG-1はARID1A野生型とのことであったが、他の細胞株についてはどうかという質問に対して、今回はARID1A変異に関しては解析を行っていないが、明細胞癌では半数に変異があり、変異の有無がEZH2阻害剤適応のためのバイオマーカーになる可能性があるため、今後の検討課題としたいと回答した。

最後に主査の近藤亨教授からEZH2をノックダウンするとどうなるかという質問があり，申請者は本研究ではノックダウンは行っていないが、文献的に、阻害剤と同様の抗腫瘍効果が報告されていると回答した。では、SWI/SNF複合体も分子機能としては重要であるが今回の検討からは癌形質を維持する上での主たる要素がEZH2であると考えてよいだろうとのコメントがあった。続いて、免疫染色の陽性細胞が癌細胞であることの証明はどう考えるかという質問に対して、今回はAE1/AE3などの上皮マーカーでの評価は行っておらず、HE染色で癌細胞の有無、局在を評価したのちに免疫染色に進んだと回答した。また、BRG1免疫染色で、ある種の癌で欠損するとのことだが、スライド12で癌細胞に染まっているのはどう考えるかとの質問に対して、BRG1とINI1は、腫瘍、正常細胞に関わらずかなりの頻度で核に陽性となり、癌抑制遺伝子と考えられているため、逆に発現欠損部分がある腫瘍において予後が悪いと考えられていると回答した。PTX耐性細胞株の維持方法は親株と異なるかとの質問に対しては、抗癌剤耐性株は、耐性維持のためにその薬剤を低濃度で継続して添加する場合があるが、今回は、薬剤添加せず継代を続けても獲得した耐性は減弱しなかったと回答した。cDNAマイクロアレイの結果で、*BAI1*という遺伝子に注目しているようだが、どのような機能を持った遺伝子かとの質問に対して、Brain angiogenesis inhibitor 1という名称で、脳血管新生を阻害する癌抑制遺伝子の一つとされるが、具体的な生理活性機能は未知であり卵巣癌における機能を述べている文献も見られなかったと回答した。BAI1が分泌タンパクなのか膜タンパクなのかあるいは細胞内で他の因子の発現調節を行っているのかという点が、今後の展開を考えていくうえで重要ではないかとの指摘があった。

この論文は，EZH2阻害剤とPTXが卵巣癌細胞に対して相乗的に抗がん作用を発揮することを明らかにしており、今後の臨床応用が期待される。

審査員一同は，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充分な資格を有するものと判定した。