氏　　名	今西　真実子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	博甲第　９１７７　号
学位授与年月	平成　３１年　３月　２５日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	MDM4 高発現消化器癌における *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンによる 5FU の効果増強について
主　　査	筑波大学教授　　博士（医学）西山　博之
副　　査	筑波大学准教授　博士（医学）川口　敦史
副　　査	筑波大学准教授　博士（医学）坂東　裕子
副　　査	筑波大学講師　　博士（医学）榎本　剛史

論文の内容の要旨

今西真実子氏の博士学位論文は、MDM4 高発現消化器癌における *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンによる 5FU の効果増強について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

著者はまず癌抑制遺伝子である *TP53* 遺伝子と、その機能を抑制する癌遺伝子 *MDM2*、*MDM4* についての先行研究を概観し、これらの発現が高い腫瘍では抗腫瘍剤への感受性の低下することやその反面、これら癌遺伝子の機能抑制は p53 活性化を介した抗腫瘍効果を示し、治療への応用が期待されていることを述べている。著者らは野生型 *TP53* を有する様々な腫瘍培養細胞において合成オリゴ核酸からなる DNA 修飾キメラ型 siRNA（chiMDM4、chiMDM2）を細胞内に導入し RNAi 干渉によって *MDM2・MDM4* の発現を配列特異的に同時に抑制することで、高い抗腫瘍効果が得られることを明らかにしている。一方で、実臨床において 5FU が胃、大腸癌を含む様々な癌に対して有効とされているが、しばしば効果は十分でなく、抵抗性を示す症例もあることから、これらの問題を解決するために新たな治療戦略が求められている現状を指摘している。そして本論文では、野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現である胃・大腸癌細胞株に対して chiMDM4、chiMDM2 を用いた *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンによって 5FU の抗腫瘍効果が増強できるか否かを検討し、さらに動物モデルを用いて chiMDM4+chi MDM2 の有効性と 5FU を併用した場合の効果についても検証することを目的としている。

（方法と対象）

実験の方法として野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現である胃癌細胞２種（SNU-1、NUGC4）と大腸癌細胞２種（HCT116、LoVo）を用いて、chiMDM4+chiMDM2 及び 5FU を投与し抗腫瘍効果の増強を WST-8 で検証している。また、免疫ブロット法による関連蛋白の発現解析とフローサイトメトリー(FACS)による細胞周期解析を行い、抗腫瘍効果増強の作用機序についても検証されている。さらに、培養細胞実験で使用した大腸癌細胞（HCT116）を用いて皮下異種移植モデルを作成し、chiMDM4+chiMDM2 及び 5FU を投与し動物モデルにおける抗腫瘍効果を検討している。

（結果）

実験結果において、まず WST-8 では、すべての細胞株において *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンにより 5FU の抗腫瘍効果が増強することを明らかにしている。特に HCT116 では優れた相乗効果が認められ、NUGC4 でも相乗効果が認められている。LoVo と SNU-1 では相加効果が認められている。免疫ブロット法では、各細胞における *MDM4・MDM2* のノックダウンや 5FU 投与により誘導される p53、p21、PUMA の発現レベルの比較を行っている。細胞別に関連蛋白発現の抑制あるいは増強の程度に違いは見られているが、いずれの細胞でも共通して *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンと 5FU の併用により p53 の発現増強を明らかにしている。相乗効果を示した HCT116、NUGC4 と相加効果であった LoVo、SNU-1 の比較では、相乗効果を示した 2 種細胞株の方が MDM4 の発現レベルが強く、さらに 5FU による MDM2 の誘導が強く起こっていることを明らかにしている。FACS による細胞周期解析では、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンにより G1 期の停止、5FU の投与により S 期の停止を認め、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンと 5FU の併用により sub G1 期として観察されたアポトーシス細胞の増加と G1 期停止の増強を明らかにしている。HCT116 の皮下異種移植腫瘍を作成して行われたマウスの *in vivo* 実験では、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンあるいは 5FU の投与により腫瘍増殖が抑制され、これらを併用することで最も強い有意な腫瘍増殖抑制効果を明らかにしている。

（考察）

本論文では、野生型 *TP53* かつ MDM4 高発現である大腸癌、胃癌に対して *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンが、5FU の抗腫瘍効果を増強することを明らかにしている。5FU の p53 を誘導すると同時にネガティブフィードバック機構により MDM2 発現を増強しているところに、chiMDM4+chiMDM2 を用いてノックダウンすることによって、この機序を断ち切り併用効果を発揮するものと考えられている。細胞によって 5FU の抗腫瘍効果を chiMDM4+chiMDM2 が増強する程度が異なる原因として、まず MDM4 の発現程度と関連していると考えられている。相乗効果が見られた HCT116、NUGC4 では相加効果であった SNU-1、LoVo よりも MDM4 の発現レベルが高く、これらの細胞では腫瘍増殖や生命維持を MDM4 に、より強く依存している可能性を指摘している。また、相乗効果が見られた HCT116、NUGC4 では 5FU による MDM2 の誘導が強いことも MDM2 をノックダウンすることによる影響が大きくなる要因と考えられている。chiMDM4+chiMDM2 と 5FU の併用においては p53 の誘導とともに細胞周期の G1 期停止が生じており、これは使用した 4 種類のすべての細胞に共通していることも明らかにしている。5FU の S 期の停止作用は HCT116 に顕著にみられていたが、chiMDM4+chiMDM2 の併用では G1 期停止に収束しており、併用による p53 の強い誘導により 5FU の細胞周期に関わる作用機序が変化する可能性についても示唆されていた。

（結論）

TP53 野生型かつ MDM4 高発現である消化器癌に対して *MDM4・MDM2* の同時ノックダウンは 5FU の抗腫瘍効果を増強することを明らかにし、5FU と *MDM4・MDM2* をターゲットとした siRNA 薬の併用が新たな治療戦略となる可能性があるとして結論づけられている。

審査の結果の要旨

（批評）

本研究は、新規治療法の開発が急務である MDM4 高発現消化器癌を対象として、*MDM4・MDM2* の同時ノックダウンによる 5FU の効果増強を明らかにした点が高く評価される。特にこの効果増強機序として TP53 の変異の有無がバイオマーカーとなる可能性も見出しており、5FU と *MDM4・MDM2* をターゲットとした siRNA 薬の併用が新たな治療戦略の確立の基盤構築に役立ち、臨床応用への可能性が強く期待される。

平成 30 年 12 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。