

氏 名	田 巻 佐和子
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 657 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	染色体不安定性と関連する non-coding RNA と薬剤感受性についての検討
論文審査委員	(委員長) 教授 北 山 丈 二 (委 員) 教授 山 口 博 紀 講師 坂 下 英 司

論文内容の要旨

1 研究目的

正常細胞では、細胞分裂の際に均等に染色体を分配することで染色体数を維持するための機構がある。一方でがん細胞の多くは、細胞内に異常な数の染色体が存在する「異数性」を示すことが知られている。正常な染色体の分配ができないことで、染色体の数に変化に起こる現象である。染色体不安定性(chromosomal instability: CIN)は、染色体の全体または大きな領域の増減(異数性)、構造的な再配列、増幅や欠失などの局所的な異常といった染色体異常の頻度が高いことを特徴としている。がんの 70-95%は CIN に起因する染色体異常を有すると推定されている。

多くの研究で、CIN と薬剤感受性との関係性が検討されてきたが、一定の知見は得られていない。CIN によって、がんの多様性や不均一性が進むことで、がんの悪性度が増し、様々な抗がん剤やホルモン剤などの薬剤耐性に強く関与しているという報告がある一方で、染色体分配に関わる遺伝子の変異の発現が高いがん細胞株は、低いものに比べてトポイソメラーゼ I 阻害剤に対する感受性が高いという報告もある。

トポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカンは大腸癌の治療において重要な抗がん剤の一つである。大腸癌はマイクロサテライト安定性(microsatellite stable: MSS)とマイクロサテライト不安定性(microsatellite instability: MSI)に大別されるが、大腸癌の化学療法の治療選択において、MSI かどうかは重要な要素となる。

本研究では、MSS と MSI のマウスの大腸癌細胞株を用いて、ヒトのサテライトアルファに相当する、マウスのメジャーサテライトから発現するメジャーサテライト転写産物 (mSAT) の過剰発現細胞を作成し、トポイソメラーゼ I 阻害剤の感受性を高めるかどうかを検討することとした。

2 研究方法

サテライト RNA の過剰発現によって誘導される染色体不安定性が薬剤感受性にどのような影響を及ぼすのかを検討するために、マウスの大腸癌細胞株を用いた。CT26 細胞はマイクロサテライト安定性の細胞株で、MC38 細胞はマイクロサテライト不安定性の細胞株である。これらにレトロウイルスベクターを用いて、マウスのペリセントロメアに存在するメジャーサテライト配

列を導入し、メジャーサテライト転写産物（major satellite transcripts：mSAT）の過剰発現細胞を作成した。

mSAT 過剰発現の影響を検討するため、細胞の増殖能や足場非依存性増殖能を確認し、染色体不安定性との関連を評価するため、染色体分配異常と DNA 細胞障害と免疫細胞化学によって確認した。さらに、それらの細胞を用いて、CPT-11 感受性の評価を、WST-1 assay を用いて行ない、mSAT 過剰発現による薬剤感受性の評価を行った。

3 研究成果

メジャーサテライト配列を、レトロウイルスベクターを用いてマウス大腸癌細胞株 CT26 細胞と MC38 細胞に導入し、mSAT の過剰発現を RT-qPCR 確認し、コントロールと比べて有意に上昇していることを確認した。次に mSAT 過剰発現細胞の細胞増殖や足場非依存性増殖能について評価したが、有意な差はなかった。

mSAT 過剰発現によって染色体不安定性が誘導されるか、有糸分裂異常や micronuclei, anaphase bridge の頻度で評価した。有糸分裂異常と anaphase bridge の頻度は mSAT 過剰発現細胞でいずれの細胞も有意に頻度が高かった。Micronuclei では有意な差はなかったが、mSAT 過剰発現細胞で頻度が高い傾向にあった。さらに、DNA 損傷応答を γ H2AX の免疫染色で確認したところ、コントロールと比較して mSAT の過剰発現細胞で有意に γ H2AX 陽性細胞が増加したのを確認した。

CPT-11 の感受性の評価は、CPT-11（最終濃度：0.1,0.3,1.0,3.0,10.0 μ M）を作用させ、CPT-11 投与後 48 時間後に WST-1 assay を用いて生存率を確認して薬剤感受性を評価した。CT26 細胞および MC38 細胞の細胞増殖は、それぞれ用量依存的に阻害されていた。50%阻害濃度を用量反応曲線より算出し、統計学的に比較したところ、mSAT の過剰発現により、コントロールの細胞と比較して、MC 38 細胞に対する CPT-11 の薬剤感受性は上昇した(IC₅₀: コントロール: 0.814 μ M vs mSAT : 0.332 μ M in MC38 cells, $p = 0.003$)。一方で CT26 に対しては上昇しなかった (IC₅₀: コントロール : 0.260 μ M vs. mSAT : 0.256 μ M, $p = 0.955$)。MC38 細胞に対する CPT の薬剤感受性は有意に増強されたのに対し、CT26 細胞では有意な差は認められなかった。

4 考察

今回の検討で用いた CT26 細胞と MC38 細胞は同様に染色体分配異常や DNA 損傷応答を誘導されていたが、CT26 細胞では薬剤感受性に差を認めず、MC38 細胞のみで感受性が高まった。CT26 細胞はマイクロサテライト安定性の癌細胞株であり、もともと CPT-11 に対する薬剤感受性も高く、CT26 細胞のコントロールの細胞 IC₅₀ は 0.260 μ M であった。一方で MC38 細胞のコントロール細胞の IC₅₀ は 0.814 μ M で CT26 細胞に比べて MC38 の薬剤感受性が低かった。CT26 細胞はもともとの薬剤感受性が高かったため、mSAT 過剰発現による染色体分配異常の増加や DNA 損傷応答の影響を受けにくく、薬剤感受性に差が出なかったと考えられた。一方でもともと CPT-11 に対する薬剤感受性の低い MC38 細胞では、mSAT による影響を受けて薬剤感受性が高まったと推察する。

mSAT 過剰発現によって MSI を有するマウス大腸癌細胞株 MC38 の染色体分配異常と DNA 損傷応答を誘導するとともに、CPT-11 の感受性を高めたが、細胞死に至るまでのメカニズムにつ

いては不明な点も多く、今後も更なる検証が必要である。

5 結論

マウスの大腸癌細胞株においてサテライト RNA を過剰発現させると、染色体分配異常の増加と DNA 損傷応答の亢進を誘導され、CIN に関連することが示唆された。さらにマイクロサテライト不安定性(MSI)を有する MC38 細胞株に対しては、サテライト RNA の過剰発現がトポイソメラーゼ I 阻害剤の薬剤感受性を高めることが示された。

論文審査の結果の要旨

研究内容

2 種類のマウスの大腸癌細胞株を用いて、サテライトアルファの転写産物であるサテライト RNA を過剰発現させると、染色体分配異常の増加と DNA 損傷応答の亢進が誘導されることを示し、結果として癌細胞の染色体不安定性に関連する可能性があることが示された。特に、マイクロサテライト不安定性(MSI)を有する MC38 細胞株においては、サテライト RNA の過剰発現がトポイソメラーゼ I 阻害剤の薬剤感受性を高めることが示され、サテライト RNA の発現と抗癌剤感受性との間に何らかの関連性がある可能性が示唆された。

学問的意義、新規性、独創性

がんの病態におけるサテライト RNA の役割に関しては未知な部分が多く、本研究の独創性は評価できる。一方、得られたデータは乏しく、サテライト RNA の機能のごく一部を見ているだけの留まっており、新規性は少ないと言わざるを得ない。

問題点および改訂

申請者自身が、RNA:DNA hybrid(R loop)形成や RNA-protein 複合体(RNP)などの染色体不安定性に関する基礎的事項や non-coding RNA の過剰発現という方法論に関して十分理解できておらず、人工的な実験系で薬剤を用いた結果を単純に臨床に応用する形の結論を出していた点で明らかな誤りがあった。また、実験内容に関する記述に著しい不備が認められ、審査員から大幅な改訂が要求された。

学位論文についての評価と可否の判断結果

本論文は、実験の質、論理的思考力の点で学位のレベルに十分に達しているとは言えないが、審査員の指摘事項には適正に対応できていたため、英文論文が受理されることを前提として合格と判定する。

最終試験の結果の要旨

研究の背景・目的・方法・結果・考察：必要十分な内容とは言えなかった。

今後の研究についての展望：示すことはできていた。

質疑：内容は正しく理解していたが、適切な応答は出来てはいなかった。

研究に関連する周辺領域の知識：十分とはいい難かった。

研究能力及び科学的素養・態度：修正作業を経て、学位に値すると判断した。