

氏 名	關 根 沙 知
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 683 号
学位授与年月日	令和 5 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	新生児期の細胞特性へのアプローチの試み
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 市 橋 光 (委 員) 教 授 大 城 久 准教授 魚 崎 英 毅

論文内容の要旨

1 研究目的

小児期の臓器の未熟性の特徴については以前から研究が進んでおり、臨床現場では活用されている。しかし、新生児期・小児期の細胞特性についての研究は進んでおらず、メカニズム解明は十分には行われていない。今回我々は、新生児期の細胞レベル・分子レベルの特徴を一つでも明らかにすることで小児疾患の治療の一助となることを目指し、いくつかのアプローチでその解明を試みた。

オリゴヌクレオチドマイクロアレイにより新生児期に優位な候補遺伝子を絞り込み、この候補遺伝子の解析を行うこととした。細胞の未熟性・幼若性を評価する確立した簡便な実験方法がないため、『細胞老化の負の調節因子』に着目して、研究を組み立てることとした。また、小児がん細胞は成熟が止まった状態と考えられていることから、小児がんは新生児期の特性を残している可能性がある。そのため、小児がんで候補遺伝子の機能評価を行うことは、新生児期の特性につながる可能性があると考えた。

以上より、抽出した遺伝子における細胞老化抑制の効果と小児がん細胞での候補遺伝子の機能・役割の評価を行うことは、新生児期の細胞特性の評価につながると考え、本研究を行った。

2 研究方法

マイクロアレイ解析に基づいて新生児期に発現の高い遺伝子を選択し、免疫組織化学的検討およびウエスタンブロット法によって候補遺伝子の絞り込みを行った。候補遺伝子として Igf2bp3(Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3) と Snai2(snail family transcriptional repressor 2)を抽出した。マウス胎仔線維芽細胞 NIH3T3 細胞、マウス成体線維芽細胞 L929 細胞を用いて、候補遺伝子をノックダウンもしくは過剰発現させ、VP-16(Etoposide)を用いた DNA 損傷下での老化関連アッセイ SA-β-GAL(senescence-associated beta-galactosidase)、p53(gene symbol; Trp53) および p21(gene symbol; Cdkn1a)の発現を評価した。Igf2bp3 に関しては液-液相分離 (liquid-liquid phase separation : LLPS) によって形成される膜のない細胞内構造であるストレス顆粒 (stress granules : SG) の構成要素として機能するという特徴を有していることから、緑色蛍光タンパク質(GFP ; Green Fluorescent Protein)にて標識した Igf2bp3(Igf2bp3-GFP)を用いて、Igf2bp3-GFP を過剰発現した L929 細胞および NIH3T3 細胞

胞で SG の特徴であるドット状形成の観察を行った。

また臨床応用として、ヒト神経芽腫細胞を用いて評価を行った。Igf2bp3 のノックダウンを計画したが、抑制できなかった。そのため、Igf2bp3 が N6-メチルアデノシン(m6A RNA)のリーダーとして働くという特徴を利用し、m6A RNA の主要なメチル基転移酵素である METTL3 を制御した時の SA-β-gal 活性と p53・p21 の発現の評価を行った。

3 研究成果

Igf2bp3 と Snai2 は、新生仔期に高い発現を示す遺伝子として検出され、免疫組織化学的検討およびウエスタンブロット法でも新生仔期の優位性が確認できた。成体細胞を用いて Snai2 を過剰発現させた場合、VP-16 によって誘導される細胞老化においては抑制効果を認め、胎仔細胞での siRNA を介した Snai2 のノックダウンでは、細胞老化を有意に増強した。一方で、Igf2bp3 に関しては、過剰発現もしくはノックダウンによる細胞老化への有意な影響は認めなかった。そのため、成体細胞と胎仔細胞に対して Igf2bp3-GFP を強制発現させ蛍光観察すると、SG の特徴であるドット状形成が成体細胞よりも胎仔細胞でより明確に観察された。またドット状構造の蓄積は VP-16 投与下でより増加し、対照的に 1,6-ヘキサンジオール処理で減少することが確認できた。臨床への応用として、神経芽腫細胞を用いた検討では、METTL3 のノックダウンの状態下において、VP-16 を投与すると細胞老化が誘発されるとともに、TP53 の発現が増強することが示された。

4 考察

Snai2 の機能解析においては、Snai2 の強制発現時に成体細胞で DNA 損傷後に誘発される細胞老化の減弱作用が明らかになった。さらに Snai2 をノックダウンした場合、胎仔細胞で DNA 損傷によって誘発される Trp53 の発現が増強された。以前の報告では、SNAI2 欠損細胞は DNA 損傷に対して放射線感受性であることや MDM2(a ring-finger-containing E3 ligase that ubiquitinates Slug, Double minute 2 protein)を誘導することによって TP53 の分解を促進することが示されている。Snai2 においては本研究でも過去の報告に沿った結果が得られているが、細胞老化抑制と関連づけての報告は初めてである。

また Igf2bp3 の機能解析においては、各新生仔期の臓器で高い発現を認めていたが、細胞老化の観点ではその機能は示せなかった。そのため、SG に注目し、Igf2bp3-GFP を強制発現させて蛍光観察をした。SG は mRNA の翻訳と安定性の調節に関与しているが、成体細胞よりも胎仔細胞で多くの SG を誘導する傾向にあった。今後、定量的評価を行うことで、Igf2bp3 の機能評価につながる可能性が示唆された。

神経芽腫は小児によくみられる固形腫瘍の一つで、集学的治療を行っても予後不良なものから、自然退縮するものまで経過は様々で、高リスク群においては現在も新しい治療法が望まれる疾患である。METTL3 のノックダウンの研究においては、DNA 損傷下にあるヒト神経芽腫細胞では細胞老化と TP53 活性化が誘導され、METTL3 の抑制が VP-16 の効果を強める可能性が示された。癌生物学的な側面においては、METTL3 がより高く発現している膀胱癌細胞では化学療法および放射線療法への耐性を示し、癌細胞の増殖と浸潤を促進しているとの報告もある。以上より METTL3 は神経芽腫において治療標的となる可能性が示された。

5 結論

新生児細胞の特性という、確立した評価方法のない分野において、複数のアプローチを通して、細胞特性の解明を試みた。結果として METTL3 や新生児期に発現する SNAI2 が細胞老化を抑制している可能性を示した。すなわち、新生児期に発現する遺伝子の一部は細胞老化の負の調節因子であると考えられる。本研究により、新生児期細胞の分子レベルの特徴の一端を示すことができたと考えている。

論文審査の結果の要旨

本研究は、新生児期の細胞レベル・分子レベルの特徴を一つでも明らかにすることで、小児期疾患の治療への一助となることを目指して行ったものである。具体的方法は、まず新生仔期および、10 週齢の成体マウス大腸組織にマイクロアレイ解析を行い、新生仔期優位に発現する遺伝子から Igf2bp3 および Snai2 に着目した。マウス成体線維芽細胞 L929 細胞、マウス胎仔線維芽細胞 NIH3T3 細胞、ヒト神経芽腫細胞 SK-N-MC 細胞を用いて、過剰発現およびノックダウンにより Igf2bp3 と Snai2 が Etoposide に対するストレス応答（あるいは細胞老化）に保護的に働いていることを検討した。その結果、SNAI2,IGF2BP3,METTL3 は細胞の未熟性の調整に関与している可能性があることを示した。

申請者が示したこれらの結果は、新生児期に優位に発現する遺伝子の一部が細胞の未熟性の維持に寄与し、細胞老化を抑制している可能性を示すものであり、学術的な新規性や独創性が認められ、それゆえに学位論文に値するものとする。

論文審査では、研究方法や論文の書き方について、基本的問題点を含む多くの重要な指摘がなされた。主なものとして、①タイトルを「新生児期の細胞特性のアプローチ」としているが、細胞特性まで明らかにしているわけではなく、タイトルの変更が必要であること、②「細胞の未熟性」がキーワードとして用いられているが、その定義がされていないこと、③実験の再現性への疑問や定量的なデータ解析の不足、④統計学的手法の再考、⑤目的や結論、図表の明瞭な記載の必要性、があった。

その後、2 度の再提出を経て、論文の改変が行われた。材料と方法について詳細に記載され、研究の目的と考察も明確化された。統計学的手法もノンパラメトリックな多群間の比較法に改められた。しかし、定量的な解析データや遺伝子発現経路を証明するデータの不足は解決されず、今後の課題として表記することとなった。最終的には、全員一致で合格と判定した。

最終試験の結果の要旨

本学位論文では、新生仔期および 10 週齢の成体マウス大腸組織にマイクロアレイ解析を行い、新生仔期優位に発現する遺伝子から、Igf2bp3 および Snai2 に着目し、研究を行ったものである。結果として、①マウス成体線維芽細胞 L929 では、Snai2 の過剰発現は VP-16 投与で誘発される SA- β -GAL 活性を減弱させる、②マウス胎仔線維芽細胞 NIH3T3 では、Snai2 のノックダウンは VP-16 投与で誘発される SA- β -GAL 活性を増強させ、また、Tp53 と Cdkn1a の発現を増強させ

る、③マウス成体線維芽細胞 L929、およびマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 いずれにおいても、Igf2bp3 の過剰発現は生体分子凝集形成を促し、さらに、VP-16 投与下では生体分子凝集形成をより促進させる、④ヒト神経芽腫細胞 SK-N-MC では、METTL3 ノックダウンは VP-16 投与で誘発される SA- β -GAL 活性を増強させ、また、Tp53 の発現を増強させることを示した。その結果、SNAI2,IGF2BP3,METTL3 は細胞の未熟性の調整に関与している可能性があることを論じた。

申請者が示したこれらの結果は、新生児期に優位に発現している遺伝子が細胞の未熟性の維持に寄与し、細胞老化を抑制している可能性を示すものであり、学術的な新規性や独創性が認められ、それゆえに学位論文に値するものと考ええる。

論文のプレゼンテーションは適切なスライドを用いた分かりやすいものであり、論文以上に研究の理解が深まった。その後の質疑応答では、研究の方法について多くの問題点が指摘された。それは、申請者が基礎研究を始めたばかりであることが理由の一つであろうと思われる。これらの指摘に対し、申請者は真摯に回答したが、内容が不十分な点もあった。

その後、委員の間で最終試験の評価が話し合われた。質疑に対する応答では、内容が不十分な場面もあったが、申請者の研究に対する情熱も感じられ、全員一致で合格と判定した内容が十分でない点もあるため、論文の改訂を求めることとなった。なお、2 度の再提出となった論文はよく改善されていたが、定量的な評価ができていないことや細胞老化を制御する経路に関する検討が不十分であることは、研究の限界として今後の課題とする、と論文に記載することになった。