

別紙1-1

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	甲	第	号
------	---	---	---	---

氏 名 山下 顕

論 文 題 目


Thymidylate synthase inhibitor raltitrexed can induce high levels of DNA damage in *MYCN*-amplified neuroblastoma cells

(チミジル酸シンターゼ阻害剤ラルチトレキセドは *MYCN*増幅型神経芽腫細胞の DNA 損傷を大幅に誘発させる)

論文審査担当者

名古屋大学教授

主 査 委員

岡島 徹也 

名古屋大学教授

委員

豊岡 伸哉 

名古屋大学教授

委員

高橋 義行 

名古屋大学教授

指導教授

明松 健治 

論文審査の結果の要旨

別紙1-2

今回 *MYCN* 増幅型神経芽腫細胞株に対する代謝拮抗剤の有効性及び *MYCN* 増幅の有無による代謝拮抗剤の作用の違いの原因が究明された。試験した代謝拮抗剤の IC_{50} 値は *MYCN* 正常型株と比較して *MYCN* 増幅型株で低値を示す傾向が認められ、代謝拮抗剤の中でも特にラルチトレキセド (RTX) では強力な細胞増殖抑制能が認められた。*MYCN* 増幅型細胞と *MYCN* 正常型細胞で RTX に対する感受性に違いが出たのは、RTX のトランスポーターや作用標的タンパク質の発現量が要因ではないことが確認された。一方で、各種の DNA 損傷マーカーの解析結果から *MYCN* 増幅型細胞において RTX に対する感受性が増加したのは、*MYCN* 増幅に起因する高い DNA 複製ストレス存在下で RTX 処理により dTTP 濃度が低下したことによって誘発された DNA 損傷レベルの上昇が原因であると示唆された。





本研究に対し、以下の点を議論した。

1. *MYCN* 増幅型と *MYCN* 正常型の神経芽腫細胞株を用いて、DNA 修復系遺伝子である UNG (Uracil DNA Glycosylase) 及び APEX1 (DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase) のタンパク発現量をウェスタンブロッティング法により評価した結果、*MYCN* 増幅有無によるタンパク発現量には大きな違いは見られなかったことから、他の DNA 損傷に関わる遺伝子の発現量に違いがある可能性が考えられる。
2. RTX 処理下での *MYCN* 増幅型細胞株と *MYCN* 正常型細胞株の Cleaved PARP (poly (ADP-ribose) polymerase) 及び Cleaved Caspase-3 の経時的な発現量を評価した結果、*MYCN* 正常型細胞株ではいずれの DNA 損傷マーカーも増加しなかったのに対して、*MYCN* 増幅型細胞株ではいずれも経時的に発現量が増加することが確認された。アポトーシスの過程において切断された Caspase-3 が増加し、また、それらにより PARP が限定分解されたと推察された。よって、代謝拮抗剤による細胞死の種類はアポトーシス死であると示唆された。
3. 神経芽腫の標準治療薬としてシクロホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、エトポシド等がある。シクロホスファミドは揮発性が高く、実験に用いる場合には健康への被害リスクが懸念されたため、本研究では用いられなかったが、*MYCN* 増幅型細胞株を用いてシスプラチン、カルボプラチン、エトポシドと RTX の IC_{50} 値を比較した結果、RTX の IC_{50} 値はそれらより低値を示した。よって、今回の研究対象である RTX は、現在治療に用いられている標準治療薬より強力な細胞増殖抑制能を有する可能性があることが考えられる。

本研究は、*MYCN* 遺伝子増幅がみられる高リスク神経芽腫患者に対する有効な治療手段を確立する上で、重要な知見を提供した。

以上の理由により、本研究は博士 (医学) の学位を授与するに相応しい価値を有するものと評価した。

試験の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第	号	氏 名	山下頭		
試験担当者	主査	岡島 徹也		副査 ₁	豊国 伸哉	
	副査 ₂	高橋 義行		指導教授	阿部 健治	
(試験の結果の要旨)						
<p>主論文についてその内容を詳細に検討し、次の問題について試験を実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. MYCN増幅有無によるDNA修復系遺伝子等の発現量の違いについて 2. 代謝拮抗剤による細胞死の種類について 3. 実臨床で用いられている標準治療薬との細胞増殖抑制能の比較について <p>以上の試験の結果、本人は深い学識と判断力ならびに考察力を有するとともに、分子生物学一般における知識も十分具備していることを認め、学位審査委員合議の上、合格と判断した。</p>						