

○司会 続きまして、山梨大学医学部医学科3年次生、加藤大貴さん、よろしくお願ひいたします。

○加藤 山梨大学医学部3年、小児科講座の加藤大貴です。

私が山梨大学リエゾンアカデミーのプログラムで行ってきたことを今日お話しします。

私は入学後すぐに行われた説明会でこのプログラムを知りました。大学入学前から漠然と医学研究に興味があったので、自分もできる機会があるとこのプログラムで聞き、このプログラムに参加しようと思いました。そして、幾つかの研究室を見学させていただきました。そして、今の研究室に所属しています。

私が現在所属して実験をさせていただいている山梨大学小児科講座は、臨床科の教室なんですけど、学生の実験を受け入れてくださり、先生や実験助手さんの力を日々借りながら実験を行わせていただいています。臨床科の教室で、基礎の教室とは少し雰囲気も違うと思いますが、将来自分が医師もしくは研究者として働いている姿を先生たちと重ね合わせながら、将来像を描きながら実験を行っています。

このスライドに示すように、今までの3年間でさまざまなことを経験してきました。写真は、去年行われた日本小児血液・がん学会での発表の様子です。初めての学会発表ですごく緊張するものでしたが、初めて医学研究を自分の目の当たりにすることで、将来像をさらに明確に描くことができるようになりました。

さらに、リエゾンアカデミーのプログラムの一つに、学内の冬季合宿というものがあります。これは、山梨県の富士五湖で行っているものですが、この合宿では講師をお招きして講演を行っていただいたり、普段は見ることもない教員の先生方の研究や人生経験のお話を聞きます。また、学生は自分の研究の成果を発表します。ここでは、普段は研究室に所属していると、ほかの教室の学生の様子は見ることができないのですが、この合宿によってほかの教室に所属している学生の研究成果も見ることができ、学年を越えたつながりもここでできます。

また、さらに関東研究医養成コンソーシアムというものがあります。これは学内だけではなく、学校間で学生の交流を行います。関東研究医養成コンソーシアムとは、関東、関東といっても、北は北海道から神奈川までの医学部で研究を行う学生が集まり、研究成果を発表します。今年度は群馬県の伊香保温泉で開催されました。この写真は、そのときに山梨大学の同じ学年の3年生の同期で撮った写真です。このように各大学5、6名から参加しています。来年は山梨県で行うので、みんな頑張って研究を行っています。ここでは研究成果の発表はもちろんなのですが、他大学との学生の交流を活発に行うことができます。その結果、研究という同じ志を持った仲間として、学校内だけでなく学校間で学生の友情が生まれます。

ここまでがリエゾンアカデミーで私が経験したことです。

これからは、私がこれまで研究してきたものを発表したいと思います。

急性リンパ性白血病というのは、小児がんで最も多いものです。主に抗がん剤による化学療法の進歩で、約8割以上の症例が治癒するようになりましたが、さらなる治療成績の向上が求められています。

小児急性リンパ性白血病（AAL）の各症例においては、薬剤感受性が異なります。薬剤感受性は、薬剤の取り込み低下などによって規定されます。また、各症例において遺伝子多型といった個体差が存在し、この遺伝子多型が薬剤の感受性を規定する因子と関連します。このように各症例の遺伝子多型によって感受性が異なるのです。従って、各症例を薬剤感受性の観点から見直したオーダーメイド医療を確立することで、治療成績のさらなる向上につながると考えられます。

今回の解析では、薬剤感受性の薬剤としてAALの基本治療薬の一つであるメトトレキサート（MTX）を用い、遺伝子多型として、ジヒドロ葉酸還元酵素とチミジル酸合成酵素の遺伝子多型に注目しました。この遺伝子多型とこの酵素について、これからスライドで詳しく説明します。

メトトレキサートの作用機序ですが、ジヒドロ葉酸還元酵素とチミジル酸合成酵素の拮抗することで、DNA合成を阻害して抗白血病効果を発揮します。そのため、DHFRとTYMSの発現量というものがMTX感受性と関連すると考えられ、この2つの酵素をコードする遺伝子の発現制御領域にある遺伝子多型がMTX感受性と関連すると考えられます。

そこで、DHFR遺伝子においては19塩基の欠失多型に注目しています。19塩基の欠失多型の中には、基本転写因子のSp1の結合配列を含んでいるので、欠失多型ではこの遺伝子の発現の低下が考えられます。従って、この発現が低下することによって、MTXの感受性が高まると考えられます。

TYMS遺伝子のほうでは、28塩基の反復配列の多型に注目しました。この反復配列の中には、E-boxといわれる転写因子の結合配列を含んでいるので、反復配列が多くなれば、発現の上昇の可能性が考えられ、その結果、MTXに対して耐性を示す可能性が考えられます。

従って、今回の解析の目的は、日本人由来のB前駆細胞型ALL細胞株を用いて、この2つの遺伝子多型によって、MTX感受性を予測し得るかということを検証するものです。従って、遺伝子発現、2つの遺伝子の発現とMTXとの感受性の関連、多型と遺伝子発現との関連、そして、多型とMTX感受性との関連を解析しました。

解析の対象としては、遺伝子多型の人種差の重要性を考慮して、日本人患者から樹立されたALL細胞株を用い、多型はPCR産物を電気泳動して確認しました。遺伝子発現はリアルタイムRT-PCR法で定量解析を行いました。MTX感受性はアラマーブルーアッセイでIC50値を用い決定しました。

MTX感受性の評価に用いたIC50値について説明します。縦軸が細胞の生存率、横軸がMTXのIC50をlog値で示しています。細胞の生存率が50%になるMTXの濃度を算出して、3回の解析の中央値をIC50としました。従って、IC50値が高ければ、MTXに対して耐性があるということになります。

まず、遺伝子発現レベルとMTX感受性です。DHFR遺伝子のほうでは、この左のグラフでは、IC50値を縦軸にDHFR遺伝子の発現レベルを横軸に取っています。このグラフでも分かるように右に優位な線の相関を示しています。また、このIC50値が、MTX IC50値が1マイクロモラー以下のものと、10マイクロモラー以上のものを分けたものが右です。それを分け、遺伝子発現レベルを比較しています。耐性株では優位にDHFR遺伝子の発現量が多いということがわかります。

次に、同様にMTXの遺伝子発現とMTXの感受性を調べましたが、両者に有意な差は見られませんでした。多型の決定は、多型の両側から設計したプライマーでPCRを行い、電気泳動したバンドのパターンで確認しました。ワイルドタイプでは、142塩基がワイルドタイプで、欠失型のアレルからは19塩基短い123bpのPCR産物が得られます。このようにバンドのパターンで分かります。

28塩基の反復配列の多型の解析も同様に行いました。反復が一番少ない2Rのアレルでは119の塩基なので、反復が1つ増えると28増えるので、28ずつ反復配列が増えることで増えていきます。このようにバンドの違いで分かります。

遺伝子多型と発現レベルの関連です。左はDHFR、右はTYMS遺伝子の発現レベルと多型の関連を見ています。左のDHFR遺伝子のほうでは、欠失型多型、欠失型のホモの株に発現量が低いものが見られました。TYMS遺伝子の発現レベルと多型は相関関係が見られませんでした。

最後に、2つの多型とMTX感受性の関連です。2つの多型とMTXのIC50値とはどちらも相関関係を示しませんでした。

考察です。

以上の結果から、DHFR遺伝子の発現レベルはMTX感受性と相関し、多型と遺伝子発現レベルは相関していましたが、多型とMTX感受性は相関を示しませんでした。また、TYMS遺伝子のほうでは、多型と発現の関係、発現と感受性の関係、多型とMTX感受性との関連に有意な相関は見られませんでした。従って、本研究の結果から、AAL細胞におけるMTX感受性をDHFR遺伝子の19塩基欠失多型およびTYMS遺伝子の28塩基タンデムリピート多型が予測することは困難である可能性が示唆されました。

最後に、まとめと今後についてです。

このプログラムがきっかけで研究室に入り、日々実験を行う中で、その実験のデータが思っていたものとは違っても、思っていたものだったとしても、実験が面白いということを知りました。また、在学中に実験をさらに続けて、データを出し、在学中に形にしたいと思っています。

さらに、このプログラムを通じてたくさんの人と出会うことができました。そして、交流を深めることで、自分の将来を考える糧ともなりました。一方で、まだ私は3年生なので、これから後3年間はこのプログラムに所属して、実験を行っていくことになると思います。なので、その中でさらにたくさん

の人と出会って、交流を深めて、自分の将来を考える糧としていきたいと思っています。

(15分経過)

最後になりますが、この関東研究医養成コンソーシアムなどに代表されるように、このプログラムがあったことで、大学間の学生のつながりができました。そのつながりを、将来、研究者や医師となっても関係も継続していきたいと思っています。そして、その関係を維持し、お互いに刺激し合える関係、また、もしかしたら一緒に仕事ができる関係となって、生涯、交流を続けていきたいと考えています。

これで私の発表を終わります。ありがとうございました。

○司会 加藤さん、素晴らしい発表をありがとうございました。

私も以前小児科医で小児白血病の治療に従事しておりましたので、MTXの感受性について取り上げて、それを発表していただいて、本当にありがたいなと思っています。

ありがとうございました。

では、以上で取り組みの紹介と成果発表を終了いたします。

それでは、それぞれに10分間の休憩とさせていただきます。

次のパネルディスカッションは、現在、この時計で15時30分ですので、15時40分より始めさせていただきますので、お時間になりましたら、お席にお戻りくださいますようお願いいたします。

トイレはこの建物の各階にありますので、どの階でもご利用ください。

なお、休憩の間、パネルディスカッションの準備をいたします。お騒がせいたしますが、皆さまのご理解とご協力をお願いいたします。

では、15時40分にまたお願いいたします。