

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 論 第 22 号		学位申請者	坂元 顕久
審 査 委 員	主 査	岸田 昭世	学 位	博士 (医学)
	副 査	小澤 政之	副 査	古川 龍彦
	副 査	夏越 祥次	副 査	井戸 章雄 (
<p>主査および副査の5名は、平成27年6月22日、学位申請者 坂元 顕久 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) LSD1 阻害剤であるトラニルシプロミン (TC) を一部の実験でしか使用しなかったのは理由があるのか。</p> <p>(回答) ミトコンドリア呼吸の制御に関しては siRNA と同様の結果が得られたが、解糖系関連の制御については必ずしも siRNA と阻害剤とのデータが一致しなかった。理由として、解糖系関連の遺伝子では明らかなヒストン修飾の変化が見られず、LSD1 の酵素活性が必要ないかもしれないこと、または、選択的阻害剤とはいえ TC には依然 off target 効果が考えられ、それらの影響も反映しているかもしれない。</p> <p>質問2) マウス腫瘍移植実験で、siRNA や TC を用いているが、どれ程効果が持続するのか。</p> <p>(回答) TC については把握できていない。siRNA の効果は4~5日は十分に効果が持続すると思われる。それ以降は、ノックダウン (KD) により生じたエピジェネティックな変化が持続して伝わると考えているが、実際には確認していない。</p> <p>質問3) siRNA の off target 効果を考慮する必要はないか。</p> <p>(回答) 今回の実験では異なる2種類の siRNA で同様の結果が得られている。また、別のグループからも、今回の siRNA の配列とは異なる2種類の siRNA で同様の結果が報告されており、off target 効果を考慮しなくて良いと考えられた。</p> <p>質問4) LSD1 を過剰発現させているが、対照群と比べて増殖や浸潤能などに変化は見られなかったか。</p> <p>(回答) 今回の実験では有意な変化は見られなかった。転写抑制因子を過剰発現させた場合、期待した結果が得られないことも多く、さらに今回は既に癌化している HepG2 を使用したため変化を検出できなかった可能性もある。</p> <p>質問5) 他の HCC 細胞株でも LSD1 の発現などを調べているのか。</p> <p>(回答) Huh-7 でも LSD1 をノックダウンすると、HepG2 と同様の遺伝子発現の変化が認められた。</p> <p>質問6) 癌のエネルギー代謝には解糖系以外に脂質代謝なども大きく関与していると思われるが、LSD1 と脂質代謝との関連を報告した文献はあるか。</p> <p>(回答) 我々は LSD1 が脂肪酸代謝を抑制すると報告している。この現象は広汎な細胞種で認められる一方、LSD1 が脂肪分解を促進するという逆の結果を示唆した報告もある。</p> <p>質問7) 臨床症例で LSD1 の発現は腫瘍組織のどこで認められるのか。また、HIF-1αについては見ていないのか。</p> <p>(回答) 臨床症例については国立がんセンターから情報を提供して頂いた。LSD1 が腫瘍組織の辺縁あるいは中心など、どこで発現が強くなっているかのデータは得られていない。HIF-1αについては今回染色していない。</p> <p>質問8) 将来的に抗がん剤として投与した場合、どのような効果が得られると思われるか。</p> <p>(回答) 補助薬として用いると、放射線治療などにおいて相乗効果が得られるかもしれない。</p> <p>質問9) GLUT2 は、LSD1 を KD したときに GLUT1 とは逆の発現変化をしているが、何か意味はあるのだろうか。</p> <p>(回答) GLUT1 と GLUT3 は、グルコースとの親和性が高く、細胞の機能を維持するために重要である。GLUT2 のグ</p>				

最終試験の結果の要旨

ルコースへの親和性は低く、グルコース取り込みに関しては GLUT1 や GLUT3 と比べると劣ると思われる。

質問 1 0) GLUT2 の発現制御は、GLUT1 等とは違い、LSD1 の下流ではないのか。

(回答) LSD1 のノックダウンにより遺伝子発現が上がるので、H3K4 脱メチル化の作用が強いと思われる。

質問 1 1) PGC-1 α 遺伝子領域の選択的脱メチル化作用を規定している転写因子などがあるのか。

(回答) 実際には分からない。LSD1 は転写抑制のヒストン修飾である H3K9 のメチル化を脱メチル化できるという報告があり、それらはアンドロゲン受容体やエストロゲン受容体などと複合体を形成すると起こると言われている。

質問 1 2) HIF-1 α の安定性において、PHD1 などと LSD1 が相互作用するか否かについては確認しているのか。

(回答) PHD1~3、VHL について、LSD1 との共免疫沈降で確認しているが、明らかな相互作用は確認できなかった。

質問 1 3) 治療薬としての特異性を高めると言ったが、分子機序の面からどのような治療方法などが考えられるか。

(回答) 現在ある阻害剤の TC は LSD1 の FAD 結合部位に結合し作用する。より LSD1 の構造に適した TC の派生物を作成して特異性を高めているが、薬剤の病変への供給という観点での特異性については、現在アイデアはない。

質問 1 4) Warburg 効果を阻害すると、腫瘍増殖が阻害されることは知られているのか。

(回答) Warburg 効果阻害による腫瘍増殖抑制効果は、多くのグループから報告がある。

質問 1 5) LSD1 は成熟した細胞ではどのような作用を持つのか。

(回答) LSD1 は普遍的に発現しており、特に脳、脂肪組織、肝臓などで発現が高い。また、LSD1 は幹細胞の維持や神経細胞の分化にも必要と言われている。脂肪細胞においては LSD1 が脂肪酸代謝を抑制することを我々は報告している。

質問 1 6) HepG2 や Huh-7 を用いて、増殖や浸潤については見ているのか。

(回答) 増殖に関しては、マウスの実験でないと腫瘍サイズの変化が認めにくかった。KD に加え、環境因子を付加しないと変化がない印象であった。浸潤や転移に関しては今回の実験では見ていない。

質問 1 7) siRNA の導入効率はどうか、また siRNA の実験は、1 種類で行っている実験が多いのはなぜか。

(回答) 導入効率は見ていないが、90%以上と十分な KD 効率を得られている。siRNA2 は細胞周期に影響が出ており、純粋に代謝の変化を評価する目的には、siRNA1 のみが使用可能だった。

質問 1 8) GLUT1 遺伝子プロモーター領域の HIF-1 α の ChIP assay のところで、HRE の隣の領域でも HIF-1 α の結合を認めるが、そこには何があるのか。

(回答) 恐らく私の実験が未熟で、比較的大きな DNA があり、HRE の隣の領域にも影響が出たかもしれない。

質問 1 9) マウスへの腫瘍細胞の移植実験 (マウス移植実験) で siRNA の効果は癌組織の摘出段階まで持続しないと思うのだが。

(回答) LSD1 がノックダウンされたことにより、ヒストン修飾などが変化したと思われるが、それが次の世代の細胞にも引き継がれているのではないかとと思われる。

質問 2 0) 移植で KD の実験より TC 投与の方が腫瘍は小さくなるのはなぜか。

(回答) LSD1 を KD した腫瘍より、TC 投与の方が腫瘍増殖を抑えられた。TC を投与したマウスでは痩せた個体になり、腫瘍細胞だけでなく全身組織の代謝も TC の影響を受けたためではないかと考えられる。

質問 2 1) マウス移植実験で Huh-7 の方が生着しやすいと思うが、なぜ用いなかったのか。

(回答) 細胞の実験で HepG2 を主に用いたので、移植実験も HepG2 で行った。

質問 2 2) ヒストン修飾の変化を詳細に調べていたが、どのように調べるのか。

(回答) ヒストン修飾に対する特異的な抗体を用いた ChIP assay で個別に解析した。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。