

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 362号	学位申請者	俣木 浩子
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	佐藤 雅美	副査 橋口 照人
	副査	西尾 善彦	副査 畑中 一仁

主査および副査の5名は、平成28年2月17日、学位申請者 俣木 浩子 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。

質問1) 発現抑制のある microRNA (miRNA) について内在性 miRNA の発現を回復させることはできるか。

(回答) miRNA の発現抑制の機序として DNA メチル化、ヒストン脱アセチル化があり、DNA メチル化阻害剤、ヒストン脱アセチル化阻害剤による発現回復も治療戦略として研究されている。今回、EBC-1 細胞で 5-Azacydine (メチル化阻害剤)、trichostatin A (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤) による実験を行ったが、miR-206 の発現の上昇は認めなかった。

質問2) miR-206 を正常細胞に核酸導入した場合はどうなるのか。

(回答) 上記に対する実験は行っていない。正常細胞に核酸導入を行う実験については過剰発現となり、実際の影響は不明である。

質問3) miRNA による遺伝子制御の詳細はどのようになっているのか。

(回答) miRNA は Ago 蛋白と miRNA induced silencing complex を形成し、TRNC6 (three trinucleotide repeat containing proteins 6) と複合体を形成しポリ A 分解とオリゴウリジル化依存的に RNA 分解を誘導する。さらに、TRNC6 依存的・非依存的経路により翻訳開始を抑制する。

質問4) 血中で miR-206 は測定できるか。血中ではどのような状態で存在するか。

(回答) miR-206 を血中で測定した報告はあるが、存在形態は不明である。一般的に血中の miRNA は exosome 内、microparticle 内、アポトーシス小胞内、HDL 結合型、Ago 蛋白結合型として存在する。

質問5) miR-206 は染色体上のどこに位置するのか。同じ位置に他の遺伝子があるのか。

(回答) 6p12.2 に位置し、近接して PKHD1 (polycystic kidney and hepatic disease 1)、miR-133b、IL17A が存在する。

質問6) パラフィンブロックから抽出した RNA の質は確認されているのか。

(回答) ホルマリン固定により RNA が分解され、長い断片の RNA の回収は不安定であるが、miRNA の回収は可能であり質も確認されている。RNA の分解を抑制するためには、1 時間以内にホルマリン固定を行い、固定化時間を 12-24 時間とする等、検体処理に留意が必要である。

質問7) miR-206 がアポトーシスを誘導する機序は確認されているのか。

(回答) miR-206 は EGFR、MET を抑制し、細胞生存に関与する下流経路 PI3K-Akt 経路の活性化を抑制する。また、miR-206 は BCL-2 を直接制御し、アポトーシスを誘導すると報告されている。

質問8) miR-206 導入後の細胞はアポトーシスが誘導されるが、その細胞で遊走・浸潤能の評価をして良いのか。

(回答) 純粋に遊走能・浸潤能を評価するには不適切かも知れないが、コントロールの miRNA を導入した群と比較して、遊走能・浸潤能を評価している。

質問9) miR-206 を細胞に核酸導入しているが、細胞を継代した後も効果は維持されるか。

(回答) リポフェクション法で mature miRNA を核酸導入しており、効果は一過性であり維持されない。

最終試験の結果の要旨

質問 1 0) *miR-206* と *p53* は関連があるのか。

(回答) *p53* に *miR-206* の標的配列がなく直接の制御はうけないと予想される (TargetScan Database)。*p53* は Drosha 複合体と相互作用し、primary miRNA のプロセッシングを抑制することが報告されているが *miR-206* の関与は不明である。

質問 1 1) miRNA を治療標的とすることは有効なのか。

(回答) 疾患形成には膨大な pathway が関わっており、数種の miRNA のみで制御することは困難と考えている。今後の研究においては、miRNA を起点とした病態に関わる新規分子ネットワークの探索を行っていきたいと考えている。

質問 1 2) 臨床検体の性差に偏りがあることについてどのように考えるか。

(回答) 肺扁平上皮癌は男性、喫煙者に多く、検体の性差は実際の臨床を反映している。男女間で *miR-206* の発現に差があるかを比較するための十分な症例数ではなく現時点では不明である。

質問 1 3) 分化度などの臨床背景と MET、EGFR、*miR-206* の発現に差はあったか。

(回答) 分化度、臨床病期、リンパ管侵襲・血管侵襲・胸膜浸潤の有無、生存期間、再発の有無と MET、EGFR、*miR-206* の発現に相関があるかを検討したが、明らかな差はなかった。

質問 1 4) 免疫染色の評価結果 table で染色強度 (+) 表記の検体を陽性と判定しなかったのはなぜか。

(回答) 免疫染色では染色強度を判定の基準にしないのが一般的であるが、Her2 免疫染色の判定基準を参考としたため、(++) 以上を陽性とした。

質問 1 5) Figure7 で AKT、ERK は抑制されていないのはなぜか。

(回答) *miR-206* は AKT、ERK 直接抑制するわけではなく、AKT、ERK の上流である EGFR、MET を直接抑制することにより下流経路の活性化を抑制するため、AKT、ERK の発現には影響を与えないと考えられる。

質問 1 6) MET 増幅は EGFR-TKI の耐性機序の一つとされているが、MET 阻害薬と EGFR-TKI の併用効果は臨床試験において示されていない。その上でも、EGFR と MET を阻害する *miR-206* による治療アプローチは有効と考えるか。

(回答) 耐性機序には MET 増幅以外の pathway も数多く存在するため、EGFR、MET を阻害することのみでは限界があると考えられる。EGFR-TKI 耐性例での *miR-206* の発現も確認できておらず、耐性機序への関与も不明である。

質問 1 7) 一つの細胞株の実験結果のみで *miR-206* が腫瘍抑制性の機能を持つといえるか。

(回答) 頭頸部癌、乳癌、膵臓癌、甲状腺癌等の多様な癌腫の細胞株において *miR-206* の核酸導入による腫瘍抑制効果が報告されている。このことは、*miR-206* が重要な腫瘍抑制性の microRNA であることを示唆していると考えている。

質問 1 8) EGFR を標的と考えるのであれば、EGFR 遺伝子変異株を用いた検討が必要ではないのか。

(回答) 解析対象の肺扁平上皮癌のほとんどは EGFR 遺伝子変異陰性である。本研究では、一般的な肺扁平上皮癌において *miR-206* の制御する癌促進経路を探索することが目的であるため、EGFR 遺伝子変異株は用いなかった。EGFR の経路は *miR-206* に制御される複数経路の一つと考えている。

質問 1 9) long noncoding RNA (lncRNA) と *miR-206* の関係は分かっているのか。

(回答) miRNA の結合配列をもつ competing endogenous RNA は mRNA に対して miRNA の競合を引き起こし、miRNA の働きを破綻させる lncRNA として注目されている。*miR-206* に関連する lncRNA は未だ明らかになっていない。

質問 2 0) Table II の KEGG で分類された pathway の遺伝子は *miR-206* の標的遺伝子か。

(回答) TargetScan Database で *miR-206* の標的配列を有する遺伝子群である。

質問 2 1) Western Blotting で MET が 2 本のバンドで描出されているのはなぜか。

(回答) EBC-1 細胞は MET 増幅がある。MET 増幅に伴う現象として、細胞外ドメインを構成する部分のみからなるスプライシングバリエーションの存在が報告されており、2 本のバンドで描出されていることと関連があると考えている。

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しての学力・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。