

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	407号	学位申請者	隈元 朋洋
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	佐藤 雅美	副査	古川 龍彦
	副査	久保田 龍二	副査	畑中 一仁

主査および副査の5名は、平成29年2月17日、学位申請者 隈元 朋洋 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) 頭頸部癌の microRNA (miRNA) 発現プロファイルをもとに *microRNA-218* (*miR-218*) を選択しているが、アプローチ法として問題ないか。

(回答) 既報では肺扁平上皮癌の miRNA 発現プロファイルは1報のみであった。それに対し、頭頸部癌の miRNA 発現プロファイルは11報確認でき、その発現プロファイルのまとめの中には、当科にてこれまでに肺扁平上皮癌で報告した癌抑制型 miRNA が含まれていた。よって、このプロファイルのまとめをもとに *miR-218* を選択した。

質問2) ホルマリン固定パラフィン包埋から全 RNA 採取時にマイクロダイセクション法を用いたか。

(回答) レーザーマイクロダイセクション法は用いていない。顕微鏡で確認し、癌部、非癌部由来の組織をわけて採取した。癌部と十分な距離をとり、気腫化、線維化や炎症細胞の浸潤などの背景変化を含まない部位を非癌部として採取した。

質問3) XTT assay は接着培養細胞で可能か。

(回答) HeLa 細胞など多くの接着培養細胞で XTT assay の実績が確認されている。

質問4) 研究結果は肺扁平上皮癌に特異的か。

(回答) 肺扁平上皮癌に特異的とは考えていない。*TPD52* 発現亢進は種々の癌において臓器横断的にみられている。しかし、肺腺癌における *TPD52* の mRNA 発現は肺扁平上皮癌よりも低値と報告されている。特異性の確認のためには、肺腺癌細胞株や頭頸部癌、食道癌など他部位の扁平上皮癌の細胞株を用いた解析が必要と考えられるが、今回は行っていない。

質問5) *TPD52* 発現亢進のメカニズムは miRNA 単独によるものか。

(回答) 乳癌や前立腺癌においては8q21のコピー数増加による *TPD52* 発現亢進が報告されている。また、前立腺癌において *miR-224* 発現低下により *TPD52* 発現が亢進し、癌促進に関与しているとの報告もある。肺扁平上皮癌における遺伝子解析の報告では8q21の copy number variation はみられていない。今回の研究結果からは、肺扁平上皮癌における *miR-218* 発現低下が *TPD52* 発現亢進の要因と考えられる。肺扁平上皮癌において8q21の増幅による *TPD52* 発現亢進がないかを確認するためには細胞株や臨床検体を用いた comparative genomic hybridization (CGH) などによる遺伝子解析が検討されるが、今回は行っていない。

質問6) 長鎖非コード RNA (long non-coding RNA: lncRNA) の最近の知見について述べよ。

(回答) 非小細胞肺癌において、診断や予後予測のための血液バイオマーカーとして期待されている *MALAT1* や、cisplatin 耐性に関与する *AK126698* などが報告されている。

質問7) Figure 1 と Figure 4 に関して、*miR-218* と *si-TPD52* の機能解析で浸潤能の差があるのはなぜか。

(回答) *miR-218* が抑制する遺伝子の中には浸潤促進に関与する遺伝子が多く含まれている可能性が高く、*si-TPD52* 単独より *miR-218* を核酸導入した EBC-1、SK-MES-1 における浸潤能が抑制された可能性が考えられる。

質問8) *TPD52* の正常部での機能について述べよ。

(回答) 正常部位では、膜トラフィッキングに関連していることが報告されている。特に、胃や脾においてエキソサイトーシスに関与しているとされている。正常肺における機能は明らかになっていない。

質問9) *TPD52* が制御する分子経路の探索に関して、GEO において非小細胞肺癌で発現が亢進している遺伝子のうち、*TPD52* と相関がある遺伝子を選出するべきではないか。

(回答) 今回は、*TPD52* の下流分子として *si-TPD52* 核酸導入細胞において発現が抑制された遺伝子群を、腫瘍化と関連する分子として GEO の非小細胞肺癌で発現が亢進している遺伝子に統合して、*TPD52* の下流遺伝子の腫瘍化

最終試験の結果の要旨

関連の候補分子を選択した。今後、他の解析手順でも *TPD52* に関連がある遺伝子を選出してみたい。

質問 10) 2 つの細胞株における *p53* の status について述べよ。

(回答) EBC-1 では E171*, SK-MES-1 では E298* の *p53* のナンセンス変異が報告されている。

質問 11) *TPD52* が関与する分子経路として上皮間葉転換 (EMT) に関連する経路が選出されなかったのはなぜか。

(回答) *TPD52* が関与する分子経路として EMT に関連する経路が探索されると期待したが、細胞周期に関与する経路が探索された。mRNA 発現の大きな変化を伴わず、リン酸化などの修飾変化によって形質変化が起こっている可能性が考えられる。

質問 12) GEO では肺扁平上皮癌のデータを使用しているのか。

(回答) 肺扁平上皮癌のみの遺伝子発現プロファイルで GEO で確認できなかったため、扁平上皮癌 27 例、腺癌 45 例、大細胞癌 19 例、コントロール 65 例を含む非小細胞肺癌の遺伝子発現プロファイルを使用した (GSE19188)。

質問 13) si-*TPD52* を核酸導入した細胞において発現が低下した遺伝子を $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ で選出したのはなぜか。

(回答) *TPD52* が制御する分子経路の多くは知られていない。*TPD52* によって制御を受ける可能性がある多くの遺伝子を広く選出するため、cut off を $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ とした。

質問 14) *miR-218* の標的遺伝子を選出する際に *miR-218* の予測結合部位の数で決めてよいのか。

(回答) *miR-218* の予測結合部位の数が多いほど *miR-218* が制御する確率が高いとは必ずしも言えないが、*TPD52* の予測結合部位 4 ヲ所のうち 2 ヲ所は conserved site であり、*miR-218* が結合する可能性が高いと考えた。また、*miR-218* を核酸導入した EBC-1 での *TPD52* 発現の \log_2 は -1.33 と低値で、候補遺伝子として妥当と考えた。

質問 15) *miR-218* 発現低下により *TPD52* 発現が亢進しているといえるのか。

(回答) EBC-1、SK-MES-1 に *miR-218* を核酸導入した細胞で、*TPD52* の発現抑制を確認しており、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイの結果を併せ、*miR-218* の発現低下により *TPD52* 発現が亢進しているといえる。一方で、*TPD52* を過剰発現した検討は行っていないので、*TPD52* 発現が亢進して *miR-218* が抑制されるかは不明である。

質問 16) miRNA は標的遺伝子に作用した後にそのものの発現が減るのか。

(回答) 産生と消費により恒常性が維持されるのではないかと考えられるが、検索範囲内ではっきりしない。

質問 17) si-*TPD52* を核酸導入した細胞で *miR-218* の発現はどのように変化しているか。

(回答) 今回は検討を行っていないので不明であるが、今後確認が必要と思われる。

質問 18) Western blotting で 2 つのバンドがでてるのはなぜか。

(回答) 2 本のバンドの由来は、splice variant により分子量が異なる *TPD52* の蛋白が存在するためである。

質問 19) 健常者で *miR-218* の男女差はあるか。

(回答) 乳癌や全身性エリテマトーデスにおいて、エストロゲンが miRNA 発現を調節しているとする報告がある。また、非糖尿病患者の膝において、性差による DNA メチル化の差があり、miRNA 発現が異なるとする報告もある。これらのことから、健常者でも miRNA の発現に性差があることは十分考えられるが、今回は検討を行っていない。

質問 20) 他の癌腫では *TPD52* は増殖能にも関与している。臓器による差違がみられる理由を述べよ。

(回答) si-*TPD52* を核酸導入した EBC-1、SK-MES-1 で、遊走能や浸潤能ほどではないが、増殖能の抑制もみられており、今回の研究結果から肺扁平上皮癌においても *TPD52* は増殖能促進にも関連していると考えられる。今回は肺扁平上皮癌の細胞株を用いた研究を行ったので、臓器による差違については検討できていない。

質問 21) *miR-218* を核酸導入してしばらく継代していくと、癌抑制効果はなくなっていくのか。

(回答) リポフェクタミン法を用いて核酸導入を行った。効果は一過性のため継代による変化は確認していない。他の核酸導入法として、レンチウイルスベクターを用いて肺腺癌細胞株に *miR-218* を核酸導入し、ヌードマウスに皮下注射したモデルでの検討が報告されている。皮下注 1 週後の腫瘍における *miR-218* 発現は control と比較して有意に高値で、一定期間、核酸導入効果が持続すると考えられるが、長期的な効果は不明である。

質問 22) *TPD52* の免疫染色は細胞のどの部位が染色されているか。

(回答) 癌細胞の細胞質が染色される。肝臓癌における報告でも同様に *TPD52* の免疫染色により癌細胞の細胞質が染色されている。

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。