

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 399 号	学位申請者	宮元 一隆
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	武田 泰生	副査 井上 博雅
	副査	橋口 照人	副査 速見 浩士
<p>主査および副査の5名は、平成28年12月26日、学位申請者 宮元 一隆 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) 膀胱癌の手術検体では一部正常組織も含まれていると思うが、同一の患者検体で癌と正常組織を比較したか。 (回答) 同一患者での比較は行っていない。膀胱癌は多中心性発癌の特徴を持ち、正常と思われる膀胱粘膜にも癌が含まれている可能性が否定できないため、前立腺癌にて前立腺全摘出術をした際に前立腺組織と一緒に摘出した正常膀胱粘膜を採取している。</p> <p>質問2) 他の癌腫でも <i>miR-26</i> 発現導入により増殖能低下を示しているものはあるか。 (回答) 肝臓癌において <i>miR-26</i> はホスト遺伝子と共同で癌抑制遺伝子の Rb を活性化し細胞周期を制御することで細胞増殖能を抑制するという報告がある (Ying Zhu et al, Nucleic Acids Research, 40(10), 4615-4625, 2012)。</p> <p>質問3) 膀胱癌で MYC の発現が高いという確認実験は行ったか。MYC を knock down すると遊走、浸潤を抑制すると考えてよいか。 (回答) 今回の研究では膀胱癌組織の MYC の発現は調べていない。Gene Expression Omnibus (GEO) database では MYC は膀胱癌で発現が上昇している。Oncogenic な MYC は主に細胞増殖に関与するため、MYC を knock down するとまず増殖能が低下して、それに伴い遊走、浸潤能も抑制されると考えられる。</p> <p>質問4) 低酸素で <i>miR-26</i> が変化するという論文はあるか。 (回答) 低酸素下で <i>miR-26</i> が誘導されるという論文がある (Kulshreshtha R et al, Molecular and cellular biology, 27(5), 1859-1867, 2007)。低酸素下で <i>miR-26</i> が低下するという論文はない。</p> <p>質問5) <i>PLOD2</i> を制御している microRNA はいくつもあるようだが、その中でも <i>miR-26</i> は特に相関性が高く膀胱癌において重要なものであるという評価か。 (回答) <i>miR-26</i> は膀胱癌において <i>PLOD2</i> を制御している重要な miRNA であるが、今回は <i>miR-26</i> と他の microRNA を比較検討していない。今後の検討課題としたい。</p> <p>質問6) 実験に用いた T24、BOY を選んだ理由は何か。 (回答) Knock down study を念頭に <i>PLOD2</i> の発現が十分に高い細胞を選択したところ、当教室で管理している5種類の膀胱癌細胞株の中で、T24、BOY における <i>PLOD2</i> の発現が十分に高かったため用いた。</p> <p>質問7) <i>PLOD2</i> を標的とする miRNA は他にあるか。他にあれば、<i>miR-26</i> と他の miRNA のどちらが <i>PLOD2</i> を抑制しているか分からなくなるのではないか。 (回答) <i>PLOD2</i> を標的とする miRNA は複数ある。複数の microRNA が共同して標的遺伝子の発現に影響している。今後、どの miRNA の影響が大きいかを検討すべきであると考えている。</p> <p>質問8) 今回の cohort で <i>miR-26</i> と clinicopathological parameter の間にリスク因子になりそうなものはあったか。 (回答) 今回の研究で <i>miR-26</i> と clinicopathological parameter の関係を単変量解析、多変量解析どちらでも評価したが、</p>			

リスク因子は認めなかった。

質問 9) stage や grade で *miR-26* や *PLOD2* の発現に差がないのはどのように解釈しているか。

(回答) advanced stage で *PLOD2* の発現が高い傾向はあったが、有意差までは得られなかった。今後 cohort の規模を大きくすることで、有益なデータが得られる可能性があると考えている。

質問 10) *miR-26alb* の発現はパラレルか。

(回答) 今回のデータでは *miR-26alb* はパラレルに発現して正の相関を示した。

質問 11) *miR-26* が膀胱癌で低下しているが、ホスト遺伝子も減少しているのか。ホスト遺伝子 (CTDSP) の機能は何か。

(回答) 今回の実験では膀胱癌におけるホスト遺伝子 (CTDSP) の発現は確認していない。*miR-26* と同じ領域にコードされているのでホスト遺伝子も低下している可能性はある。実際に (GEO) database では膀胱癌で発現が低下している。*miR-26* のホスト遺伝子 (CTDSP) は単独でも細胞周期を抑制し、細胞増殖能を抑えるという癌抑制遺伝子として報告されている (Ying Zhu et al, Nucleic Acids Research, 40(10), 4615-4625, 2012)。

質問 12) BOY では *miR-26* の transfectant で増殖能が軽度低下しているが、*si-PLOD2* 導入では増殖抑制がみられないのはなぜか。

(回答) BOY の *miR-26* の transfectant の増殖抑制は off target 効果が主因と考えており、*miR-26* がホスト遺伝子と共に細胞増殖能抑制を示す可能性もあるのでこのことも一因と考える。ただ膀胱癌における *miR-26* の効果は増殖能に対する効果は軽度であり、遊走能、浸潤能抑制が主と考えている。*miR-26* は細胞株によっては *PLOD2* 以外の遺伝子を制御することにより細胞増殖能抑制を示す可能性があると考えている。*PLOD2* 自体は細胞増殖ではなく遊走能、浸潤能を活性化する遺伝子と考えている。

質問 13) *PLOD2* は collagen を産生する酵素であるが、培養細胞上でこのことを評価したか。

(回答) 培養細胞が産生する collagen を蛍光免疫で評価したが、control と transfectant では差が見られなかった。

質問 14) ITGA3 の下流に MAPK pathway があるが評価したか。

(回答) MAPK pathway や FAK pathway の Western blot の評価を行ったが、有益な結果が得られなかった。

質問 15) miRNA や siRNA を核酸導入した細胞で形態変化は認めたか。

(回答) 明らかな細胞形態の変化は認めなかった。*in vitro* での観察は *in vivo* を反映していない可能性もある。

質問 16) *PLOD2* の生体内での発現変化は炎症や発生にも関わっていそうだが報告はあるか。

(回答) 肺線維症などの炎症性疾患の論文は多くある。炎症や発癌の論文が多い。

質問 17) introduction で miRNA の機能について inhibit transcription と記載しているのはどのような意味か。

(回答) 誤りである。translation と記載したほうが良かったと考える。

質問 18) 癌組織で *PLOD2* を染色するとどこが染まるか。

(回答) 免疫染色を行ったところ、癌細胞、間質どちらも染色された。

質問 19) *PLOD2* は主にどこに発現するのか。膀胱癌細胞由来の *miR-26* が exosome などで伝達されて腫瘍微小環境の *PLOD2* の発現が上昇したという可能性はないか。

(回答) *PLOD2* は主に癌細胞周囲の fibroblast に多く発現していると思われるが、癌細胞自身や細胞外基質にも発現している。今回の研究における exosome による *miR-26* の情報伝達は十分に可能性がある。Exosome study は今後の課題である。

質問 20) 膀胱癌において *PLOD2* は細胞外基質をどのように carcinogenesis するのか。

(回答) *PLOD2* の異常発現が collagen fiber の異常発現を起こし、細胞外基質の線維化がすすみ、癌細胞が遊走能、浸潤能を獲得することをサポートすると考えられる。

質問 21) collagen crosslinking enzyme とあるが、どのように collagen を crosslink させるのか。

(回答) *PLOD2* が precollagen の脱水酸基をすると、precollagen が crosslink (架橋) する。

質問 22) *PLOD2* のような enzyme がなぜ分子の違う挙動である癌細胞の遊走、浸潤に関わるのか。*PLOD2* が関わる遺伝子の解析はしたか。

(回答) *PLOD2* が直接癌細胞の遊走、浸潤に関わるのではなく、*PLOD2* の発現異常が collagen fiber の発現異常に関わることで、細胞外基質の線維化が進むことによる。今回の研究では *PLOD2* の下流遺伝子探索で *ITGA3* など候補遺伝子を見出すまでは行った。この先の探索は今後の研究課題である。

質問 2 3) *PLOD2* の mutation をもつ症例はあるか。

(回答) The Cancer Genome Atlas (TCGA) database によると膀胱癌における *PLOD2* の mutation は約 2%であった。

質問 2 4) *PLOD2* の発現が癌の悪性と相関がなかったが、どのように解釈するか。

(回答) advanced stage で *PLOD2* の発現が高い傾向はあったが、有意差までは得られていない。今後、cohort の規模を大きくすることで、有益なデータが得られる可能性があると考えている。

質問 2 5) Luciferase assay では 2 つ binding site 候補があるようだが、一つには結合していないのか。また binding site 候補は実験前に予測はできないのか。

(回答) 今回 2 つ中 1 つの binding site に結合した結果であった。事前に予測する方法はなく、miRNA の配列から標的遺伝子の配列を考慮し、候補となりうる binding site すべてに Luciferase assay を行っている。

質問 2 6) *In silico* assay で conserved site 2 個以上の遺伝子を抽出しているが、1 個では候補遺伝子の探索は困難か。

(回答) 1 個は候補遺伝子が多数となり、conserved site 2 個以上持つ遺伝子中で探索を行い有益な遺伝子を抽出できた。

質問 2 7) *PLOD2* が働いて precollagen の脱水酸基が起こり crosslink が起こるという理解で良いか。*PLOD2* がうまく機能しないと水酸基が残った状態で crosslinking がうまくいかず collagen の構造上に異常を認めるのか。

(回答) *PLOD2* は precollagen の脱水酸基を行っている。*PLOD2* が機能しないと構造異常をきたすのではなく precollagen から collagen への生合成が進まないので collagen の産生量が減ると考える。

質問 2 8) *PLOD2* と転移の相関はあるのか。

(回答) 今回の実験では相関は得られなかったが、症例を増やして今後の検討課題としたい。

質問 2 9) *PLOD2* の発現が高いと癌組織で線維化が強い癌になるのか。

(回答) 理論上はその可能性が高いが、マッソントリクローム染色などで証明するべきである。しかし形態的な評価まで行っている論文はこれまでにない。

質問 3 0) Table 2 は GSEA にあたるようなことを KEGG の中で行えるのか。Table 2 はどのような順で並べているか。

(回答) 今回のデータは発現の cut off 値を決めて、それより発現が上昇もしくは低下した遺伝子の集団を KEGG のような遺伝子発現解析にいて解析をしたもので、GSEA のような一つ一つの遺伝子の発現の変化をみたようなものではない。Table 2 はそれぞれの pathway の該当する遺伝子数で降順に並べている。

質問 3 1) Table 2 では IL-1 など免疫系のサイトカイン・ケモカインも上がってきているが評価したか。

(回答) 今回は評価していないが、今後検討したい。今回は Table 2 の中で重要と思われる *ITGA3* と *HK2* の考察を行った。

質問 3 2) 他の癌腫で *PLOD2* の報告はあるのか。また *PLOD2* は線維化などの他の疾患での報告はあるか。

(回答) 癌では乳癌や肝臓癌などで報告があり、線維化疾患では肺線維症などの報告がある。

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。