

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 390 号	学位申請者	政 幸一郎
審査委員	主査	小賤 健一郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査 秋葉 澄伯
	副査	上野 真一	副査 前村 公成

主査および副査の5名は、平成28年8月23日、学位申請者 政 幸一郎君に面接し、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) miR-30 family は同じ gene から転写されるのか。

(回答) miR-30 family に属する microRNA は、異なる染色体から転写される。

(hsa-mir-30a chr6, hsa-mir-30b chr8, hsa-mir-30c-1 chr1, hsa-mir-30c-2 chr6, hsa-mir-30d chr8, hsa-mir-30e chr1)

質問2) 実験に用いたゲムシタピンの濃度と実際の患者の血中濃度とはどのように対応しているか。

(回答) 臨床試験において、膀胱癌に対する標準量のゲムシタピン 1000mg 投与で、最高血漿中濃度は $21865 \pm 4165 \text{ ng/ml}$ で半減期は $t_{1/2\alpha} = 3.1 \pm 2.0 \text{ min}$, $t_{1/2\beta} = 18.9 \pm 4.0 \text{ min}$ であった。実験で使用した濃度は、過去の研究をもとに設定したが、臨床における濃度と対応していると考えられる。

質問3) miR-30a, b, c を同時に transfection した実験は行ったか。

(回答) 今回は、miR-30a, b, c を同時に遺伝子導入する実験は行っていない。過去の報告(Clin Cancer Res. 2015;21(13):3071-80)では、マウスに miR-30a-e mix を胸腔内投与することでメラノーマの肺転移を抑制するという報告はみられたが、腫瘍細胞に同時に遺伝子導入した報告はなかった。

質問4) Cancer stem cell の renewal とはどのような意味か。

(回答) 癌幹細胞は、自己複製能 (self renewal) と多分化能 (multi-lineage differentiation) を有しているとされるが、自己複製能は自分と同じ能力(幹細胞性)を持った細胞を複製する能力と定義されている。

質問5) invasion assay と migration assay の意義の違いはなにか。

(回答) Migration assay は単純な運動能を評価するアッセイであるが、invasion assay は細胞外マトリクスのような基質を分解しながら移動する能力を評価するアッセイである。

質問6) Fig. 5 では有意差検定を行なっているか。

(回答) 有意差検定は行ったが、有意差はみられなかった。しかし、論文で記載されているような傾向があると判断した。

質問7) CD133 と Fig. 1 のマイクロアレイで、他の miRNA との関係について調べたか。

(回答) 今回は、CD133 と miRNA マイクロアレイで差がみられた他の miRNA の関係については調べていない。しかし、miR-221 と CD133 の関係を示唆する報告はある(J Transl Med. 2008; 6:39)。

質問8) miR-30d, miR-30e も差があるが、調べていないのはなぜか。

(回答) miR-30d については、発現の有意差がなかったため、調べていない。miR-30e については有意差があったので調べるべきであったが、今回は miR-30a, b, c に焦点を当てて実験を行なった。

質問 9) Fig. 2 において miR-30c の導入で 30b も上がっている理由は何か。

(回答) miR-30b の導入と miR-30c の導入は独立に行ったため、コンタミネーションの可能性は低いと考えている。発現に関しては繰り返し測定を行ったが、同様の結果であった。miR-30c と miR-30b の関係についての報告はないが、miR-30c の発現が miR-30b の発現に間接的に影響している可能性があると考えている。

質問 10) CD133 と miR-30 のシグナルに何か関係があるか。

(回答) CD133 発現を制御することで miR-30 family の発現が変動することは今回の実験で示されたが、直接的制御か間接的制御かなどのメカニズムについては今回の実験からは示されなかった。過去にも報告はなかった。

質問 11) CD133 の機能は不明なことが多い。他の細胞株での検討はしているか。

(回答) 今回は、膀胱癌幹細胞様細胞モデルとして CD133 の発現が高い細胞株である Capan-1M9 を樹立できたため同細胞を実験に使用した。他の膀胱癌細胞株に関しては調べていない。また、本研究が、膀胱癌における CD133 と miR-30 family の関係に関する初めての報告である。

質問 12) Fig. 4 で miR-30b を導入したとき、wound healing assay に差がなかった理由は何か。

(回答) 今回の実験で invasion assay と migration assay の結果に違いが見られたが、invasion assay は細胞単独の遊走能を観察しているのに比較し、wound healing assay は細胞同士が接触した状態での遊走能を観察している。したがって、どちらも遊走能を評価するアッセイであるが、やや異なる性質を見ている可能性があると考えている。miR-30b は細胞が接触した状態での遊走能には影響せず、細胞単独状態での遊走能のみに関与しているのではないかと考える。

質問 13) 今回の実験においてノックダウン実験を行っていないのはなぜか。

(回答) Capan-1M9 細胞は、miR-30a, b, c の発現が高い細胞株であり、通常はノックダウン実験を行うデザインの方が適切と思われるが、inhibitor の導入効率が極端に低かったこと、inhibitor は人工的な物質であるため off-target 効果が発生する可能性もあり、結果の判断が難しいことなどから、今回は over-expression の実験に切り替えた。

質問 14) Fig. 5 で miR-30 は CD133 が EMT を起こす key factor と考えられるか。

(回答) CD133 が miR-30 family の上方制御、EMT 関連遺伝子の上方制御を介して遊走能、浸潤能を亢進させる可能性が示唆された。key factor であるかどうかについてはノックダウン実験や CD133 が miR-30 family を制御するメカニズムについての更なる実験が必要と考えている。

質問 15) miRNA の臨床応用開発はどこまで進んでいるか。

(回答) 現在、microRNA の臨床応用については、バイオマーカーなどの診断についての開発が進んでいる。治療に関しては、デリバリーの問題など克服しなければならない課題が多い。今回の研究からも癌細胞の種類や細胞の環境により反応が異なるため更なる検討が必要である。

質問 16) miR-30 family を研究対象として選んだ理由は何か。

(回答) 今回、miR-30 family を研究対象として選択したのは、CD133 高発現細胞と CD133 ノックダウン細胞の miRNA マイクロアレイで miR-30a-5p の発現に差を認めたからである。

質問 17) Fig. 4 の wound healing assay では、M9-30c1 となっているが、Fig. 4 の他の実験では M9-30c となっている。何か違いはあるのか。

(回答) miR-30c には miR-30c-5p を共通とする異なる miRNA である miR-30c1 と miR-30c2 が存在する。それぞれ異なる染色体から転写される。今回は、文献的報告が多い miR-30c1 を実験に用いた。

質問 18) M9-30c subline では、miR-30c1 だけでなく、miR-30b も比較的高発現している。一方、M9-30b subline では mir-30b だけが比較的高発現している。M9-30c subline と M9-30b subline における wound healing assay と transwell migration/invasion assays の結果の違いは、miR-30b と miR-30c1 を同時発現しているか否かで説明できそうだが、どう考えるか。

(回答) Wound healing assay で評価される遊走能と transwell assay で評価される遊走能は、同じ遊走能でも異なる性質を見ている可能性があると考えている。前者には miR-30b が関与せず、後者に関与していると考えれば説明できると思われるが、同時発現が関与しているかどうかを確かめるためにはノックダウン実験が必要と考える。

質問 19) M9-30c subline と M9-30b subline の違いは、Fig. 5 の vimentin でも見られるが、この違いは、どのよう

に説明できるか。

(回答) miR-30a, c に比べて miR-30b で vimentin や fibronectin の発現が相対的に低いのは、miR-30b の間葉系形質への関与が低いことを示唆していると考えられ、ターゲットにしている遺伝子の違いに起因していると考えられる。

質問 2 0) miR-30 family の発現が epigenetic に制御されている可能性はあるか。

(回答) 悪性神経鞘腫において、主要な epigenetic 制御因子である EZH2 の inhibitor が miR-30 family の発現を抑制するという報告があり (Mol Cancer 2015;14:55)、肺癌においても miR-30 family が epigenetic 制御を受けている可能性はあると考えられる。

質問 2 1) miR-30 microRNA precursor の構造は、EBV 胃がんで見つかる EBER とよく似ていて興味深い。EBV 胃がんでは、EBER の in situ hybridization で EBER がすべての胃がん細胞に高発現している。miR-30 microRNA precursor の in situ hybridization は可能か。

(回答) microRNA の in situ hybridization は一般的に行われている (Methods Mol Biol. 2012;822:67-84)。臨床的組織において miR-30 発現がどのような臨床病理学的因子と関係があるのか、組織中でどのような細胞に発現するのか (CD133 発現との関係など) 等の評価に有用であり、今回の研究を進めていくためには重要と考えている。

質問 2 2) microRNA レンチウイルスベクターの構築はどうであったか。

(回答) 今回の実験には市販のレンチウイルスベクターを用いている。プロモーターとして house keeping 遺伝子のプロモーターである EF1 α 、導入マーカーとして RFP/ Puromycin 耐性遺伝子 (rPuro) が組み込まれている。

質問 2 3) 遺伝子導入効率が高いが、幹細胞系では培養を続けると発現が低下してくることが多いがこの細胞はどうであったか。

(回答) 実験中は RFP の発現をみることで評価していたが、発現が低下することはなかった。プロモーターとしてメチル化を起こしにくい EF1 α を使用していることが奏功していると考えている。

質問 2 4) Fig. 3c, 4a で有意差検定は行っているか。

(回答) Fig. 3c (GEM cytotoxic assay), 4a (wound healing assay) については有意差はなかったが、論文に記載したように傾向はあると考えている。

質問 2 5) PCR primer の設計はどうしたか。

(回答) Reverse primer として universal adaptor PCR primer、Forward primer として目的とする microRNA 特異的な配列の primer を使用している。

質問 2 6) mRNA マイクロアレイと miRNA マイクロアレイの統合解析は行っているか。

(回答) mRNA マイクロアレイと miRNA マイクロアレイの統合解析は、今回は行っていない。Capan-1M9 細胞と CD133 発現が相対的に低い親株 Capan-1 を比較する mRNA 解析では、Capan-1M9 で vimentin、fibronectin、N-cadherin、Slug の発現が高かった。

質問 2 7) 様々な癌腫の oncogenic な機能は CD133 と miR-30 の結果で一般化して説明できるか。

(回答) CD133 は、脳腫瘍、結腸癌など様々な細胞の癌幹細胞マーカーとして報告されており、我々の過去の研究 (Mol Cancer 2014;13:15) や本研究から機能面でも oncogenic な機能を有していると考えている。しかし、miR-30 family に関しては、臓器によって oncogenic か tumor suppressive かは異なっているため、一般化は難しいと考えられる。

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。