

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 399 号	学位申請者	米森 雅也
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 有田 和徳
	副査	小林 裕明 印	副査 速見 浩士 (

主査および副査の5名は、平成28年12月26日、学位申請者 米森 雅也 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) *MMP11* の発現は元々膀胱癌で発現が高いと考えられるが、さらにこの場合は *miR-139* の発現が低下していることが、*MMP11* の発現を enhance していると考えてよいか。

(回答) *MMP11* の発現は様々な miRNA が制御しており、*miR-139* はその一つである。仮に *miR-139* の影響がないとしても *MMP11* の発現は高いと考えられる。

質問2) miRNA を起点とした標的遺伝子の探索を行わないと、膀胱癌における *MMP11* の発現上昇は証明できないのか。

(回答) 膀胱癌における *MMP11* の発現上昇は Gene Expression Omnibus (GEO) のプロファイルでも確認可能である。

質問3) *MMP11* 以外に発現が顕著に高く癌の増殖、遊走、浸潤に関わる遺伝子は GEO のリストで認められるのか。

(回答) GEO のリストの中では *HMG2*、*ITGB3* などが癌の進展に関わるとする報告がある。

質問4) *MMP11* は細胞増殖にも影響しているのか。

(回答) 膀胱癌細胞株において siRNA により *MMP11* をノックダウンすると細胞増殖能の低下が認められる。

質問5) Matrix metalloprotease (MMP) は古典的には Extracellular matrix (ECM) の分解に関わるが、*MMP11* そのものの機能についてはどこまでわかっているのか。

(回答) *MMP11* の発現はサイトカインの発現と相関しているとの報告があり、古典的な経路だけではなく、サイトカインの発現に影響を与えて腫瘍進展に影響を与える可能性があると考えられる。

質問6) *MMP9* の検討はしていないのか。

(回答) 今回は *MMP9* については検討していないが、興味があり、今後検討を行いたいと考えている。

質問7) *miR-139-5p*、*miR-139-3p* は正常膀胱組織でも恒常的に発現していると考えてよいか。

(回答) 当科で施行した次世代シーケンサーでの発現解析で確認している。

質問8) 正常膀胱細胞にて脱メチル化を評価したのか。

(回答) 今回は検討していないが、癌細胞と同じ結果となるのかどうか今後検討してみたい。

質問9) 今回の新しい知見としては miRNA の passenger 鎖が癌抑制型 microRNA として機能するという事か。

(回答) miRNA の guide 鎖のみでなく、これまで機能しないとされていた passenger 鎖も生体内では共同して癌抑制的機能を発揮している可能性があるという新しい知見である。

質問10) Cell viability の意味をどのようにとらえているか。

(回答) 直訳すると細胞活性という意味であるが、この論文では細胞の増殖・遊走・浸潤能を含む包括的な意味で使用した。

質問11) カプランマイヤー曲線の *MMP11* の発現は何を用いて評価しているのか？

(回答) 今回は *MMP11* mRNA の発現で検討した。

質問12) *MMP11* が高発現しているのは腫瘍組織の局在としてはどこか。

(回答) 免疫染色では間質において *MMP11* の発現は高かった。

質問13) *MMP11* は *TIMP* が制御するのか。また *TIMP* を染色した際に *MMP11* と同じ部位に *TIMP* が染まる傾向があるか。

(回答) *MMP11* は *TIMP1* にて制御される。今回は *TIMP* について免疫染色を行っていないので局在の一致は不明である。

質問14) *MMP11* が有用な biomarker となりうる印象はあるか。

(回答) 現時点ではわからない。さらに症例を増やして多変量解析で有意差が得られれば、有望かもしれない。

質問15) 今後治療の分子標的とするならどのような方法で使うのがよいか。

(回答) 2009年に大腸がんにおいて *MMP11* を腫瘍抗原としてがんワクチン療法を行った preclinical の報告があるが、それ以降の報告はない。抗体や阻害薬の開発など、がんワクチン療法以外の方法を検討する必要がある。

質問16) 同一患者の転移巣でも免疫染色をして評価をしたのか。

(回答) 通常、リンパ節転移のある症例は手術をしないため、サンプルがなく今回は評価できていない。

質問17) 正常膀胱はどのようなルートで採取したか。また膀胱癌患者の正常粘膜は採取していないのか。

(回答) 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を採取している。膀胱癌は多中

心性発癌とされ正常と癌組織が肉眼的に区別できないこともあるので、膀胱癌患者から正常膀胱は採取していない。

質問 1 8) miRNA の導入効率はどれくらいか。

(回答) 細胞株、導入する miRNA の配列、導入方法の違いで効率は変化する。リポフェクション法における導入効率は基本的に *miR-1* が *PTK9* を 90% 以上ノックダウンする至適条件に倣って、実験の条件を定めている。正確には蛍光色素のついた double strand RNA (dsRNA) を導入し評価する方法があるが今回は行っていない。

質問 1 9) mock、control 2 つのコントロールを置く理由はどうしてか。

(回答) 導入試薬の添加や、または miRNA を核酸導入した影響 (off target 効果) で cell viability の変化が観察されることがあるためである。

質問 2 0) *MMP11* が遊走浸潤に関わっているのに T stage で差が出ないのはなぜか。

(回答) 今回の研究ではサンプル数が少なかったことが一つの要因ではないかと考えている。

質問 2 1) マイクロアレイの発現解析は triplicate で行っているのか。

回答) より正確性を考えれば 3 回行う方がよいと考えられるが、予算の関係もあり 1 回しかしていない。そのため実際に標的遺伝子を評価する際には mRNA、蛋白レベルの評価を qRT-PCR、WB にて行い補完している。

質問 2 2) Guide 鎖、Passenger 鎖が両方とも働いているという報告は他にもあるのか。良く知られているのか。

(回答) 当科で膀胱癌における *miR-145/miR-145'* が同様に癌抑制型 miRNA として機能することを報告しているが、その他にも乳癌において *miR-200-5p/miR-200-3p* が EMT を阻害しているとする報告がある。

質問 2 3) メチル化は *miRNA-139* の 5' 側に target があると考えてよいか。

(回答) 上流にプロモーター領域あると思われる、その部分のメチル化が発現に影響を与えていると考えている。

質問 2 4) *miR-139* において OS との関連がなかった理由はどのように考えているか。

(回答) 複数の癌抑制 miRNA が、*MMP11* の発現を制御しており、一対一の対応でないことが原因と考えている。

質問 2 5) Table 1 と Table 2 において *MMP11* 以外で重複しているものはないか。

(回答) 重複しているものはない。

質問 2 6) Tissue microarray ではなく、実際の臨床検体にて免疫染色してみたか。

(回答) 臨床検体でも免疫染色をしたが、*MMP11* は正常膀胱と思われる部位でも腫瘍部と同程度発現を認めた。膀胱癌組織は正常膀胱粘膜と近接しており、正しい評価が困難と考えて Tissue microarray を使用した。

質問 2 7) *MMP11* の発現を早期癌の腫瘍マーカーとして考えることは可能か。

(回答) *MMP11* はよりリンパ節、遠隔転移症例で発現高値であり、早期癌の腫瘍マーカーとしては不適と考えている。

質問 2 8) ルシフェラーゼアッセイでもう少し長い配列を入れて、2 つ同時に miRNA の効果を評価しなかったか。

(回答) 長い配列はベクターへの導入効率の問題があり、今回は検討していない。

質問 2 9) この 2 つの miRNA を同時に発現導入すると相乗効果はあるか。

(回答) これら miRNA を同時に核酸導入して機能解析してみたが、相乗効果は認められなかった。2 つの miRNA が相補的に bind してしまい、機能しない可能性が考えられた。

質問 3 0) miRNA の Passenger 鎖が安定化して機能するメカニズムは何か。

(回答) miRNA の guide 鎖及び passenger 鎖は 5' 側の配列により RISC タンパクに取り込まれる効率が異なるとの報告がある。しかしながら実際はその発現割合は組織によっても異なるため、明確なことはわかっていない。

質問 3 1) *PDE2A* の近傍にメチル化を起こすような配列があることを確認したか。

(回答) ゲノム上 *PDE2A* の約 50kb 上流に複数個所の CpG island を確認している。

質問 3 2) RNA later® はどのような試薬なのか。

(回答) RNA を安定化する試薬で、70% 飽和硫酸溶液に EDTA、クエン酸ナトリウムなどが含まれる。急速な脱水によるタンパクの固定と高塩濃度による RNase の阻害により RNA が安定化すると考えられる。試薬中に保存した RNA は 37°C で 1 日、2~8°C で 4 週間安定である。サンプルは -20°C あるいは -80°C で長期間保存可能となる。

質問 3 3) Deep sequencing という言葉があるがどのような意味合いでこのような言葉が出てきているのか。

(回答) Deep sequencing とは、あるゲノム領域を複数回シーケンスすることを意味する。同時に複数 (通常 30-40reads 以上) のシーケンスを一度に行い、コンピュータによるアライメントと呼ばれる作業で最終的な配列を決定する。元のサンプルの僅か 1% に存在する遺伝子変異も検出することが可能であり、いわゆる次世代シーケンシングとして、前 (現) 世代のシーケンスなどと 区別される。

質問 3 4) Table 1 で common gene という表現をするのは普通なのか。

(回答) common target gene (共通の遺伝子) という意味で使用した。

質問 3 5) Dual luciferase assay であまり大きく発現の差が出ていないが、どのように考えているか。

(回答) ルシフェラーゼベクターに組み込んだ標的配列と miRNA の結合効率が相対的に低かった影響と考えている。実際に臨床検体において *MMP11* の発現と *miR-139-5p/miR-139-3p* は負の相関の傾向があり、*miR-139-5p/miR-139-3p* による直接制御をサポートするデータである。

質問 3 6) ルシフェラーゼの発現の差が出ていないのは、プラスミド DNA のコンストラクトにおいて挿入している配列が短い影響で activity の低下が得られないのか。

(回答) ルシフェラーゼのベクターは *MMP11* の 3'-UTR と *miR-139-5p/miR-139-3p* の結合配列も含めて 100bp 程度の塩基配列を挿入している。長い配列はベクターへの導入効率の問題があり、長さとしては問題ないと考えていたが、今後は挿入配列の長さについても検討したいと考える。

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。