

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第453号		学位申請者	出先 亮介
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士(医学)
	副査	中川 昌之	副査	井戸 章雄
	副査	武田 泰生	副査	上野 真一

主査および副査の5名は、平成29年8月7日、学位申請者 出先 亮介君に面接し、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た。

質問1) siCYHRI の anti-sense の配列はどこを用いているのか。

(回答) siRNA-I は sense が CYHRI CDS のスタートコドンから 310 番目の 21 塩基を標的にしており、anti-sense はその逆配列である。

質問2) siRNA 導入後 48 時間で細胞を播き直しているが、どの時点での発現か。発現はずっと抑制されているのか。

(回答) siRNA 導入 48 時間後の発現をみている。siRNA 導入による発現抑制は数日から数十日と考えられ、siRNA 群では 7 日間で細胞増殖が抑制されており、この間は発現が抑制されていたと考えられる。

質問3) コントロールに GFP を使っているが、導入効率をみるとするために使っているのか。

(回答) siRNA のコントロールとして GFP の siRNA を用いている。導入効率は細胞数の測定でみている。導入効率は 90% であった。

質問4) 動物実験で皮下移植後に形成した腫瘍に注入しているが、腫瘍内に確実に注入できたのか。

(回答) 皮下移植後 1 週間で長径 2 mm、短径 1 mm 程の腫瘍が形成されていたので注入可能であった。

質問5) 増殖抑制の機序はどのように考えるか。

(回答) GSEA にて CYHRI の機能を評価したところ、CYHRI の mRNA の発現はアボトーシス関連遺伝子と負の相関を認めたため、CYHRI はアボトーシスを抑制すると考えられ、CYHRI の発現を抑制することでアボトーシスが誘導されたためと考える。

質問6) 浸潤能も抑制されているが、siRNA 導入細胞は同じ条件ではなかなか浸潤しなかったのではないか。

(回答) Invasion assay に関しては細胞数を増やして行った。

質問7) scattering(分散)は行ったのか。

(回答) 本研究では行っていない。

質問8) 遠隔転移はすべてリンパ節転移なのか。

(回答) 遠隔転移はすべてリンパ節転移である。

質問9) 転移巣における CYHRI の発現はどうか。

(回答) 今回は転移組織における CYHRI の発現の評価をしていないが、胸膜転移巣由来の TE-9 においては CYHRI の発現が低かった。

質問10) なぜ CYHRI に着目したのか。

(回答) 本研究は多施設共同研究の一環で行われた。マイクロアレイで食道癌に特異的に高発現もしくは低発現の遺伝子を同定し、そのうち 3 つの遺伝子に対する解析を当教室で行った。CYHRI はその遺伝子の中の一つである。

質問11) CYHRI はマウスの Galectin-3 の結合タンパクではあるが、マウスでは CYHRI は解析されているのか。

(回答) マウスの CYHRI の解析は行われていない。

質問12) CYHRI は正常の臓器にも発現しているのか。

(回答) 正常臓器にも発現している。正常組織の中では睾丸に高発現している。

質問 1 3) TE-8 で CYHRI の発現が高いが、細胞由来に何か特徴があるか。

(回答) TE-8 はヒト食道癌原発巣由来の細胞株で中分化型扁平上皮癌であり、特に特徴はない。

質問 1 4) 悪性度と CYHRI の発現の相関はあるのか。

(回答) CYHRI はステージと関連しており、CYHRI の発現は悪性度と関連していると考えられる。

質問 1 5) Grade (異型度) との関連はどうか。

(回答) 組織学的な分化度とは関連が認められていない。

質問 1 6) 遊走能については調べていないのか。

(回答) 今回は遊走能に関しては調べていない。

質問 1 7) CYHRI は腺癌では発現していないのか、また他の癌ではどうか。

(回答) 腺癌における発現の検討はしていない。他の癌に関しても報告はみられていない。疾病についてはエリスロポエチンに関する報告だけである。

質問 1 8) CYHRI とエリスロポエチンとの関連は。

(回答) 透析患者において血清の CYHRI の intact protein が多い場合エリスロポエチン投与による貧血の改善が悪く、血清の CYHRI の peptide fragment が多いと貧血の改善が良かったと報告されている。

質問 1 9) 食道癌では CYHRI が高発現しているほどリンパ節微小転移等を促進させていると考えてよいか。それにはアポトーシスの抑制が関連しているという仮説に対して何か実験をしていないのか。

(回答) CYHRI の発現は悪性度と関連していると考えられる。アポトーシスとの関連については、CYHRI 発現群で GSEA のデータでアポトーシスに関連遺伝子と負の相関がみられたため、アポトーシス抑制の可能性が示唆される。直接的な実験はしていない。今後の検討課題としている。

質問 2 0) GSEA は色々な人種・癌が混ざっているのか。

(回答) GSEA とは一定の機能や局在などとの発現に関連をもつ、特定の遺伝子群の遺伝子セットがあらかじめ準備されており、CYHRI の発現している細胞で増加または減少した遺伝子群がどの遺伝子セットに多く含まれているかを調べるものである。

質問 2 1) CYHRI の発現がアポトーシス関連遺伝子と負の相関、MYC signal 遺伝子と正の相関をしているが、siRNA で CYHRI の発現をノックダウンしたときに増殖が抑えられている。アポトーシスも誘導されるはずであるが、形態を見たときにどうであったか。

(回答) TE-8 で CYHRI の発現を抑制した際の細胞の形態に関して、アポトーシス関連遺伝子の免疫染色などは行っていない。

質問 2 2) Apoptosis 関連遺伝子はみていないのか。

(回答) CYHRI の発現を抑制したときの Apoptosis 関連遺伝子はみていない。今後の検討課題としている。

質問 2 3) コントロールに GFP を使用しているが、GFP そのものの遺伝子を入れているのか。蛍光的に導入率はみていないのか。

(回答) コントロールとして GFP 遺伝子の siRNA を用いたもので、蛍光蛋白質の発現は行っていない。

質問 2 4) CYHRI のタンパクの発現が Galectin-3 の細胞内輸送に関わるということで、局在が細胞質にあるということだが、このデータからいうと制御的な機能をもつ印象がある。細胞内輸送に関わる機能と増殖抑制・浸潤抑制機能との関連はどうか。

(回答) CYHRI のタンパクの機能として Galectin-3 の細胞内輸送に関わることが報告されている。Galectin-3 の機能としての報告は p53 pathway を調節して、アポトーシスを抑制すること、K-ras との反応で腫瘍の進展を促進すること、血管新生や腫瘍細胞の migration を促進することが報告されている。CYHRI 自体の機能としては Galectin-3 の細胞内輸送で、増殖抑制機能に関しては Galectin-3 を介した経路の可能性がある。今回は Galectin-3 の発現については検討しておらず、今後の研究課題としている。

質問 2 5) 3 種類の siRNA を用いており、siRNA の 1 と 2 は増殖抑制がかかっているが、siRNA-3 に関しては増殖抑制

をしていない理由は何か。

(回答) siRNA-2 は CYHR1 CDS のスタートコドンから 499 番目の 21 塩基を標的にしており、siRNA-3 は 682 番目の 21 塩基を標的にしている。si-RNA1 が 310 番目の 21 塩基を標的にしている。siRNA-3 で浸潤・増殖が抑制されていない理由に関しては、今後の検討課題としたい。

質問 2 6) Table1 は手術症例であるが、リンパ節転移と遠隔転移があがっているが何故か。

(回答) 遠隔転移は臓器転移ではなく、すべて遠隔リンパ節転移であるため、遠隔転移としてあがってきた。

質問 2 7) CYHR1 の高い症例の意義は何か。早期癌では低いのか。

(回答) CYHR1 の発現はステージと相関しており、早期癌では低く、進行癌では高い傾向があった。

質問 2 8) CYHR1 は正常組織でも発現されており、癌で過剰発現される機序は何か。

(回答) 現時点では癌で過剰発現される機序は不明であり、文献的にも報告されておらず、今後の検討課題としたい。

質問 2 9) CYHR1 は治療標的になりうるのか。

(回答) 本研究で CYHR1 を抑制することで腫瘍の進展を抑制しており、治療ターゲットにはなり得ると考えられる。

ただし、具体的なネットワークも現時点では不明であり、今後の検討課題としたい。

質問 3 0) 増殖実験の培地交換はどのようにしたのか。

(回答) siRNA 導入し細胞を播いたあと、day2, day5 で培地を交換した。

質問 3 1) 他の食道癌遺伝子との関連はどうか。

(回答) 他の食道癌遺伝子との関連は実験しておらず、文献的報告も見当たらない。今後の研究課題としたい。

質問 3 2) タンパクを見る実験はないが抗体はないのか。

(回答) 抗体はあり、免疫染色は行っている。

質問 3 3) 免疫染色での特徴はあったのか。

(回答) 十分な症例の免疫染色実験は行っておらず、現時点で明らかな特徴は報告できず、今後の研究課題としたい。

質問 3 4) Lipofectamine ナノ粒子複合体とはどのようなものか。

(回答) Lipofectamine TM RNAiMAX を使用したリポソームと DNA の複合体である。

質問 3 5) TCGA のデータの予後解析で median では差がない理由はどのようなことが予想されるか。マイクロアレイの種類は同一か。

(回答) マイクロアレイは TCGA の解析と同じ形式のものを用いている。TCGA 解析で median での差が出なかった理由は、現時点で明確な答えは出せておらず、今後の検討課題としたい。

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。