

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 号		学位申請者	米盛 圭一
審査委員	主査	440 中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	井戸 章雄	副査	橋口 照人
	副査	古川 龍彦	副査	上野 真一

主査および副査の5名は、平成29年9月1日、学位申請者 米盛 圭一 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) miRNAのトランスフェクションでは導入効率をみているか。

回答) 癌細胞へのmiRNA導入効率(全ての癌細胞にmiRNAが導入されているか)については、検討していない。実験で用いている核酸(miRNA)導入試薬により、ほとんどの癌細胞の細胞膜にmiRNAは接着し、多くの癌細胞はmiRNAを取り込んでいると考えている。今回の解析ではないが、ウイルスベクターを用いた実験系では、miRNAの癌細胞への導入効率はほぼ100%であった。

質問2) FOXQ1のルシフェラーゼアッセイのプラスミドは何baseの配列を入れているのか。またtarget siteの配列は何baseか。Target siteにmiRNAが結合するかしないかには、周囲の構造が関係しているのか。200baseのように長い塩基配列を入れようとするとその細胞への導入効率が落ちるのか、組み換え効率が落ちるのか。

回答) ルシフェラーゼアッセイのプラスミドに挿入する塩基配列は、100塩基程度を基準としており、今回の実験でも96~110塩基の配列を挿入した。Target siteの配列は7-8塩基である。周囲の配列によって、Target siteにmiRNAが結合する効率が悪くなる事については、特に無いと考えている。ただし、Target siteに類似の配列が存在すれば、効率は悪くなると思われる。今回用いているベクターでは、200base程度の配列を組み込んでも、癌細胞への導入効率は変わらないと考えられる。

質問3) guide 鎖と passenger 鎖はどこで決まるのか。

回答) guide 鎖と passenger 鎖は、一般的にこれまでのシーケンス解析で、多く細胞内に存在するmiRNAをguide 鎖としている。また、他の生物種と比較して保存されているmiRNAをguide 鎖としている。しかし、miRNAの研究からどちらがguide 鎖であるか区別ができないmiRNAも存在する。

質問4) guide 鎖と passenger 鎖で、RISC complexへの取り込みに差はあるのか。

回答) guide 鎖のほうが passenger 鎖よりも取り込まれやすいとされている。我々の最近のAgo2を用いた免疫沈降の実験から、passenger 鎖も一部はRISC complexへ取り込まれていることがわかっている。

質問5) miRNAにおけるメチル化では遺伝子と同じような制御機構が働いているのか。

回答) 遺伝子と同様にプロモーター領域のメチル化による発現抑制が働いている。癌細胞で発現抑制が認められたmiRNAに対して、脱メチル化剤を癌細胞へ添加する事で、miRNAの発現が回復するという報告がある。この事からもmiRNAの発現制御機構としてDNAメチル化が影響していることが示唆される。

質問6) miR-216-3pの標的遺伝子探索で、FOXQ1よりPERPのほうがp値からみると肺癌では重要ではないのか。

回答) 今回の解析の目的は肺癌に関わる分子ネットワークの解明が目標であるので、単一の遺伝子の解析よりは転写因子であるFOXQ1の検討を優先した。

質問7) passenger 鎖の発現を調べる際に、元々細胞内に存在しないのであれば、あまり評価をする意味がないのではないか。またシーケンスである程度 detection されてくるのならば、どのmiRNAもAgo2にしっかり結合しているか

らではないのか。

回答) 今回のシーケンス解析は、細胞から total RNA を抽出してライブラリーを作成している為、細胞内で転写されて分解されていない miRNA を検出している。miRNA が機能するには RISC に取り込まれて Ago2 への結合が必要だが、passenger 鎖が機能を有しているかという疑問に対し、RISC に取り込まれている事を一つの指標にして評価した。

質問 8) シーケンスの発現量をみただけで miRNA の機能の予測はつくのではないか。

回答) 細胞内に存在している miRNA の機能を、発現量から全てを予測する事はできないと思われる。発現が抑制されている miRNA は、癌抑制型であると予想できるが、その詳細な機能は細胞株を用いた機能解析が必要である。

質問 9) miR-216b-3p の標的遺伝子候補検索の際に LIFR が low expression で予後が悪くなるとなっているが、これについてはどう考えるか。標的の候補遺伝子から 6 個の遺伝子から FOXQ1 を選ぶときどのように選んだか。

回答) LIFR は肺癌で腫瘍抑制遺伝子としての報告があるが、FOXQ1 の下流にこれが含まれる意義は明らかでない。候補に挙げられた遺伝子の中には PLAU など癌遺伝子として報告があるものも含まれていたが、転写因子である FOXQ1 を解析すれば、下流で制御されるより多くの遺伝子群が解明できると期待し、FOXQ1 を標的遺伝子候補とした。

質問 10) Figure 5 で miR-216b-3p、FOXQ1 とともに発現が 0 に近いものがあるが、どう考えるか。腫組織からの PCR だが、RNA のクオリティは関係していないか。

回答) miRNA と mRNA の発現については、全ての検体で負の相関を示すわけではなく、miR-216b-3p・FOXQ1 とともに発現が低いサンプルが存在する可能性はある。PCR に用いた RNA は実験に耐え得る質のサンプルを用いている。

質問 11) 肺癌で RNA を抽出するときに気をつけていることは何か。

回答) 臓器摘出後なるべく早くに組織を採取し凍結保存することと、抽出時夾雑物の混入が無いように丁寧な操作で行うことを心掛けている。

質問 12) FOXQ1 の下流解析で EMT 関連遺伝子は挙がっていないのは何故か。

回答) FOXQ1 下流遺伝子の検索は FOXQ1 ノックダウン細胞でアレイ解析を行ったが、発現値を logFC -1.0 以下で限定したため、リストアップできなかった。EMT 関連遺伝子については個別に解析する必要があると思われる。

質問 13) FOXQ1 の発現と TNM stage で有意差が出ない理由は何か。

回答) 今回の検討では M1 症例は外して検討しているため、TNM stage は N で規定される部分が多いが、有意差が出ない理由として一つは使用した検体数が 35 と少ないことがあると思われる。

質問 14) FOXQ1 とリンパ節転移に関する報告はあるか。

回答) 胃癌において、FOXQ1 高発現はリンパ節転移と予後不良因子であるとの報告がある。

質問 15) DNA data base から FOXQ1 を拾い上げる方法で miRNA を用いる利点は何か。初めから遺伝子に対するマイクロアレイをかければ早いのではないか。

回答) マイクロアレイでは候補となる遺伝子が既知のものに限られるが、miRNA を起点とする解析では機能が不明な遺伝子も標的候補として挙がる可能性があり、これまでわかっていなかった新たな癌遺伝子の発見につながる事が期待できる。また、理想的には、癌の遺伝子解析には、蛋白コード遺伝子、非蛋白コード遺伝子、miRNA の網羅的な発現解析が必要と思われる。

質問 16) 癌の proliferation、migration、invasion に関与する代表的なものは何か。

回答) Proliferation は p53、migration は Rho family、invasion はインテグリンや MMP などが挙げられる。

質問 17) FOXQ1 の下流遺伝子に予測したものが含まれていたか。

回答) FOXQ1 の機能解析から、細胞の遊走・浸潤に関わる遺伝子群が含まれることを予想していたが、下流遺伝子解析では複数のラミニン・インテグリンが含まれており、予測通りの結果であった。

質問 18) Long noncoding RNA について説明して下さい。

回答) Long non coding RNA は noncoding RNA の中で 200 塩基以上のものを指し、機能は不明なものが多い。幾つかの Long non coding RNA は、転写調節や mRNA の安定化に関与している事が報告されている。今後、機能性 RNA の中で、Long non coding RNA は癌研究の重要な位置を占めると考える。

質問 19) miRNA に比して long noncoding RNA の研究が進んでいないのはどう思うか。

回答) Long non coding RNA は、転写産物が大きく、転写開始点が不明なこと、様々なバリエーションが存在することから、解析が容易ではない。また、解析ツールやデータベースが整備されていないことも大きな理由と思われる。

質問 2 0) KRAS mutation は miR-217 の低発現とどう関連しているか。

回答) KRAS mutation と miR-217 の低発現の関係は不明である。

質問 2 1) 「ectopic」の示すところは何か。

回答) 「ectopic expression」は Transient transfection の意味で用いている。

質問 2 2) miR-216family がクラスターをつくる合目的なところは何か。

回答) クラスターを形成している miRNA は、転写ユニットが共通している事が示されている。ゲノム中で miRNA が、クラスターを形成している生物学的な理由は依然不明である。

質問 2 3) FOXQ1 は正常でも発現しているか。

回答) 胃、気管、膀胱、唾液腺、十二指腸や前立腺などで発現している。

質問 2 4) FOXQ1 の正常での function は何か。

回答) 上皮系細胞の分化の促進や、平滑筋の分化の阻害、胃の粘液細胞におけるムチンの発現調節を行っている。

質問 2 5) FOXQ1 が正常細胞も含め、細胞骨格と関与している報告はあるか。

回答) 正常の乳腺細胞において、FOXQ1 が TGF- β 1 を誘導してアクチンによる細胞骨格の形成を阻害することが報告されている。

質問 2 6) FOXQ1 のリンパ節転移巣での発現は確認しているか。

回答) 今回は確認していないため、今後検討したい。

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。