

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 496 号		学位申請者	大迫 祐作
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	橋口 照人	副査	上野 真一

主査および副査の5名は、平成31年1月23日、学位申請者 大迫 祐作 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) MMP13の免疫組織化学染色で、染色強度で分化度やステージなどの相関はあったか。

回答) MMP13の免疫染色では、癌部ですべて強陽性となり、臨床因子との関連は検討できなかった。

質問2) MMP13の下流遺伝子が、癌細胞のphenotypeに関与するとあるが、具体的にどうなるか。

回答) KIF14で、増殖能・コロニー形成能が促進する報告がある (Corson et al. Clin Cancer Res, 13 (11), 3229-34, 2007)。

質問3) miR-375はAMLや前立腺癌では逆の報告がある。Dual functionをもつメカニズムをどう考えるか。

回答) マイクロRNAの発現を制御している分子機序は未だ不明な点が多い。同じマイクロRNAが、細胞によって発現状態が異なる分子機序は、今後の課題である。マイクロRNAの発現を制御している転写因子の探索が重要と考える。

質問4) miR-375の標的遺伝子として複数挙げられているが、それぞれの報告で標的が異なるのはなぜか。

回答) 解析に用いたプラットフォームや、細胞株が異なるためと思われる。

質問5) Table 1について、再発形式は何が多いか。 回答) 25例中再発は10例で、縦隔リンパ節転移が7例であった。

質問6) invasion assayの際、増殖因子は入れたか。 回答) 浸潤・遊走が盛んな細胞を用いており、使用しなかった。

質問7) MMP13を抑制して増殖能が低下したが、miR-375の導入で増殖能は変化しない。この差はなぜ起こるのか。

回答) miR-375を導入した場合、多数存在するmiR-375の標的遺伝子の発現が抑制される。si-MMP13は、直接制御するのはMMP13のみであるため、機能解析実験の結果に差が表れたと考えられる。

質問8) MMP13のルシフェラーゼの発現低下はmRNAの分解によるものか。 回答) miR-375導入細胞におけるMMP13 mRNAの発現抑制と、WBによる解析を加味して、miR-375は、MMP13に直接結合し、分解していると考えられる。

質問9) miR-375により発現低下と、逆に亢進する遺伝子がある。その場合、同じ認識配列を介しているのか。

回答) miR-375により負に発現が制御される転写因子があれば、転写因子の制御する遺伝子発現が変化すると考える。

質問10) MMP13の下流遺伝子として、細胞周期に関連する遺伝子群が挙げたとあるが、「下流」といってよいのか。MMP13の作用により、密な細胞が疎な組織に移行するで、細胞周期が回転しやすい状況になるのではないか。

回答) MMP13は細胞外マトリックスに作用する。細胞外マトリックスの異常は、様々なシグナルの活性化を誘導することから、MMP13を介したシグナル伝達経路の活性化により、細胞周期関連遺伝子の発現が上昇した可能性がある。

質問11) マイクロRNAに比べて、long non-coding RNA (lncRNA) についての報告が少ないのはなぜか。

回答) lncRNAは転写産物が大きく、様々なスプライスバリエントが存在することから解析が容易ではない。反面、マイクロRNAは、19~22塩基の1本鎖RNAであることから、合成可能であり、実験が容易であるため。

質問12) 癌細胞において、miR-375のectopic expressionはなぜ起こるのか。

回答) 癌遺伝子や癌抑制遺伝子と同様に、塩基置換や欠失、DNAのメチル化等により発現異常を示す。

質問13) マイクロRNAを制御するシステムは、治療標的としての可能性はあるか。

回答) 特定のマイクロRNAを制御する分子機序が明らかになれば、治療の標的となりえると考えられる。

質問 14) MMP13 は、免疫染色において、強拡大すると細胞のどこに染まっているか。

回答) MMP13 発現は主に細胞質にみられた。また、腫瘍先進部で強い発現がある傾向がみられた。

質問 15) apoptosis の評価はしたか。 回答) 研究時点では、当科で実験手法が確立しておらず、行っていない。

質問 16) MMP と増殖能との関連はこれまで報告されているのか。

回答) 文献では、MMP と増殖能の関連は報告されている (Gialeli et al. FEBS J, 278 (1), 16-27, 2011)。

質問 17) MMP13 の発現について、転写因子の関与や、MMP13 の promoter 領域についてはどうか。

回答) MMP13 のプロモーター領域には転写因子の AP-1 や Cbfa1 (RUNX2) の認識配列があり、PTH による MMP13 発現を調整している、という報告がある (Hess J et al. J Biol Chem, 276 (23), 20029-38, 2001.)。

質問 18) MMP による浸潤能・遊走能の促進は既知であるのに、あえてアッセイを行った理由はなぜか。

回答) これまでの解析結果を検証する事を目的に、解析を行った。

質問 19) 文献では MMP13 の発現を上昇させるメカニズムについて、どのように考察されていたか。

回答) TGF- α ・TGF- β ・TNF- α などのサイトカインによる誘導や、MT1-MMP や MMP2 による活性化について考察されていた (Etoh T et al. Gut, 47(1), 50-6, 2000.)。

質問 20) 本研究での MMP13 と臨床因子の関連はあったか。 回答) 臨床因子との関連は見出せなかった。

質問 21) マイクロ RNA で mutation は起こらないのか。

回答) マイクロ RNA でも mutation は存在する。例えば一塩基多型で、seed 配列の変異があれば、一塩基の違いで標的遺伝子は大きく変わるため、機能が変化する可能性がある (Hill CG et al. PLoS One, 9(12), e115241, 2014)。

質問 22) マイクロ RNA の発現は、手術や化学療法・放射線などの前治療で変わるか。

回答) 手術や化学療法・放射線治療の修飾でマイクロ RNA の発現量は変化していると思われる。治療前後の生検検体や、血液中のエクソソーム内のマイクロ RNA の解析を行い、発現量を比較することは今後の検討課題である。

質問 23) 標本はプレパラートから採取したものか。腫瘍量の評価はどのように行ったか。

回答) PCR に用いた RNA は凍結標本から採取した。それぞれの標本における腫瘍量の評価はできていない。

質問 24) 癌抑制遺伝子については、マイクロ RNA はどのように関わっているか。

回答) 癌促進型マイクロ RNA は、癌において発現が上昇しており、癌抑制遺伝子を標的として、その機能を抑制することで癌を促進させることが報告されている。

質問 25) CENPF タンパクが過剰発現すると細胞はどうなるか。

回答) CENPF が様々な癌種で癌の進展に関与し、予後予測因子として重要であることが報告されている。

質問 26) 食道癌細胞は、細胞周期は早いものなのか。 回答) 検体は低~高分化と幅広く、早いものばかりではない。

質問 27) MMP13 は細胞外基質を分解することは知られているが、細胞質内での機能で知られているものはあるか。

回答) MMP13 は骨のリモデリングの際に骨芽細胞で発現が亢進しており、細胞増殖に関与している可能性がある。

質問 28) MMP13 で増殖能が刺激されるということだが、MMP13 を外から入れるとどうなるのか。

回答) 細胞表面のシグナルを介して増殖を促進する可能性がある。今後の検討事項である。

質問 29) CENPF の発現が多くなると、染色体異常が起こりやすい状態になることが予想されるが、p53 の野生型と変異型で MMP13 の発現や予後との関連はあるか。

回答) p53 の野生型を導入した扁平上皮癌細胞株では、MMP13 発現が低下し、増殖能・浸潤能が抑制されたという報告がある (Ala-aho R. Oncogene, 21(8), 1187-95, 2002) 。 p53 の変異と MMP13 の過剰発現および食道癌患者の予後は相関している可能性があり、p53 野生型・変異型の細胞株を用いた解析は重要である。

質問 30) 頭頸部癌ではセツキシマブが有効だが、食道癌では、実際には効果があるのか。

回答) 頭頸部癌では EGFR 陽性率は 90%以上で、変異はほとんどなく、EGFR 阻害剤が有効である。食道癌では、EGFR 陽性率は約 50%と頭頸部癌に比較して低い。さらに EGFR の変異率は高く、効果のない症例が多いと考えられる。

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。