

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	502号	学位申請者	伊地知 徹也	
審査委員	主査	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	吉本 幸司
<p>主査および副査の5名は、平成31年1月11日、学位申請者伊地知 徹也 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。</p> <p>質問1) 既存の研究で癌部と非癌部のアレイ解析が行われているが、今回新規の microRNA プロファイルを作成した意義は何か。RNA シークエンスでスクリーニングしたメリットは何か。また、既存の解析に passenger 鎖は認められるのか。</p> <p>回答) 次世代シークエンサーを用いた膵癌組織における microRNA シークエンスは報告が少なく、新規の機能性 microRNA を検索できる可能性があるかと予想した。既存の microRNA 発現リストでも passenger 鎖を認めるが、発現リストに挙げられるのみで、本研究のように機能解析まで施行した報告はごく少数である。また miR-148a-5p の機能解析を行った報告は認めなかった。</p> <p>質問2) microRNA の guide 鎖と passenger 鎖は両方とも Ago2 結合を示すのか。</p> <p>回答) guide 鎖、passenger 鎖に限らず、microRNA は Ago2 に結合し RISC complex を形成することが報告されている。本研究では miR-148a-5p(passenger 鎖)/3p(guide 鎖)双方が Ago2 に結合し細胞内に取り込まれることを証明した (Fig. S2)。</p> <p>質問3) Fig 3 で示した遺伝子群 (PHLDA2, LPCAT2, AP1S3, SMS, ENDOD1, UHMK1) は TCGA で予後に関連していたが、本研究に用いた検体 (30 症例) では臨床病理学的因子の関連はあったか。</p> <p>回答) 当教室の臨床検体での発現解析では、臨床病理学的因子との有意な関連は示せなかった。解析に用いたのは30症例のみであり、更なる症例の蓄積が必要である。</p> <p>質問4) Cell line は PDAC を用いているが、膵癌 Stem Cell 条件での実験は行ったのか。</p> <p>回答) 本研究は一般的な PDAC Cell line のみ用いており、Stem cell での実験は施行しなかった。</p> <p>質問5) PHLDA2 の下流遺伝子を示したが、下流遺伝子の今後の展開をどのように考えるか。Akt との関連はあるのか。</p> <p>回答) 今後は他の膵癌抑制型マイクロ RNA の解析を同手法で進めていき、重複する下流遺伝子を探索することで、膵癌にとってより重要な経路を見出す可能性があると考え。Akt は miR-124-3p の標的である IntegrinA3/B1 の下流遺伝子として認めており (Idichi et al. <i>Oncotarget</i>. 2018 Jun 22;9(48):28849-28865) 膵癌にとって重要な経路と思われるが、PHLDA2 との直接的な関連は示せなかった。</p> <p>質問6) 患者背景として再発17症例を認めるが、再発形式は何か。</p> <p>回答) 従来の報告通り肝転移再発が最も多かった。次いで肺転移、腹膜播種転移を認めた。</p> <p>質問7) Table 2 では患者背景を示しているが、非癌部とは全く正常の膵臓か。慢性膵炎等の背景疾患はないのか。</p> <p>回答) 術前加療を行った症例も多く、膵炎発症例も含まれており、全くの正常膵症例は少ない。</p> <p>質問8) Fig. 5 における PHLDA2 の免疫染色では癌部で組織型によって変化はあるのか。同一患者においても癌部と非癌部での差があるのか。</p> <p>回答) PHLDA2 の免疫染色は癌部であれば強陽性を示しており、組織型による差異は明確ではなかった。非癌部膵臓では有意な染色を認めなかった。</p> <p>質問9) miR-148a-5p/3p の発現は同一症例で差があるのか。</p> <p>回答) miR-148a-5p/3p の発現は正の相関関係を示すが、完全な一致はせず同一症例での差を認めた。</p> <p>質問10) Fig. 7 において PHLDA2 による miR-148a-5p のレスキュー実験を行っているが、PHLDA2 を Over expression しただけの実験ではどうか。</p> <p>回答) PHLDA2 を高発現した Cell line は高頻度で死滅してしまい、機能解析を施行できなかった。このことは元々、PHLDA2 が癌促進遺伝子のため Cell line では高発現を示しており、更に発現を上昇させることが癌細胞にとって何らかの負荷をかけたのではないかと考えている。</p> <p>質問11) Ago2 を免疫沈降し、得られた microRNA を確認したことが、何故導入効率となるのか。通常はパーセンテージで示すのではないか。</p> <p>回答) microRNA が Ago2 と結合し細胞内に取り込まれることは、microRNA が細胞内に何らかの機能を持っていることを示している。細胞内に導入されている証明とはなるが、導入効率とは厳密には言えない。従って、パーセンテージでは示すことはできなかった。今後、microRNA の核酸導入の際の導入効率の測定法は研究課題のひとつである。</p> <p>質問12) Fig. 6、Fig. 7 で PHLDA2 は invasion/migration に主に関与しているが、下流遺伝子での経路解析はしていないのか。invasion/migration 関連経路と関係あるのか。</p>					

回答) KEGG による Enrichment-analysis を行ったが有意な経路は見出せなかった。

質問 13) Table 5 では 12 個の遺伝子が予後と関連しているが、これらの遺伝子セットは予後に反映しているのか。また、解析するアプローチ法はあるのか。

回答) 複数の遺伝子発現を Z-Score で定量化し、予後解析に用いることが可能であるが、今回の研究では解析していなかった。

質問 14) Fig. 7 でレスキュー実験を行っているが、PHLDA2 単個のみでは miR-148a-5p の抑制効果はある程度しか戻せていない。他の遺伝子と組み合わせると同様の解析を行えば、よりレスキューされるのか。また、どのような遺伝子とセットにした方がより効果を示すか。

回答) microRNA が単個で多数の標的遺伝子を持つことを考慮すると、miR-148a-5p の癌抑制効果は複数の標的遺伝子を加えることで、よりレスキュー効果を示す可能性がある。遺伝子の組合せとしては、本研究で見出した膵癌予後不良因子となる標的遺伝子群が対象に挙がる。今後、解析を進めたい。

質問 15) microRNA、またその標的遺伝子を研究することで、今後どのような薬剤を探求することが膵癌にとって効果的と考えるか。

回答) 膵癌の分子研究において、KRAS、p53、p16、SMAD4 の遺伝子異常がすでに確立している。特に KRAS の遺伝子異常は 90% 以上であり、KRAS の上流を標的とする既存の分子標的薬では効果が乏しい。KRAS の下流遺伝子経路を解明し標的とすることで、KRAS の遺伝子異常に左右されない薬剤標的を見出すことができれば、膵癌分子治療のブレイクスルーとなる可能性があると考えられる。

質問 16) Fig 1 で passenger 鎖と guide 鎖の発現相関をとる意義は何か。

回答) Pre-miR-148a から miR-148a-5p、miR-148a-3p が分離合成されるため、発現が正の相関をとることは予想されるが、本研究では全くの正相関ではなかった。症例によっては passenger 鎖である miR-148a-5p が相対的に高値を示している症例も認められた。このことは microRNA の発現が各症例で異なっており、症例の個別化が必要であること、また、guide 鎖のみならず passenger 鎖の研究がやはり必要であることを示唆していると考えた。

質問 17) 論文では XTT/invasion/migration を行ってから Apoptosis を行っているが、解析の順番としては Apoptosis を先にすべきではないのか。Apoptosis で大きく反応する場合は invasion/migration の解析結果に齟齬を示すのではないのか。

回答) 本研究では膵癌細胞株の invasion/migration 実験を先行して行った。Apoptosis 実験は追加実験として行っている。Apoptosis における細胞株減少が invasion/migration の結果に影響を与えた可能性はあるが、invasion/migration の抑制効果は著明であり、XTT の結果を加味すると細胞死による影響は少ないと判断した。

質問 18) 脱メチル化実験を行っているが、その意義はなにか。またメチル化に影響を与える配列が上流にあると考えてよいのか。

回答) miR-148a-3p の発現が脱メチル化に影響を受けることはすでに報告されている。しかしながら passenger 鎖である miR-148a-5p における報告はなされていない。本研究では miR-148a-5p も脱メチル化に影響を受けることを in vitro で証明した。これまでの研究で、Pre-miR-148a の配列上流に CpG アイランドを認めることが報告されている。miR-148a-5p/3p がメチル化のエピジェネティックな制御を受けていることが示唆された。

質問 19) Fig. 1 で Cell line の miR-148a-5p/3p の発現が非常に低いことを示しているが、この意味はなにか。癌細胞にとってどのような意義を示すのか。

回答) 膵癌細胞株において miR-148a-5p/3p の発現は極めて低かった。このことは miR-148a-5p/3p が膵癌抑制型 microRNA の可能性が高く、miR-148a-5p/3p の核酸導入が膵癌細胞株に劇的な変化をもたらす可能性が考えられた。

質問 20) PHLDA2 は正常部での発現はないのか。また正常での機能は何か。

回答) PHLDA2 は PCR 法、免疫染色の結果から非癌部での発現が非常に低いことが証明された。これまでの研究で胎盤、胚細胞の成長を調節する役割としては報告されているが、正常膵臓での機能報告は為されておらず不明である。PHLDA2 はイノシトールリン脂質への結合を介してリン酸化経路への反応が報告されている。膵癌においてはリン酸化経路に影響を与えている可能性がある。

質問 21) miR-148a-5p と PHLDA2 の癌部での局在を確認したか。

回答) In Situ Hybridization によって microRNA の発現局在が確認できると考えたが、当教室では実験法が確立しておらず今回は施行できなかった。今後の microRNA 研究にはおいて重要な実験法であり、早急にプロトコル確立を行いたい。

質問 22) PHLDA2 が予後不良因子ではあるが、分化度や TNM と関係がないのではあれば臨床的な意義は何か。

回答) PHLDA2 は OS、DFS 以外の臨床病理学的因子の関係は認めなかったが、下流遺伝子として多数の膵癌予後に関わる遺伝子を見出しており、今後の症例の蓄積や他遺伝子との組み合わせで、新規検査法・治療法に繋がる可能性があると考えられる。

質問 23) 何故、microRNA の passenger 鎖、guide 鎖で発現の差はでるのか。passenger 鎖が消失していく意味は何なのか。

回答) PCR 法において passenger 鎖は guide 鎖の 100~1000 分の一の発現しか示しておらず、通説のとおり生合成の段階で分解・機能消失を示していると考えられる。しかしながら、passenger 鎖が消失する理由は不明であり、今後 passenger 鎖の機能解析を進めることで、microRNA 生合成の新たな解明されることを期待する。

質問 24) passenger 鎖、guide 鎖の分類は何をもって規定しているか。

回答) 現在は互いの microRNA 発現量の比較で規定している。オープンアクセスデータベースである miRBase (<http://www.mirbase.org/>) において照会することができる。

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。