

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 551 号	学位申請者	福久 はるひ
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	古川 龍彦	副査
	副査	吉本 幸司	副査
			博士 (医学)
			井戸 章雄
			上野 真一

主査および副査の5名は、令和元年10月29日、学位申請者 福久 はるひ 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) EPS8の免疫染色を使った手術検体での予後解析を行わなかった理由は何か。免疫染色を多数の症例で行ったか。

(回答) 術前化学療法を施行されなかった検体を選んで検証したが、染色強度に差がみられなかった。症例数も多くはなく、臨床検体での予後解析は行わなかった。

質問2) EPS8は免疫染色で細胞のどこに発現するか。

(回答) データベース上ではEPS8はゴルジ体に発現するとされ、実際の染色でも核は染まらず細胞質が染色された。

質問3) 腫瘍の浸潤部が強く免疫染色される傾向はなかったか。

(回答) 腫瘍浸潤部で特に強く染色されるということはない。

質問4) EPS8を治療標的として考える際はどのような方法があるか。

(回答) EPS8は細胞内分子であり、阻害効果を示すためには低分子性分子標的薬の開発が必要と考える。

質問5) microRNAと発癌に直接の関連はあるか。

(回答) microRNAが癌抑制遺伝子を抑制することによる発癌の報告がある。例えば、miR-21はPTENなどの癌抑制遺伝子を抑制し、多くの悪性腫瘍の発癌と関連している。

質問6) 膵臓癌では高率にKRAS変異があるということだが、膵臓癌の遺伝子変異とmicroRNAの関連で分かっていることはあるか。

(回答) 癌抑制遺伝子であるp53は膵臓癌の多くで変異していることが知られているが、p53がDrosha複合体と相互作用することで成熟型microRNAを誘導するため、p53の遺伝子変異によりmicroRNAのプロセッシングが抑制されることが報告されている。miR-130bについても、子宮体癌で変異型p53がmiR-130bの発現を抑制し、ZEB1依存性の上皮間葉転換(EMT)と癌細胞浸潤を引き起こすことが報告されている。

質問7) シード配列とは何か。

(回答) microRNAの5'末端から2番目の塩基から数えて7-8塩基までの塩基配列のことを指し、標的mRNAの相補的塩基配列と塩基対を形成して作用する。

質問8) 生存率の解析には、オンラインデータベースにある患者情報を利用したということか。

(回答) OncoLncという、TCGAのポータルサイトを利用した。OncoLncでは、特定の遺伝子の発現状況と生存時間のデータによる解析を、癌種ごとに行うことができる。

質問9) 対照とした膵臓組織は非癌部なのか、他の疾患の正常組織か。非癌部に組織としての異常はないのか。

(回答) 手術検体の、癌組織でない部分から採取したものを正常部として評価した。

質問10) Fig.3で非癌部のEPS8の免疫染色結果はどうか。

(回答) 非癌部は提示していないが、プレパレート中の非癌部ではほとんど染色されなかった。

質問11) microRNAの作用部位、結合する場所は3'-UTRだけか。複数の結合部位があるとしたら、結合する箇所数、組み合わせによって作用が変わることもあるのか。

(回答) microRNAのシード配列が、標的mRNAの主に3'-UTRの相補的塩基配列に塩基対を形成して作用するが、5'-UTRや蛋白質コード領域にも結合部位が存在することが明らかとなっている。組み合わせによって作用が選択されるかについては今後の研究が待たれる。

質問12) microRNAはmRNAを安定化させる作用はあるのか。

(回答) 標的mRNAの不安定化、翻訳開始の阻害、翻訳開始以降の阻害などを通じて遺伝子発現制御を行う。

質問13) microRNAはmRNAの翻訳を抑制するのか。Degradationを速めているわけではないのか。

最終試験の結果の要旨

(回答) mRNA の不安定化と翻訳の阻害の両方を行っている。

質問 1 4) miR-130b-5p の発現抑制の際、メチル化される場所はどこか。

(回答) 遺伝子と同様に、プロモータ領域のメチル化による発現抑制を受けている。

質問 1 5) 正常組織においては miR-130b-5p や EPS8 は何をしているのか。

(回答) miR-130 は癌との関連以外では、高度肥満バイオマーカーの可能性、miR-130 の抑制が PPAR- γ を標的とした心筋リモデリングを促進することなどが報告されている。EPS8 は EGFR が発現している線維芽細胞などで分裂促進の制御を行うことが報告されている。

質問 1 6) EPS8 は複数の癌で高発現しているが、それはどういうメカニズムで高発現となっているのか。それらと miR-130b-5p の発現は関係しているのか。

(回答) 本報告では膵臓癌での EPS8 発現のメカニズムは検討しなかった。パーキットリンパ腫では、癌遺伝子である c-myc の発現は染色体相互転座の結果として免疫グロブリン遺伝子の転写制御をするエンハンサーの支配を受けるようになり、異常大量発現につながるという報告がある。

質問 1 7) EPS8 の点突然変異の報告はないか。

(回答) EPS8 の点突然変異について、またその影響については報告を確認できなかった。

質問 1 8) 血中での microRNA 測定で miR130b-5p はマーカーとなり得るか。

(回答) 今回は検討しなかったが、血中や膵液中での発現については検討の価値があると思われる。

質問 1 9) 膵臓癌の薬物療法は決まっているか。

(回答) GEM 療法、TS-1 療法、または GEM+TS-1 併用療法、FOLFIRINOX 療法などが行われている。

質問 2 0) miR-130b-5p は EPS8 だけに作用しているのか。その他の遺伝子の抑制の結果として EPS8 の抑制ということはないのか。

(回答) miR-130b-5p は多種の癌遺伝子を抑制しており、EPS8 だけに直接作用しているわけではない。EPS8 が、他の遺伝子に対して miR-130b-5p が作用した後の、下流遺伝子としての制御を受けている可能性もあると思われる。

質問 2 1) 臨床検体において免疫染色をしているが、臨床検体での EPS8 の発現と予後を検証しなかったのか。

(回答) 未治療での手術例が少なかったため、今回は行わなかった。

質問 2 2) オンラインデータベースを使用しての解析であるが、人種差はないか。日本人ではどうか。

(回答) 人種間での EPS8 の発現の差異は不明である。日本人については、検討の必要があると思われる。

質問 2 3) EPS8 高発現は microRNA だけでコントロールされているのか。他の理由で増加している場合はないのか。ビッグデータベースでの検証は行わなかったか。

(回答) 今回は miR-130b-5p の抑制により高発現となることを細胞実験で検討したが、おそらく、その他の microRNA の影響、遺伝子異常などの影響で増加している可能性もあると思われ、今後研究の必要がある。

質問 2 4) 多くの microRNA は増殖能ではなく浸潤能、遊走能の方に強く関与しているのか。

(回答) microRNA が癌増殖能に関わるとの報告も認めるが、当科で今まで報告してきた論文では、増殖能の抑制を認めるものであっても、浸潤能抑制や遊走能抑制の方が著明であることが多かった。全報告を確認したわけではないが microRNA は細胞運動性の制御に働きやすいことが予想され、大変興味深く、今後の研究が待たれる。

質問 2 5) PANC-1 におけるウエスタンブロットで EPS8 の Band が 2 つあるのはどうしてか。

(回答) ウエスタンブロットは数回行ったが、どの評価でも PANC-1 は 95kDa 付近に 2 つの Band が検出された。

質問 2 6) Cell line では miR-130b-5p/3p が強く抑制されているのか。

(回答) qRT-PCR での検証で、PANC-1、SW1990 は両方とも非常に低発現であった。膵臓癌 cell line でこれほど低発現なので、検証に値する microRNA であるとの確信を得た。

質問 2 7) Conclusion で miR-130b-5p ではなく pre-miR-130b としているのはどうしてか。

(回答) 今回 passenger 鎖である miR-130b-5p について検証したが、guide 鎖については作用を持つことが既によく知られており、guide 鎖だけでなく passenger 鎖も、両方とも臨床検体中で有意に低下しているという意味で pre-miR-130b とした。

質問 2 8) miR-130b-5p はプロファイルの順番で言えば高い方ではなかったが、どうして選んだのか。

(回答) 2017 年に報告した、膵臓癌 7 例対正常部 4 例で施行したプロファイルであり、有意差のある低い microRNA の方から教室で検証を行ってきた。本研究に至るまでに、数種類の microRNA にて実験を行い、最終的に miR-130b-5p を研究対象とした。

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。