

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 557 号	学位申請者	内田 章文
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査 佐藤 雅美
	副査	古川 龍彦	副査 久保田 龍二

主査および副査の5名は、令和元年11月25日、学位申請者内田章文君に面接し、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) 肺扁平上皮癌で性差があるのは一般的か。使用した臨床検体のうち、喫煙者の割合はどれくらいか。

(回答) 肺扁平上皮癌は男性および喫煙者に多いという特徴があり、男性に偏った性差は一般的なことである。また、今回使用した臨床検体では、30症例全員が既喫煙者であった。

質問2) Cell apoptosis assay の陽性 control の cisplatin 添加細胞は、cisplatin 添加何時間後に細胞を回収したか。また陽性 control での apoptosis を起こした細胞の割合はどれくらいだったか。

(回答) 細胞接着を確認し、cisplatin 添加24時間後に細胞を回収した。全細胞の35~45%程度で apoptosis を認めた。

質問3) 肺扁平上皮癌では、17番染色体長腕の欠損、欠失がみられるのか。

(回答) 検索しえた限りで、肺扁平上皮癌において17番染色体長腕の欠損、欠失は一般的にはみられない。

質問4) miR-451a 核酸導入後の細胞の生存率はどれくらいか。miR-451a、si-KIF2A 核酸導入により apoptosis が誘導されるが、apoptosis が誘導された細胞は遊走能、浸潤能の解析に影響しないのか。

(回答) miR-451a 核酸導入後では15%の細胞で、si-KIF2A 核酸導入後では20~30%の細胞で apoptosis が誘導された。apoptosis が誘導された細胞は遊走能、浸潤能の結果に影響するが、遊走能では傷作前部の細胞分布に明らかな差異がないように、浸潤能ではゲル内の細胞数が同一になるように細胞数を調整するため、影響は限定的と考える。

質問5) 免疫染色での KIF2A の発現解析において、扁平上皮癌部と正常部とでの発現に差が少ないのはなぜか。

(回答) KIF2A は正常細胞の微小管にも発現しており正常組織の細胞質内でも一部に発現がみられる。そのため、強度、範囲を半定量し比較したグラフ上では、癌部と正常部で差が少ないようにみえるものとする。

質問6) 免疫染色で KIF2A は細胞質に局在しているが、有糸分裂に関与するので核内に局在があるべきではないか。

(回答) KIF2A は微小管、紡錘体微小管に局在する。微小管は細胞分裂、細胞の形態維持、細胞内物質輸送などに関与しており、細胞質内にも多く存在している。有糸分裂の際にも核膜が融解した状況となり、核外で微小管は作用するので、KIF2A は核外の細胞質内で機能しているものとする。

質問7) 肺扁平上皮癌における KIF2A の機能はなにか。

(回答) 正常細胞と同様に微小管の脱重合に関与し、細胞周期の制御を行っていると考えられる。

質問8) KIF2A による遊走能、浸潤能への影響はどのような機序で起こっているのか。

(回答) 微小管は細胞の形態維持、細胞内物質輸送にも関与する。KIF2A の過剰発現は微小管への影響により遊走能を亢進するという報告がある (Cell Rep 2015; 10: 664)。また、肺扁平上皮癌細胞株を用いた追加実験で、KIF2A を knock down することにより Vimentin や N-Cadherin が抑制されており、KIF2A は上皮間葉移行を促進することで遊走能、浸潤能を亢進していると考えられる。

質問9) 肺扁平上皮癌細胞株は2種類のみでの解析で良いか。

(回答) 肺扁平上皮癌は肺腺癌と異なり、EGFR、ALKなどの単一遺伝子変異による影響は受けにくい。そのため、肺扁平上皮癌の代表的な細胞株である、EBC-1、SK-MES-1の2種類のみでの解析を行った。

質問10) 肺腺癌での報告はあるのか。肺腺癌の細胞株での検討は行わなくても良いか。

(回答) miR-451a と肺腺癌との関連 (Oncogene 2011; 30: 2644、PLoS ONE 2017; 12: e0181270)、KIF2A と肺腺癌との関連 (Biochem Biophys Res Commun 2018; 497: 65) は既に報告されており、肺扁平上皮癌と同様に miR-451a は癌抑制型 microRNA として、KIF2A は癌促進遺伝子として機能する。今回は肺扁平上皮癌における機能性 RNA ネットワークの探索を行ったため、肺腺癌細胞株での検討は行わなかった。

質問11) miR-144-5p、-3p、miR-451a はゲノム上でどの程度離れているか。それぞれの機能は同一なのか。

(回答) miR-144-5p、-3p、miR-451a は17番染色体長腕の100 bp 内に近接して存在する。ともに癌抑制型 microRNA として機能するが、それぞれ標的遺伝子は異なるため、同一の機能とは言えない。

質問12) TCGA database に小細胞肺癌のデータベースはないのか。結果を日本人に当てはめて良いか。

(回答) TCGA database の多くは手術症例を対象としており、手術適応例の少ない小細胞肺癌のデータベースは存在しない。また、遺伝子発現は人種間で差異があることもあり、今回の解析をそのまま日本人に当てはめることはできない。今後、遺伝子データ、臨床予後データを蓄積して、解析することが必要である。

質問13) ノードマウスに腫瘍を移植した解析をしてみてもどうか。

(回答) 癌研究において in vivo で解析することは重要であり、今後の研究課題としたい。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 4) *miR-451a* の発現低下の要因はなにか。複数の機序の関与があるのか。

(回答) microRNA の発現が抑制される機序には、DNA のメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化などのエピジェネティックな変化、染色体異常、microRNA 合成分子の異常などが報告されている。肺腺癌細胞に DNA メチル化阻害薬、およびヒストン脱アセチル化阻害薬を投与すると *miR-451a* 発現が増加することが報告されており、*miR-451a* の発現低下には DNA メチル化、ヒストンアセチル化が関与していると考えられる。複数の要因が microRNA の発現調節には関与しているが、多段階発癌のような複数の機序が連続して関与するという報告は検索しえなかった。

質問 1 5) *miR-144-5p*、*-3p* は *KIF2A* を制御するのか。

(回答) *miR-144-5p*、*-3p* を核酸導入した肺扁平上皮癌細胞株で qRT-PCR 法、Western blotting を行ったが、*KIF2A* の発現は mRNA、蛋白レベルのいずれでも抑制されなかった。

質問 1 6) TCGA database に化学療法の項目は含まれているか。化学療法を実施している割合はどれくらいか。化学療法はプラチナ製剤か。

(回答) 術後化学療法のデータが含まれているが、実施の有無について約 3 割しか記載がない。記載されているものでは約 1 割程度で術後化学療法が実施されている。化学療法の内容についての記載はない。

質問 1 7) 現状として、肺扁平上皮癌の術後治療はどのように行っているか。

(回答) 病理病期 IA 期は経過観察のみ、IB 期は症例によって経口抗癌剤での再発予防を行う。II 期、III 期については、全身状態が許せば、プラチナ製剤と第 III 世代の抗癌剤との併用での術後化学療法を行う。

質問 1 8) *KIF2A* を knock down すると cell cycle はどこで停止するか。それはなぜか。

(回答) 肺扁平上皮癌細胞株での追加実験で、G0/G1 期での細胞周期停止がみられた。*KIF2A* は微小管に関与することから M 期への影響が考えられるが、*KIF2A* を knock down した細胞で *cyclin E1*、*E2* といった G1 期に関与する重要な遺伝子の発現が抑制されており、G0/G1 期での細胞周期停止がみられたと考える。

質問 1 9) 肺扁平上皮癌細胞株での *p53* の status はどうか。

(回答) EBC-1 では E171\*、SK-MES-1 では E298\* の *p53* のナンセンス変異が報告されている。

質問 2 0) OncoLnc での発現の中央値で 2 群に症例を群分けしているが適切といえるか。

(回答) *miR-451a* も *KIF2A* の発現も正常値が不明なため、中央値で 2 群に分けることは、予後解析において過大もしくは過少評価をする可能性がある。症例分布を標準偏差を利用した z-score で標準化して群分けする方法があるが今回は解析していない。

質問 2 1) OncoLnc を用いた解析で、肺腺癌では *KIF2A* 発現での予後に有意差がついておらず、*KIF2A* の関与は組織横断的ではなく、肺扁平上皮癌に特異的な要素があるのではないか。

(回答) *KIF2A* および *KIF2A* が関与する微小管について、肺扁平上皮癌に特異的となる要素を解析しえてない。両者の細胞株を用いた *KIF2A* の過剰発現による機能解析結果の比較等を含め、今後の研究課題としたい。

質問 2 2) apoptosis assay の figure は全細胞数に対する apoptosis 細胞の割合をそのまま示すほうが良いのではないか。

(回答) 既報を参考に、今回は「mock」での apoptosis 細胞の割合を 100% とし、「mock」との比較として図示した。

質問 2 3) Figure 3 の EBC-1 において、cisplatin 添加細胞と比較して *miR-451a* 核酸導入細胞の PARP の band が薄くなっているのはなぜか。各 well 間での蛋白量に差異はないか。

(回答) cisplatin 添加細胞と比較して *miR-451a* 核酸導入細胞の PARP の band が薄くなった要因はわからない。PARP の解析に使用したものと同一の PVDF 膜を GAPDH の解析に使用しており、GAPDH の band には明らかな差異はないため、各 well 間での蛋白量には明らかな差はないと考える。

質問 2 4) Gene Expression Omnibus の accession number はどのように選択しているか。

(回答) 肺扁平上皮癌症例が多く含まれている GSE19188 を当科の解析においては継続的に使用している。

質問 2 5) microarray 解析は、肺扁平上皮癌細胞株ではなく、核酸導入していない正常肺細胞株と *miR-451a* を核酸導入した正常肺細胞株との比較でなくて良いか。

(回答) 臨床検体の非癌部正常肺では肺扁平上皮癌部と比較して *miR-451a* の発現は高く、今回解析はしていないが、正常肺細胞株でも *miR-451a* の発現は高いことが予想される。今回は、正常肺細胞株で *miR-451a* を過剰発現させたことによる遺伝子発現の変化ではなく、*miR-451a* の発現が低下している肺扁平上皮癌細胞株へ *miR-451a* を核酸導入した前後で変化した遺伝子発現を解析するために、肺扁平上皮癌細胞株を使用した。

質問 2 6) これまでに解析した肺扁平上皮癌における標的癌促進遺伝子で、どの遺伝子を治療標的にするか。それぞれ解析するのか、優先順位をどのようにするのかの意見を述べよ。

(回答) 標的遺伝子によりコードされる蛋白の阻害物質を作成の上、動物実験で効果や有害事象を解析し、治療標的となりうるかを検討する。データベースを用いた遺伝子発現解析の結果と実際の生体内での動向は必ずしも一致しないので、優先順位をつけるのは困難で、それぞれの遺伝子での継続した解析が必要と考える。

質問 2 7) clustered microRNAs の概念はいつから提唱されているのか。clustered microRNAs は同一の機能を持つのか。

(回答) 検索しえた限りでは、Altuvia らが 2005 年に clustered microRNAs の概念を提唱している (Nucleic Acids Res 2005; 33: 2697)。clustered microRNAs は 10 kb 内に近接して存在する microRNA 群と定義され、共通した機能を有することが必要な条件ではない。microRNA の遺伝子制御の多様性から、同一内の clustered microRNAs が、それぞれ異なった機能の標的遺伝子を制御する可能性はあると考える。

質問 2 8) apoptosis が誘導される実験系での細胞で、遊走能、浸潤能を評価するための条件はなにか。

(回答) apoptosis が誘導された細胞の割合がどの程度であれば遊走能、浸潤能を評価して良いかという明確な条件は検索しえなかった。apoptosis 細胞が遊走能、浸潤能の評価へ影響しうるため、核酸導入後から評価までに長時間を要する際には途中で細胞数の補正が必要となる。Matrigel invasion assay での浸潤能の解析では評価の 24 時間前に細胞数を調整するため、影響は限定的で評価可能と考える。apoptosis が高度に誘導される細胞で遊走能を評価する際には、同様に評価の 24 時間前に細胞数を調整する Chemotaxis assay や Haptotaxis assay 等のメンブレンを用いた解析が、より apoptosis 細胞の影響を緩和できると考える。

質問 2 9) 論文上で使用されている「ectopic expression」とはどういう意味か。

(回答) 癌細胞株にて発現が低下している microRNA を核酸導入することによって、発現が低下していた microRNA の発現を正常に近い発現に回復させるという意味で、「ectopic expression」という用語を使用している。

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。