

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 559 号	学位申請者	末次 隆行
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学 歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査 佐藤 雅美
	副査	武田 泰生	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、令和2年1月20日、学位申請者 末次 隆行 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) Table 2において、MMP14の染色性とgradeや病期分類で何らかの関係性は見られたか。

(回答) 本研究においては、相関は見られなかった。非小細胞肺癌の免疫染色で、MMP14の発現と病期分類で相関が見られたと報告されている。

質問2) Figure 4Cにおいて、siMMP14導入細胞で増殖能が抑制されているが、その機序は何か。

(回答) MMP14とCD44の相互作用によりEGFRのリン酸化が惹起され、更に、MAPKやPI3Kの下流シグナルが活性化される。これらのシグナルの活性化は、癌細胞の増殖にも影響を及ぼしていると考えられる。

質問3) 切除標本の弱拡大で腫瘍の部位によるMMP14の染色強度に差は見られなかったか。

(回答) 本研究において、癌の部位におけるMMP14の染色強度の解析は行っていない。当科に保存されている臨床検体を用いた解析も可能と考えられる。

質問4) 肺扁平上皮癌でマイクロRNA以外でMMP14を制御する機序はないか。

(回答) MMP14の発現には、様々な転写因子(KLF6、HNF4α、PROX1)や、サイトカインであるinterleukin-6などが関与していると報告されている。肺扁平上皮癌におけるこれらの関与は今後検討すべき課題である。マイクロRNAがlncRNAにより吸着されると機能を失うことが明らかになってきた。最近、lncRNAであるFAM83A-AS1やMFI2-AS1が癌細胞で過剰に発現することでMMP14の発現を制御する報告がなされた。

質問5) EBC-1において、miR-150-5pが制御する9個の癌促進遺伝子候補を抽出しているが、SK-MES-1などの他の細胞株を用いた場合も同様の結果となるか。

(回答) 我々のマイクロRNAの標的分子の探索方法の一つとして、目的とするマイクロRNAを癌細胞に導入し、癌細胞内で発現が抑制される遺伝子を網羅的に調べている。その際に、マイクロRNAを導入する細胞を増やすことにより、精度の高い解析が可能と考えられる。しかしながら、今回の解析ではEBC-1細胞のみを使用して解析を行った。解析する細胞を変えることで、選択される標的分子が異なる可能性があると考えられる。

質問6) 各種癌において、miR-150-5pの発現が亢進や抑制される機序は何か。

(回答) これまでの報告では、同一のマイクロRNAが、癌種によって癌抑制型マイクロRNA、癌促進型マイクロRNAとして機能することが報告されている。マイクロRNAの発現の抑制機序としては、DNAメチル化などのエピジェネティックな影響や、染色体の構造変化が報告されている。マイクロRNAの発現亢進は、転写因子の関与や染色体の増幅が関与していることが報告されている。

質問7) 同一個体でも、同一のマイクロRNAが癌抑制型、促進型マイクロRNAと変化が見られることがあるのか。

(回答) 同一のマイクロRNAが、同じ患者や細胞において、癌抑制型から癌促進型へ変化をするという報告は我々が調べた範囲では認めていない。しかしながら、癌細胞の悪性化に伴い、エピジェネティックな変化や転写因子などの発現が変化することにより、マイクロRNAの発現や機能が変化することは十分に予測される。

質問8) 肺癌の進展において、どの段階でMMP14は関係するのか。

(回答) MMP14は基底膜を破壊する機能を有するため、早期から進行期の全ての時期に関係するものと考えられる。

質問9) 今回、肺扁平上皮癌で2種類の細胞株しか使用してしないが、その他の細胞株は使用しなくて良いのか。

(回答) その他の肺扁平上皮癌の細胞株としてLC-1F、RERF-LC-AIなどが存在する。多くの細胞株で実験すると精度が高まると予想されるが、様々な制約があるため、2種類の細胞株で実験を行った。

質問10) 免疫チェックポイント阻害薬による治療とマイクロRNAとの関係については研究を行っているのか。

(回答) 現在、免疫チェックポイント阻害薬による治療とマイクロRNAとの関係についての研究は行っていない。肺癌において、血清のmiR-320bとmiR-375はニボルマブの効果を予測するバイオマーカーとして報告されている。

質問11) 各種癌において、miR-150-5pを制御する上流の機序は分かっているのか。

(回答) 本研究では、miR-150-5pの発現制御の分子メカニズムについて、解析は行っていない。肺扁平上皮癌におい

最終試験の結果の要旨

て、脱メチル化剤の添加によって、miR-150-5p の発現が若干回復したことから、miR-150-5p のプロモーター領域の DNA のメチル化が関与していることが示唆されている。

質問 1 2) 前立腺癌や食道癌において、SPOCK1 が miR-150-5p の標的遺伝子になっているが、肺扁平上皮癌では候補にならない理由は何か。

(回答) miR-150-5p 導入細胞の網羅的解析で SPOCK1 の発現抑制を認めたが、公共のデータベース解析では肺癌臨床検体で SPOCK1 の発現亢進を認めなかったため、miR-150-5p の標的遺伝子候補から除外した。

質問 1 3) siMMP14 導入細胞で発現が抑制された 92 遺伝子において、MMP14 以外が関与した可能性はないのか。

(回答) 今回の siMMP14 を用いた解析では、MMP14 が直接制御する遺伝子、間接的に制御する遺伝子が含まれると考えられる。さらに、siRNA 添加に伴う off-target 効果により発現が変化した遺伝子も存在すると考えられる。

質問 1 4) 肺扁平上皮癌に男性が多い要因は何か。

(回答) 男性の肺癌は 7 割、女性の 3 割が喫煙に関連するとされているため、肺扁平上皮癌に男性が多い理由の一つと考えられる。

質問 1 5) Figure 3 で、miR-150-5p を導入した SK-MES-1 で MMP14 の mRNA と蛋白発現の乖離の理由は何か。

(回答) 蛋白の発現に関しては、翻訳後に修飾されることもあり、mRNA と蛋白発現の乖離は見られることがある。その後の SK-MES-1 を用いた機能解析で EBC-1 と同様の結果が得られており、問題ないと考えられる。

質問 1 6) マイクロ RNA は non-coding RNA を制御するのか。

(回答) マイクロ RNA は、蛋白コード遺伝子だけでなく non-coding RNA にも結合し、その発現を負に制御する。

質問 1 7) MMP14 が増殖能に影響する機序は何か。

(回答) MMP14 の過剰発現により、MMP2 や CD44 の活性化を促進することが報告されている。これらの活性化は EGF 受容体やインテグリンを介して様々な癌シグナルを活性化する。活性化シグナルの一部が細胞増殖に関与していると考えられる。また、今回の解析では、MMP14 ノックダウン細胞を用いた網羅的な遺伝子解析を施行した。これら MMP14 が影響する遺伝子の解析により、MMP14 が関与する細胞増殖の分子機序が明らかになると考えられる。

質問 1 8) MMP14 により CD44 を切断した後の CD44 の下流のシグナルはどうなっているのか。

(回答) CD44 は複数のバリエーションが存在し、バリエーションに依存して様々な生物活性を有することが知られている。MMP14 により切断された CD44 のバリエーションが、肺扁平上皮癌においてどのような機能を有しているか、検討することは重要と考えられる。

質問 1 9) MMP14 欠損マウスの表現型は何か。

(回答) 骨粗鬆症、全身性の関節炎や成長障害を来す。

質問 2 0) MMP14 の免疫染色で染まっていたのは細胞膜だけか。

(回答) 腫瘍の細胞膜だけでなく、腫瘍の細胞質及び、間質の一部も染色された。

質問 2 1) 免疫染色の強度はどのように判定したか。

(回答) 異なる 2 名で判定した。副腎を陽性コントロールとして、副腎と同程度であれば (+++) と判定した。主観的な要素を少なくするため、HER2 検査ガイドなどを参考に判定する方法もある。

質問 2 2) 9 個の癌促進遺伝子候補の中で MMP14 を選出した理由は何か。

(回答) GSE 19188 のデータベースから発現が最も高い MMP14 を標的候補遺伝子とした。

質問 2 3) MMP14 や MMP2 の inhibitor を用いた実験を行ったか。

(回答) 今回の解析では、MMP14、MMP2 に対する阻害剤を用いた解析は行っていない。siRNA を用いた解析では、ノックダウンする標的遺伝子以外の off-target 効果があることはよく知られている。今後の課題として、ゲノム編集技術を用いて、MMP14 の機能を消失させた細胞を作製し、機能解析することが重要と考えられる。

質問 2 4) 臨床試験において MMP 阻害剤による副作用は何か。

(回答) 肺癌の臨床試験では、関節痛、腰痛、筋肉痛などの有害事象が対照群 16% に対し、40% に見られたと報告されている。

質問 2 5) TCGA database を用いた肺癌症例の解析で、MMP14 発現別で予後の差は見られたか。

(回答) TCGA database で解析を行ったが、肺腺癌および肺扁平上皮癌での差は見られなかった。

質問 2 6) MMP14 のノックダウンにより遊走能 (運動能) が抑制された機序は何か。

(回答) 頭頸部癌において、MMP14 の発現亢進が EMT を介して遊走能 (運動能)、浸潤能を促進すると報告されている。本研究では十分に検討していないが、同様の機序が想定される。

質問 2 7) MMP14 以外の 8 個の候補遺伝子は肺扁平上皮癌の予後に関係するのか。

(回答) TCGA database を用いて予後解析を行ったが、いずれの遺伝子も予後に関係しなかった。

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。