

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 574 号	学位申請者	戸田 洋子
審査委員	主査	谷本 昭英	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 中川 昌之
	副査	古川 龍彦	副査 上野 真一
<p>主査および副査の5名は、令和元年12月26日、学位申請者 戸田 洋子 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) TNBC の特徴を明らかにするためには、正常組織でなく他のサブタイプと比較するべきではないか。 回答: TNBC の特性を明らかにし、治療標的となる分子検索を行うにあたって、最初の段階として癌部と非癌部の比較を行った。その結果、治療標的候補の一つ <i>AP1S3</i> を見出した。次の段階として、TNBC と他のサブタイプの比較を行うため、各サブタイプ別プロファイルを作成した。</p> <p>質問 2) <i>miR-204-5p</i> と <i>AP1S3</i> は TNBC 以外の乳癌においてどのように働いているか。 回答: <i>miR-204-5p</i> は HER2(+) のプロファイルでも最も発現が低下しているため、同じく抑制型として重要な働きを持つ可能性は高い。<i>AP1S3</i> に関しては乳癌全体のデータである TCGA のデータベースの予後解析で有意差が認められることから、全乳癌でも予後に関与する遺伝子であると考えられる。今後、各サブタイプにおける機能を確認するためには各 cell line を用いた実験が必要である。</p> <p>質問 3) <i>AP1S3</i> が AP-1 complex および癌促進で果たす役割は何か。 回答: <i>AP1S3</i> は AP-1 の構造を安定化する働きがある。安定した AP-1 が増加することで、小胞輸送が活発となり、その結果、細胞内の代謝を促進し癌細胞の増殖に寄与する、または、炎症性メディエーター等を過剰に輸送することで発癌の素地を作る、といった機序で癌促進に貢献する可能性がある。</p> <p>質問 4) <i>AP1S3</i> とオートファゴソームの関与について言及しているが乳癌においての意義は何か。 回答: <i>AP1S3</i> はオートファゴソームの形成に関与する遺伝子である。癌細胞は高い代謝欲求を持つため、タンパク質の供給をオートファジーに大きく依存していると考えられている。TNBC でもオートファジー阻害により放射線感受性が高まる、細胞増殖が抑制されるなど報告されている。</p> <p>質問 5) <i>miR-204-5p</i> の下流遺伝子候補 32 遺伝子には、全体として何か傾向は認められたか。 回答: 明らかな傾向は認められなかった。</p> <p>質問 6) 臨床検体 35 例 (TNBC) の内、術前に化学療法やホルモン療法を行った症例はあったか。 回答: 全例術前治療は行っていない。TNBC は術前化学療法が予後改善につながると報告されている。当科でも腫瘍径、リンパ節転移、乳房温存希望等の条件を満たす症例で行っているが、施行数は少なく今研究では含まれていない。</p> <p>質問 7) 通常 TNBC は術後補助化学療法を行うか。 回答: 「腫瘍径が 1 cm 以下、センチネルリンパ節転移無し」の症例以外は術後補助化学療法を行う。一般的なレジメンとしては CMF 療法 (シクロfosファミド、メトキシート、フルロウシル) を行う。</p> <p>質問 8) TNBC はサブタイプの中で、予後が一番悪いのか。 回答: 他のサブタイプと比較し、DSF、OS いずれも短い。</p> <p>質問 9) TCGA のデータベースを使用しているが、TCGA はアメリカのデータベースで白人や黒人が多く、アジア人は少ないと思われる。TNBC で人種間差がある遺伝変異は知られているか。 回答: 黒人に TNBC が多いという傾向はあるが、人種間の遺伝子変異については明らかでない。</p> <p>質問 10) <i>AP1S3</i> は正常組織においても発現しているか。<i>AP1S3</i> の正常組織での機能は何か。 回答: <i>AP1S3</i> は正常組織でも発現している。<i>AP1S3</i> は AP-1 complex を構成する 4 つのサブユニットの一つであり、AP-1 の構造を安定させる働きがある。AP-1 としては細胞内の小胞輸送に関与しており、小胞形成及び輸送タンパクの選別に働いている。</p> <p>質問 11) <i>AP1S3</i> の機能と TNBC はどのように関連しているか。薬剤感受性に関与しているのか。 回答: <i>AP1S3</i> は癌に関連する報告は 1 件もない。今回の研究で初めて TNBC の悪性度の高さに関与している遺伝子であることが判明した。詳細な機序の解明は今後の課題である。TNBC の治療抵抗性に関与している可能性は考えられ、機序が明らかになれば治療標的として有望な対象となりうる。</p> <p>質問 12) Figure 4 のコントロールとして GUSB、GAPDH の両記載があるが、同じものか。 回答: 別物である。GAPDH は Western Blotting で、mRNA の PCR では GUSB を使用した。</p>			

最終試験の結果の要旨

質問 13) 今回の研究で得られた知見は今後の研究や臨床応用にどう活かす予定か。

回答: TNBC は外科治療だけでは治癒が困難な疾患である。AP1S3 は、小分子化合物を用いて機能を阻害する治療薬開発や、他の候補遺伝子と組み合わせ有効な予後マーカー開発につながる可能性がある。

質問 14) アレイ解析と比較し、次世代シーケンサーを用いる利点と欠点は何か。

回答: アレイ解析は設定されたプローブの範囲でしか抽出できないが、次世代シーケンサーは網羅的に抽出されるため、アレイ解析では想定されないような passenger 鎖が抽出される点などは優れている。欠点は膨大なデータが抽出されるため、解析手技やデータマイニングが複雑になることである。

質問 15) 手術検体より RNA を抽出する際に間質成分の混在や影響はどう考えるか。

回答: 検体採取の際は極力混在を避けるように努めたが、間質や正常細胞の混在は厳密には除去しきれない。抽出した RNA には腫瘍以外の組織由来の RNA が混在する可能性を踏まえて解析し、得られた傾向に cell line で行う機能解析を加えることで癌の病態を証明する必要があると考える。

質問 16) TCGA を用いた解析で、TNBC が少ないのであれば luminal 抽出の解析が有効ではないか。

回答: 今回 luminal に限定した解析は行わなかったが、今後はサブタイプ別の解析が必要と考える。

質問 17) 乳癌は比較的予後良好であるが、長期経過後の癌死と他病死の区別はできているか。

回答: 当科での手術症例は正確に予後確認可能だが、TCGA のデータベースでは死因は明らかでないため、最近の我々の研究では期間を 10 年に限定して解析するように方法を変更している。

質問 18) RACGAP1 は細胞接着に関与する遺伝子である。発現が低下すれば運動能亢進・悪性度が高まり予後が悪くなると想定できるが、現実には逆である。この仕組みについてどのように考えるか。

回答: 本研究では RACGAP1 に関しては未検討のため、今後の課題としたい。

質問 19) TNBC とその他のサブタイプを比較した予後曲線と AP1S3 で提示された予後曲線では乖離があるが、人種差によるものか。

回答: AP1S3 の予後曲線は、全乳癌を対象に発現の高低で比較したものであるため、TNBC のみを抽出しての比較が今後必要と考える。

質問 20) 乳癌の重要な遺伝子変異の一つである BRCA は TNBC に多いのか。

回答: BRCA と TNBC は強い関連があり、TNBC の約 20% に BRCA 変異があるとされている。特に BRCA1 変異は主に TNBC に認められる。一方、BRCA2 変異は主に luminal 乳癌に認められる。

質問 21) マイクロ RNA を入口として AP1S3 は見出されたが、all Exon 解析でも発現上昇しているか。

回答: Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences(Nature)では、乳癌の driver 遺伝子候補として 93 の遺伝子変異が抽出されたが、その中には含まれていなかった。

質問 22) 癌化につながる過剰なタンパク発現にマイクロ RNA はどの程度関与しているのか。

回答: マイクロ RNA は、多くの場合 100 を超える遺伝子を調節しており、調節も「100%抑制」ではなく「何分の 1 に抑制」といった微妙で複雑なものである。そのためマイクロ RNA 一つ一つの関与は弱いですが、発現の変化に寄与していることは間違いない。しかし正確な程度は不明である。

質問 23) 膀胱癌では miR-204-5p の標的遺伝子として RACGAP1 が同定されたが、乳癌でも標的か。

回答: 乳癌でも最終的な 4 候補遺伝子の一つであり、有望な遺伝子として研究を進める予定である。

質問 24) パラフィン切片における免疫染色の抗体特異性はどのように決定したのか。

回答: 購入時のデータシートに準じた希釈で染色し、非癌部と比較し癌部で濃染されたことを確認した。positive control、negative control の指定が無く、今回はこれらの検討は行っていない。

質問 25) Supplemental table 3 の expression high / low は、免疫染色で確定したものか。

回答: TCGA での AP1S3 発現データを利用しており、免疫染色で発現強度の評価は行っていない。

質問 26) 免疫染色で正常な乳管はどのように染色されるか。

回答: 核及び核の周囲が染色された。

質問 27) 局在はほぼ細胞質か。核には存在しないのか。

回答: 癌細胞においては細胞質が濃染されており、核にはほとんど染色を認めなかったことから細胞質に局在していると考えられる。乳癌細胞以外での染色傾向については十分検討できていない。

質問 28) 乳腺細胞以外、線維芽細胞やリンパ球、血管内皮等はどのように染色されるか。

回答: 線維芽細胞は全く染色されない。血管内皮は管腔側が染色される傾向を認め、リンパ球は細胞全体が染色された。皮膚のケラチノサイトで強発現しているという報告があり、標本でも確認された。

質問 29) 培養細胞での実験は TNBC の cell line を使用しているが、luminal タイプの cell line は使用しなかったのか。luminal タイプの cell line にはどんなものがあるのか。

回答: 代表的なものには MCF-7 がある。今回の実験は TNBC の cell line のみを使用した。

質問 29) MCF-7 は luminal A なのか。luminal B なのか。

回答: Ki67 については明らかでないため、luminal A か luminal B(HER-)のいずれかと考えられる。

質問 30) HER2 タイプや basal タイプの Cell line もあるのか。

回答: HER2 の代表的な cell line としては SKBR3 がある。Basal-like の cell line としては、HCC1599、HCC1937、MDA-MB-468 等が ATCC でリストアップされている。

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。