

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 <u>508</u> 号	学位申請者	和田 真澄	
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	井上 博雅	副査	橋口 照人
	副査	谷本 昭英	副査	古川 龍彦
<p>主査および副査の5名は、令和2年12月4日、学位申請者 和田 真澄 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) Passenger 鎖が動くメカニズムはわかっているのか。 回答：一般的には、miRNA 二本鎖のうち、1本のRNA鎖のみが、最終的に Ago に保持される。miRNA 二本鎖において、Ago に保持される側の RNA 鎖を guide 鎖、保持されず分解される RNA 鎖を passenger 鎖という。RNA 末端のうち 5' 末端が熱力学的に不安定な RNA 鎖に、Dicer が結合し、guide 鎖として選択され、Ago に保持されると考えられている。しかしながら、一部の miRNA では、双方の鎖が Ago に保持される事が報告されているが、その詳細な分子機序は十分に解明されていない。</p> <p>質問2) 食道癌に関連する様々なシグナル伝達経路があるが、miRNA と関連する食道癌の活性経路は何か。 回答：ヒトゲノムから転写される遺伝子のほぼ全ては、miRNA の制御を受ける事から、様々なシグナル伝達経路において、miRNA の関与があると考える。食道癌に置いて、活性化されているシグナル伝達経路の一つである PI3K/Akt/mTOR についても多くの miRNA の関与が示されている。例えば、AKT を制御する <i>miR-128/miR-181/miR-218</i> や、mTOR を制御する <i>miR-7/miR-99/miR-100/miR-101/miR-199</i> は、食道癌組織で発現抑制されている。</p> <p>質問3) p53 が miRNA の発現量を調節しているのか、<i>miR-143/145</i> の発現量の調節メカニズムは何か。 回答：<i>miR-143/miR-145</i> 遺伝子のプロモーター領域に、p53 結合配列が存在しており、<i>miR-143/miR-145</i> は、転写因子 p53 により正に発現制御される事が報告されている。また、最近で、<i>miR-143</i> または <i>miR-145</i> と相補的な配列を有する long noncoding RNA (LncRNA) の存在が明らかとなり、これら LncRNA が <i>miR-143/miR-145</i> を吸着する事が報告されている。食道癌においても、<i>LncRNA-EGFR-AS1/LncRNA-ROR/LncRNA-HAGLR</i> の高発現と、<i>miR-143/miR-145</i> の発現低下が報告されている。</p> <p>質問4) 今回 miRNA の研究をして miRNA を食道癌の治療にどう活かすか。 回答：癌抑制型 miRNA を起点とした解析から、食道癌の癌促進型遺伝子や癌促進型遺伝子が関わる分子経路が明らかになると考える。それら分子や分子経路を遮断する既存の薬剤が存在すれば、食道癌の治療に応用・展開できると考える。</p> <p>質問5) 血中で miRNA が測れるかどうか確認したか。 回答：血清および血清中に存在する exosome から、miRNA を測定する事は可能である事は、当科において検討済みである。しかしながら、診断を目的とした解析は行っていない。</p> <p>質問6) <i>miR-143-5p</i> と <i>HMG2</i> の機能解析で増殖能・遊走能・浸潤能の結果に解離があるが、<i>miR-143-5p</i> が制御する遺伝子で <i>HMG2</i> 以外に遊走能・浸潤能に関わる遺伝子はないのか。 回答：<i>miR-143-5p</i>-TF では、細胞増殖に影響を示さないのに対して、<i>siHMG2</i>-TF では細胞増殖に影響を及ぼす。この事については、明確な回答は出来ないが、食道癌細胞では、<i>miR-143-5p</i> による、細胞増殖を負に制御する遺伝子にも影響している可能性がある。本解析で明らかとなった <i>miR-143-5p</i> 標的分子を見ると、<i>HASS/CAVI/STMN1/MET</i> は、細胞の浸潤・遊走、転移に関与している事が報告されている。</p> <p>質問7) <i>HMG2</i> と <i>KRT80</i> と、再発率との関連は調べていないのか。 回答：今回検討しておらず、今までに再発率との報告はされていない。</p> <p>質問8) RNA sequence で用いた症例を見ると再発例が1例だけだが、術前化学療法のない症例を選んだから、再発がない、と言えるのではないか。 回答：今回報告した miRNA プロファイルにおいて、再発例 (1例) の影響は無いと考えている。今回のプロファイルは、食道癌と非癌部の食道上皮の比較である。術前化学療法を施行した症例についても、miRNA プロファイルの作成はしている。今後、これら症例で特異的な発現変動をする miRNA を明らかにし、その標的分子の探索を行いたい。</p> <p>質問9) <i>5p,3p</i> のどちらが passenger 鎖かの判断はどうやって行うか。 回答：miRNA データベースでは、発現量 (シーケンスのリード数) が多い miRNA を guide 鎖とし、もう一方の鎖を passenger 鎖と定義している。以前は、passenger 鎖には*が記されていたが、現在では、*の記載がない miRNA も多い。</p> <p>質問10) Guide 鎖と Passenger 鎖の miRNA の発現量と実際に作用する miRNA の量は in vitro の実験系で相関するか。 回答：Guide 鎖と Passenger 鎖の発現量を加味して、細胞への核酸導入実験は行っていない。実験では、細胞内にかなり過剰な miRNA を核酸導入していると考ええる。</p> <p>質問11) <i>HMG2</i> について非ヒストンの核蛋白質であるならば、正常細胞の核に染色されると考えるが如何か。 回答：<i>HMG2</i> は胚発生時に多能性胚性幹細胞で発現するが、成体組織細胞では、ほとんど発現しない。しかしながら、様々な悪性腫瘍において、高発現しており、癌細胞の悪性化に関与している事が報告されている。成人の正常細胞では発現が殆ど無いが、その局在は核と考える。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 12) ESCC に aberrant に発現する *HMG2* は細胞質において観察されたと解釈して良いか。

回答：本研究の解析では、*HMG2* の発現は、食道癌の核に局在していた。

質問 13) *HMG2* は核移行シグナルを持ち、核のみに存在している蛋白質か。

回答：*HMG2* アミノ酸配列中には、典型的な核移行シグナルは見つからない。食道癌の免疫染色のデータは核に局在している。他の癌種においても、免疫染色データは核に局在している。

質問 14) もし、ESCC の *HMG2* が細胞質の染色されたのであれば、どのような機序で核から細胞質に輸送されたと考えるか。

回答：今回の解析では、細胞質での染色を認めなかった。

質問 15) *HMG2* は細胞外に分泌された場合に、何らかの生理活性を持つのか。

回答：シグナルペプチドの配列が無い事から、分泌蛋白である可能性は低いと考える。

質問 16) *HMG2* は ESCC の患者血清にて測定できるか。

回答：*HMG2* は分泌蛋白ではないため、血中で測定する事は難しいと考える。しかしながら、癌細胞で高発現している事から、癌患者の血液中を回遊している癌細胞を用いた解析は可能性があると考える。

質問 17) *HMG2* の KO マウスは胎性致死と考えると良いか。

回答：*HMG2* ノックアウトマウスの解析では、マウスはこれら遺伝子を欠失させても胎性致死にはならない。表現型として、野生型と比較して体のサイズが極めて小型になる事が報告されている。また、*HMG1/HMG2* ダブルノックアウトマウスでは、更に、個体が小型になる事が報告されている。これらマウスでは、転写因子の *E2F1* の活性が低い事が示されており、*E2F1* により転写誘導される遺伝子群の発現異常が原因として考えられている。

質問 18) *HMG2* が核蛋白であり、DNA の複製、細胞分裂等に係る重要な分子であれば、*HMG2* を knockdown した際に、proliferation/migration/invasion の活性が落ちるのは当然の結果ではないか。

回答：様々な癌細胞において、*HMG2* の発現異常は報告されており、*HMG2* ノックダウンにより、癌の悪性が制御される事は報告がある。今回の解析結果は、これまでの報告と矛盾しない。今後、食道癌において、*HMG2* の過剰発現により影響を受ける遺伝子の探索が重要と考える。

質問 19) *KRT80* に関して、*KRT80* の主な生理作用と発現する細胞の種類がわかっているか。

回答：*KRT80* に関しては、機能未知の遺伝子であり、癌における解析も殆ど行われていない。食道癌を含め、癌における機能解析は今後の課題である。

質問 20) mRNA の回収は何から行なっているか。

回答：今回の解析で用いた mRNA は、新鮮凍結組織から抽出した。

質問 21) *HMG2/KRT80* の免疫染色について、抗体の特異性、局在、これが正しいかどうかはどのように validation したか。Negative control と Positive control をどのように判断したか。

回答：*HMG2* については、乳癌組織の核の染色を Positive control とし、条件検討を行った。Negative control については検討を行わなかった。*KRT80* の Positive control として、皮膚癌が妥当と考えられるが、今回は、条件設定を行わなかった。

質問 22) *p53* の mutation があると *miR-143/145* の発現が抑えられて、*HMG2* の発現が上昇する、とあるが、*HMG2* を染めた切片で *p53* を染めたらどうなるか。*p53* の染色はしたか。*p53* を染めた場合、どのような結果を期待するか。その場合の *p53* と *HMG2* の関連はどうなるか。

回答：今回の解析では、*p53* の免疫染色は行っていない。*p53* の免疫染色では、正常細胞では正常の *p53* 蛋白は非常に半減期が短く、免疫染色で陽性となるような量は存在しない。しかし、*p53* の mutation による異常 *p53* は核内に蓄積され強陽性になる。この事から、*p53* に変異がある患者組織では、*p53/HMG2* 共に強陽性になると考えられる。また、*p53* に変異が無い患者組織では、*p53* は染色されず、*HMG2* のみが染色されると考えられる。

質問 23) 食道癌のリスク因子として最も高いものは何と考えられているか。

回答：食道癌のリスク因子として、喫煙と飲酒がある。男性食道癌患者の 6 割は喫煙が原因と考えられ、喫煙と飲酒、両方の習慣がある人は、よりリスクが高まることが指摘されている。遺伝子としては、飲酒により体内に生じるアセトアルデヒドの分解に関わる *ALDH2* が欠損していると、食道癌の発生リスクが高まる事が報告されている。

質問 24) 食道癌の *p53* の変異率はどれくらいか。

回答：*p53* の変異の調べ方により報告にばらつきがあるが、食道癌患者の 30~80% で *p53* の変異があるとされている。

質問 25) siRNA で *HMG2* をノックダウンしたとき、細胞の中で Western Blot を見ているが、どういう fraction で見ているか。どの様にタンパク質を抽出しているか。

回答：今回の解析では、核の分画を選別していない。蛋白は癌細胞の全てから抽出して解析を行った。*HMG2* が核内蛋白である事から、核を分画して解析を行えば、より鮮明な Western blot 画像が得られた可能性がある。

質問 26) *HMG2* の function について DNA の複製、細胞分裂に関わるとすると増殖抑制がみられるのはわかるが、migration/invasion にもなぜ差がついているのか、考察があるか。

回答：*HMG2* は、核内で様々な転写因子と競合し、細胞周期、細胞修復、アポトーシス関連遺伝子の発現に影響を及ぼす。また、*HMG2* は、*Snail/Slug/Twist* などの上皮-間葉細胞分化転換に重要な転写因子と共に、細胞の遊走・浸潤にも影響を与える事が報告されている。

質問 27) TCGA データベースの解析では *HMG2* と *KRT80* のどちらも食道扁平上皮癌の予後に差がつかなかったということか。症例数が多ければ予後に差がついた可能性があるか。

回答：The Cancer Genome Atlas (TCGA) では、食道扁平上皮癌の症例は決して多くない。食道癌の多くは、腺癌の患者である。解析する症例数が増えれば、予後に差がでる可能性はあると考える。

質問 28) *miR-143-3p* のターゲット遺伝子の 6 個の遺伝子に関連はあるのか、相互作用があるか。

回答：これら遺伝子の中で、*MET/STMN1* は、*MAPK signaling pathway* に含まれる遺伝子である。Gene Ontology, Molecular Function の分類では、*HMG2/TCF3/MET/STMN1/NETO2* は、Protein binding に分類される。これら遺伝子の転写調節や相互作用については、今後の検討事項としたい。

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。