

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 660 号	学位申請者	美園 俊祐
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 佐藤 雅美
	副査	武田 泰生	副査 大塚 隆生

主査および副査の 5 名は、令和 3 年 1 月 26 日、学位申請者 美園 俊祐 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) GEO データベースで GSE19188 を選択した理由を述べよ。

(回答) GEO データベースには肺腺癌症例を対象とした多数の遺伝子データベースがある。当科では、マイクロ RNA による肺腺癌の制御を継続して解析しており、これまでの報告と一貫して対比できるように、GSE19188 を選択した。

質問 2) 細胞株の microarray 解析に用いた細胞株を答えよ。

(回答) 肺腺癌細胞株の A549 を使用した。

質問 3) EGFR 遺伝子変異の有無によって、細胞株毎に TNS4 の発現や増殖能に差異があるか答えよ。

(回答) 本研究では EGFR 遺伝子変異の有無による解析を行っていない。TNS4 の発現亢進には MAPK 経路の関与が報告されており、EGFR 遺伝子変異に伴う MAPK 経路の活性化により、TNS4 の発現と増殖能の亢進が生じる可能性は考えられる。

質問 4) A549 に si-TNS4 を核酸導入した際、増殖能は低下したが、H1299 に TNS4 を過剰発現させた場合には増殖能に影響がなかった。その理由を述べよ。

(回答) 正常ヒト前立腺上皮細胞株において、si-TNS4 を核酸導入した結果、p21 の誘導による CDK1 の阻害によって、増殖能を抑制することが報告されている。肺腺癌細胞株での検証は行っていないが、前述した機序の関連が示唆される。ただし、肺腺癌における TNS4 に関連した報告は、多くが遊走能、浸潤能への影響についての報告であり、本研究結果も含めると増殖能への影響は少ないと考えられる。

質問 5) TNS4 の制御する下流遺伝子 88 個のうち、肺腺癌の予後と関連する遺伝子がいくつあるか答えよ。

(回答) 88 の遺伝子のうち、53 の遺伝子は TCGA database 解析で肺腺癌の予後に影響していた。

質問 6) TNS4 は EGFR に対して、ユビキチン化を直接的に抑制しているか、間接的に抑制しているか答えよ。

(回答) TNS4 は Cbl 分子と結合することで、EGFR のユビキチン化を間接的に抑制している。

質問 7) 論文内に、TNS4 は「critical regulators of genomic stability」であると記載しているが、その理由を述べよ。

(回答) TNS4 の制御する下流遺伝子の候補 (Table 4) の KEGG pathway 解析で、「Cell cycle」、「DNA replication」に関与する遺伝子が多数見られていたため、「critical regulators of genomic stability」と表現した。

質問 8) 肺腺癌臨床検体における、miR-150-5p/1-3p の発現解析で、過去の報告と症例数が異なる理由、および正常肺検体の性別差がある理由を述べよ。

(回答) 解析に用いた検体は 2010-2013 年に手術された臨床検体から本研究開始当初に抽出した RNA を使用している。先行研究で枯渇した検体や長期保存により RNA の品質が低下した検体があり、過去の報告と症例数が異なっている。正常検体と癌検体は同一症例で採取できておらず、肺腺癌では癌部と正常部の境界が不明瞭な検体も多く、腺癌症例では正常肺検体組織が採取できた症例が少ない。正常肺検体は、肺腺癌症例の正常肺 (4 検体) と肺扁平上皮癌症例の正常肺 (24 検体) を使用したが、肺扁平上皮癌症例がすべて男性であるため、性別差が生じた。

質問 9) 肺腺癌細胞株 A549、H1299 のドライバー遺伝子変異の有無、および本研究に選択した理由を述べよ。

(回答) 両細胞株とも EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子など現状の治療標的となる遺伝子変異はなく、A549 は KRAS 変異、H1299 は NRAS 変異が存在する。今回は現状の治療対象となるドライバー遺伝子変異を有さない症例に対する新たな治療標的分子の探索を目的としており、適切な細胞株と考える。

質問 10) 今回の研究結果は肺腺癌に特異的な結果かどうか、他の癌種と TNS4 の関連も含め説明せよ。

(回答) 本研究では、肺腺癌以外の肺癌組織型での解析を行っていない。TCGA database 解析では、肺扁平上皮癌の生命予後と TNS4 の発現には関連はなかったが、他の癌種 (大腸癌や乳癌、食道癌、胃癌など) で本研究と同様の結果が得られており、肺腺癌に特異的な結果ではなく、組織横断的に癌促進遺伝子として機能している可能性が示唆される。

質問 11) miR-150-5p/1-3p の発現解析で使用した肺腺癌症例のドライバー遺伝子変異の有無について答えよ。

(回答) 18 症例のうち 9 症例において、EGFR 遺伝子変異を認めている。

質問 12) EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では TNS4 は発現亢進するか答えよ。

(回答) 本研究では解析を行っていない。TNS4 は EGF の刺激により発現亢進することが報告されており、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では TNS4 は発現亢進する可能性は考えられるが、詳細な解析が必要である。

質問 13) EGFR の発現と miR-150-3p の発現には相関があるか答えよ。

最終試験の結果の要旨

(回答)本研究では解析は行っておらず、検索した範囲でそのような解析を行った報告はない。TCGA database を用いた解析では、*miR-150-3p* と *EGFR* の発現 (変異の有無は不明) に相関は認めなかった。

質問 1 4) 臨床検体における *miR-150-5p*、*miR-150-3p* の発現の差は、他の癌種においてもみられるのか。

(回答) 頭頸部扁平上皮癌、食道癌における解析では、パッセンジャー鎖である *miR-150-3p* の発現はガイド鎖である *miR-150-5p* の 200~2000 分の 1 であり、本研究と同程度の発現の差が認められている。

質問 1 5) *miR-150-5p/1-3p* の制御する標的遺伝子は、共通するか、別個のものか、説明せよ。

(回答) *miR-150-5p/1-3p* は、標的遺伝子の mRNA に結合するシード配列が異なるため、標的遺伝子は基本的には異なる。ただ、結合する部位は異なるものの、共通して制御する可能性のある遺伝子も存在する。

質問 1 6) 細胞内にマイクロ RNA を核酸導入した際、細胞質における Ago2 との結合率について説明せよ。また、もともと細胞質内に存在するマイクロ RNA と核酸導入したマイクロ RNA は、Ago2 への結合を競合するのかが説明せよ。

(回答) 本研究では結合率を解析しておらず、我々が検索した範囲では Ago2 との結合率や他のマイクロ RNA と Ago2 への結合を競合するかどうかを検証した報告はみつけれなかった。Ago2 とマイクロ RNA の結合と解離は可逆的であり、核酸導入したマイクロ RNA も細胞内で RISC に取り込まれるものと考えられる。

質問 1 7) 生体内において、マイクロ RNA の発現は、Ago2 と結合した状態や結合していない状態、いずれにおいても PCR 解析で評価できるのか。

(回答) Ago2 タンパク質と結合したマイクロ RNA は通常の RNA 精製の段階で除去されるため、本研究で行ったように Ago2 を免疫沈降法で抽出した後、Ago2 タンパク質とマイクロ RNA の結合を除去し、抽出して評価を行う必要がある。ただし、Ago2 とマイクロ RNA の結合と解離は可逆的であり、正確な評価は困難と思われる。

質問 1 8) マイクロ RNA のガイド鎖、パッセンジャー鎖は同一染色体上にあるのかが答えよ。

(回答) *miR-150-5p/1-3p* は同一染色体上の、19 番染色体長腕 (19q.13.33) に存在している。

質問 1 9) 本研究の機能解析において、*miR-150-5p/1-3p* を同時に細胞株に核酸導入した場合の結果について説明せよ。

(回答) 本研究では解析を行っておらず、検索した範囲でそのような実験を行っている論文はみつけれなかった。おそらく、*miR-150-5p/1-3p* それぞれが標的遺伝子を制御することで、相加的な癌抑制機能を認めることが予想される。

質問 2 0) 肺腺癌における *miR-150-5p* の標的遺伝子について答えよ。

(回答) 本研究では解析を行っていない。Table 2 の標的候補遺伝子の中で検索した結果、*MMP14*、*SPOCK1* は *miR-150-5p* によって直接制御されたと報告されているが、他の遺伝子についての報告は検索した範囲ではない。

質問 2 1) マイクロ RNA の発現が、癌細胞もしくは癌組織において抑制される機序を説明せよ。

(回答) 本研究では解析は行っていない。マイクロ RNA の発現抑制機序には、DNA のメチル化やヒストンの脱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、マイクロ RNA 合成分子の異常などが報告されている。また、卵巣癌において環状 RNA の *Foxp1* が *miR-150-3p* と結合することで発現減少させた報告があり、他の癌でも環状 RNA や LncRNA のスポンジ作用によりマイクロ RNA の発現が低下することが明らかとなっている。

質問 2 2) マイクロ RNA を癌治療に役立てる方法について説明せよ。

(回答) 現在、マイクロ RNA を用いた癌治療はいくつかの臨床試験 (phase 1, 2) が進行中である。悪性胸膜中皮腫に対する *miR-151-16* の mimics (Mesomir) の投与や皮膚 T 細胞性リンパ腫に対する *miR-155* 阻害薬 (MRG-106) の投与などが進行中である。一つのマイクロ RNA が多数の標的遺伝子を制御するため、有害事象の程度が重要と考える。

質問 2 3) 論文内の「In LUAD, metastasis occurs even if the primary tumor is small」は、肺腺癌に特異的か、説明せよ。

(回答) 肺癌においては原発巣が非常に小さい場合でも遠隔転移をきたしている症例をしばしば経験する。肺腺癌に限らず、他の組織型でもみられ、肺癌全体の特徴と考える。

質問 2 4) 肺腺癌において、一般的に増殖能、遊走能、浸潤能に関与する key molecules について説明せよ。

(回答) 肺腺癌における key molecules において、増殖能に関しては、EGFR や MET、ALK などが挙げられ、これらの遺伝子は肺腺癌におけるドライバー遺伝子としても報告されている。遊走能や浸潤能は、RhoA/ROCK 経路に関わる分子や TGF- β ・MAPK 経路、PI3K/AKT 経路等の活性化によって誘導される Zeb1/2、Snail、Slug、Twist 等を介した上皮間葉移行に関連した分子が重要と思われる。また、浸潤能に関しては MMP との報告も多く、重要な分子と考える。

質問 2 5) Table 3 の遺伝子の中で、肺腺癌における、増殖能、遊走能、浸潤能に関与する遺伝子はどれか答えよ。

(回答) 過去の報告を検索した結果、増殖能は、*SFXN1* や *HNF4G*、遊走能・浸潤能は、*TNS4* や *SKA3*、*SPOCK1*、*PTGRFN*、*YDJC* が関与していると考えられる。

質問 2 6) 癌細胞の挙動において、増殖、遊走、浸潤は同時に起こることがあるのか、説明せよ。

(回答) 癌細胞は不均一な集団であり、増殖、遊走、浸潤等の変化はそれぞれの細胞によって異なる可能性がある。このことを明らかにするためには、single cell での解析が必要である。

質問 2 7) 論文内の「focal adhesion pathway」について説明せよ。

(回答) 「focal adhesion pathway」は KEGG pathway に登録されている、細胞と細胞外マトリックスの結合部に関与する分子経路である。アクチンフィラメントや細胞外マトリックスとの結合に関わる膜貫通型タンパク (ITGA や ITGB) だけでなく、細胞膜受容体を介するシグナル伝達 (PI3K/Akt シグナル経路や Wnt シグナル経路、MAPK シグナル経路など) に関わる基質、プロテインキナーゼ、ホスファターゼ等も含まれている。我々は過去に、focal adhesion pathway に関わる *ITGA3* や *ITGA6*、*TNC* は *miR-150-3p* に制御されることを報告している。頭頸部扁平上皮癌において、*miR-150-3p* により制御される *SPOCK1* は、発現抑制により「ECM-receptor interaction signaling pathway」や「TGF- β signaling pathway」に影響することも明らかにしており、*miR-150-3p* はこの分子経路に関わる遺伝子を制御していると考えられる。

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。