

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 663 号	学位申請者	眞田 宏樹
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	久保田 龍二	副査 橋口 照人 (

主査および副査の5名は、令和3年1月15日、学位申請者 眞田 宏樹 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) GSE19188 データの詳細を述べよ。

(回答) 91例の肺癌臨床検体における遺伝子発現を解析したデータで、内訳としては腺癌24例、扁平上皮癌16例、大細胞癌24例、他27例が含まれている。

質問2) A549 および H1299 の細胞株を選択した理由を述べよ。

(回答) 本研究はドライバー遺伝子変異が確認されていない肺腺癌症例に対する、新たな治療戦略の探索を目的として行った。A549 は KRAS 変異、H1299 は NRAS 変異が確認されているが、肺腺癌の分子標的治療薬の標的遺伝子となる、EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子などは認めず、本研究の目的に適した細胞株と判断して選択した。

質問3) 他の MCM ファミリー遺伝子の癌抑制効果に関して述べよ。また今回の MCM4 の機能は肺腺癌に特異的か。

(回答) 肺扁平上皮癌では、MCM2 (Onco Targets Ther. 2018; 11: 5025) および MCM5 (J Cancer. 2017; 8: 3641) の高発現が予後不良因子であるという報告がある。MCM4 の高発現が、非小細胞肺癌 (Lung Cancer. 2011; 72: 229) や喉頭扁平上皮癌 (J BUON. 2017; 22: 1272) で予後不良因子との報告があり、肺腺癌に特異的な機能ではない。

質問4) 今回使用した細胞株には、5番染色体上に異常を認めるか。

(回答) A549 および H1299 には5番染色体上に異常は認められない。

質問5) MCM4 が存在する染色体の位置を述べよ。

(回答) 8番染色体長腕に位置する。

質問6) 免疫チェックポイント阻害剤とマイクロRNAとの関連を述べよ。

(回答) 非小細胞肺癌において、治療前の血清中マイクロRNA発現量が、nivolumab の治療効果延長の予測因子になりうるとの報告がある (Acta Oncol. 2018; 57: 1225)。

質問7) Fig.1 で miR-143-5p/3p の発現量が100倍ほど異なるが、発現が低い方である miR-143-5p (パッセンジャー鎖) を研究対象に選択した理由を述べよ。

(回答) miR-143-3p (ガイド鎖) の癌抑制型マイクロRNAとしての報告は多数あるため、本研究では報告が限られるパッセンジャー鎖で、その機能が不明である miR-143-5p に着目して、研究対象とした。

質問8) Fig.1 で肺腺癌細胞株の miR-143-5p/3p の発現が、癌組織検体と比較して著明に低い理由を述べよ。

(回答) 本解析では肺癌手術症例の FFPE から光学顕微鏡下に腫瘍部位を確認し、同部位より採取した検体から RNA を回収した。レーザーマイクロダイセクション法を用いて癌細胞のみを採取していないため、癌細胞周囲の腫瘍間質など結合組織の一部が混入している。そのため癌細胞単独である細胞株では、癌組織検体と比較して miR-143-5p/3p の発現が低値となった可能性が考えられた。

質問9) Fig.2 で miR-143-3p を核酸導入した A549 で、増殖能 (XTT) が抑制されなかった理由を述べよ。

(回答) Cell cycle assay でも増殖能を確認したが、miR-143-3p を核酸導入した細胞株では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞がわずかに増加している程度であり、miR-143-3p の増殖能抑制効果は軽度である可能性を考えた。他の報告でも、肺腺癌細胞株に miR-143-3p を核酸導入した機能解析で、増殖能抑制は認められていない (Mol Cancer. 2019; 18: 181)。

質問10) Cell cycle assay で miR-143-5p と miR-143-3p で、細胞周期が停止する部分が異なる理由を述べよ。

(回答) それぞれの標的遺伝子が異なるため、異なった遺伝子が関与した結果と考えた。

質問11) Cell cycle には CDK などが関連するが、miR-143-5p/3p と細胞周期に関わる遺伝子との関連を述べよ。

(回答) 細胞周期の G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期から S 期の移行にはサイクリン D-CDK4/CDK6 複合体、G<sub>2</sub>/M 期の進行にはサイクリン B/CDK1 複合体が関与している。miR-143-5p は CDK6 への結合部位、miR-143-3p は CDK1 への結合部位を有しており、miR-143-5p の核酸導入では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest、miR-143-3p の核酸導入では G<sub>2</sub>/M arrest が期待されるが、本研究では相反する結果であった。他の癌種における報告では、miR-143-5p は子宮頸癌細胞への核酸導入で G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest が報告され (Cancer Med. 2017; 6: 1409)、miR-143-3p は乳癌細胞への核酸導入で G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> arrest が報告されている (Am J Transl Res. 2017; 9: 2276)。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 2) Fig. S5 で、*miR-143-5p* を強制発現させていない細胞で *miR-143-5p* の RISC への取り込みはみられるか。

(回答) Ago2 抗体を使用した免疫沈降法で、*miR-143-5p* を強制発現させていない mock および control から回収された検体においても、少ないながら PCR で *miR-143-5p* の発現が確認され、*miR-143-5p* の取り込みを確認した。

質問 1 3) *MCM4* は DNA 複製に関与するが、*si-MCM4* 導入細胞での機能解析で、遊走能や浸潤能へ影響した理由を述べよ。

(回答) *MCM4* が EMT に関連する報告はなかったものの、*MCM3* では前立腺癌において、高発現が EMT 誘導に関与することが報告されている (*Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020; 1874: 188415)。 *MCM4* は DNA 複製に関与する遺伝子ではあるが、EMT の関与により、*si-MCM4* 導入細胞で遊走能と浸潤能にも影響した可能性を考えた。

質問 1 4) *miR-143-5p* の発現制御のメカニズムを述べよ。

(回答) すべては解明されていないが、DNA の損傷に反応して、p53 がマイクロ RNA 生合成における Drosha 複合体と相互作用し、Drosha のプロセッシング機能による *miR-143* の発現亢進が報告されている (*J Mol Med*. 2010; 88: 1085)。

質問 1 5) Fig. 1 のマイクロ RNA での PCR の手法を述べよ。

(回答) マイクロ RNA に特異的な primer を使用している。具体的にはステムループ状の構造を持つ primer で cDNA を作成し、リアルタイム PCR で発現を定量的に解析した。

質問 1 6) Fig. 2 で H1299 では G<sub>2</sub>/M 期の細胞が control と比較して差がないようにみえる理由を述べよ。

(回答) 繰り返した実験での結果で、統計上は有意差を認めため、G<sub>2</sub>/M arrest と判断した。

質問 1 7) Table 2 と Table S2 で、*MCM4* が両鎖の標的遺伝子候補に共通して認められている。両方の strand で共通した遺伝子が標的候補として検出されることはあるか。

(回答) 当科で行った *miR-145* および *miR-150* の両鎖の癌抑制型マイクロ RNA における報告でも、両鎖に共通した標的遺伝子を複数認めた。

質問 1 8) マイクロ RNA を用いた治療や検査で保険収載されているものがあるか。

(回答) 現時点で保険収載された治療薬や検査はない。国立がん研究センターで血清中のマイクロ RNA をマーカーとしたがん検診の臨床研究が行われている。また、慢性 C 型肝炎に対する *Anti-miR-122* での第 I 相試験が終了し、被験者 28 人すべての患者において HCV-RNA の低下を認めたと報告されている。

質問 1 9) Fig. 1C で *miR-143-5p* と *miR-143-3p* の発現が相関する意味合いについて述べよ。

(回答) パッセンジャー鎖は分解されるが、本研究ではガイド鎖と相関した発現が確認された。ガイド鎖と比較して微量ではあるものの、パッセンジャー鎖である *miR-143-5p* が安定して存在することで、癌抑制型マイクロ RNA としての機能を有する可能性が考えられた。

質問 2 0) Fig. S2 で *miR-143-5p* と *miR-143-3p* の発現による TCGA database 解析で、発現が予後に相関しなかった理由を述べよ。

(回答) *miR-143* は多数の標的遺伝子に影響を及ぼす。今回の研究で癌促進遺伝子として同定した *MCM4* 以外の多くの遺伝子も制御するため、結果として予後には影響を与えなかった可能性を考えた。

質問 2 1) A549 および H1299 に遺伝子変異は認めるか。

(回答) A549 は KRAS 変異、H1299 は NRAS 変異が確認されている。

質問 2 2) Fig. S4 の EMT に関連した遺伝子は、*miR-143-5p* の標的遺伝子か。

(回答) Western blotting での発現確認を行い、*miR-143-5p* 導入細胞由来の蛋白において、Vimentin, Snail, Slug の発現が抑制された。TargetScanHuman database では各遺伝子に *miR-143-5p* の予測結合部位は認めなかった。

質問 2 3) 候補遺伝子として *MCM4* を選んだ理由を述べよ。DNA 複製にかかわる遺伝子で、他の細胞傷害性抗癌剤と同様の作用機序であり、治療候補として適切か。

(回答) GSE19188 データより *MCM4* は肺癌組織に高発現しており、*si-MCM4* により肺腺癌細胞の機能は有意に抑制された。そのため従来の細胞傷害性抗癌剤と比較して、高い治療効果が期待されると考え、研究対象に選択した。

質問 2 4) cell cycle assay での細胞周期を止める時期が、*si-MCM4* と *miR-143-5p* とで異なっており、他の遺伝子の関与が示唆される。*miR-143-5p* の標的として *MCM4* は重要な標的と考えられるのか。

(回答) 今回の解析結果から、肺腺癌において *MCM4* は *miR-143-5p* が直接的に関与する重要な癌促進遺伝子であることが明らかになった。また *MCM4* の高発現は肺腺癌症例の予後不良因子であり、臨床的にも重要な意味を持つと考えた。他にも重要な標的遺伝子が存在している可能性があり、扁平上皮癌での検討なども含めた探索を今後の検討課題としたい。

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。