

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 (604)号	学位申請者	田中 貴子	
審査委員	主査	中川 昌之	学位	博士 (医学)
	副査	古川 龍彦	副査	井上 博雅
	副査	橋口 照人	副査	上野 真一

主査および副査の5名は、令和3年1月14日、学位申請者 田中 貴子 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。

質問1) TOP2A 発現における予後解析は TCGA データベースを用いており、日本人以外のデータである。当教室でのデータで比較は行ったか。

(回答) 当教室の臨床検体を用いて TOP2A の蛋白レベルの発現を免疫染色で確認した。癌部・非癌部での発現比較を行い、癌部で高発現している事を確認した。当教室の臨床検体を用いての予後解析は行っていない。

質問2) シスプラチンを用いた抗癌剤感受性の実験について、TOP2A を過剰発現するとシスプラチン感受性が低下するという実験は行ったのか。

(回答) 今回用いた膀胱癌細胞株では、TOP2A の高発現株であるため、siRNA を用いた loss-of-function の解析を行った。TOP2A の発現が少ない癌細胞株に、TOP2A を過剰発現させ (gain-of-function)、シスプラチン耐性になるか、検討する事は重要と考える。

質問3) HMGB2 や SP1 は TOP2A のプロモーター領域に直接結合するのか、また、どの程度結合するのかは調べたか。

(回答) TOP2A のプロモーター領域には、2カ所の GC box (GGGCGG) と、5カ所の ICB box (CCAAT) の存在が明らかとなっている。SP1 は、GC box に結合し、転写を促進する。ICB box には、転写因子である Nuclear transcription factor Y (NF-Y) が結合する。HMGB2 は、NF-Y と相互作用し転写を促進する。今回の解析では、TOP2A のプロモーター領域に結合する転写因子について、生化学的な解析は行っていない。

質問4) Figure 5 について、LREFIP1 は LRRFIP1 の間違いではないか。

(回答) 誤字である。

質問5) TOP2A をノックダウンした細胞で運動能が抑制されたことについて、どのような解釈をしたのか。

(回答) TCGA データベース上で TOP2A 高発現群について、Gene Set Enrichment Analysis を用いて解析をした。TOP2A 高発現群では EMT 経路や NF- κ B 経路などが優位に動いており、TOP2A をノックダウンすることでこれら運動能を制御する回路も同様に抑制されたと考えている。TOP2A とこれら運動能を制御する直接的な関係までは解明できていない。今後の課題と考える。

質問6) SP1 と HMGB2 が TOP2A 発現に関係しているということだが、それら二つの分子の発現について相関は調べたか。調べていたら相関があるのか。

(回答) SP1 と HMGB2 については、それぞれ独立して、TOP2A の転写に関与していると考えている。データベース解析 (GEPIA2) においても、SP1 と HMGB2 の発現で、有意な相関は見られない。HMGB2 は、他の転写因子 Nuclear transcription factor Y (NF-Y) との発現レベルの相関が認められた ($p=0.000011$, $R=0.32$)。NF-Y は、TOP2A プロモーター領域の CCAAT 配列に結合し、HMGB2 は、NF-Y と相互作用し転写を促進する事が明らかになっている。

質問7) マイクロ RNA の発現量と SP1、HMGB2 の発現量に差や相関関係があったのか。TCGA データベース上でマイクロ RNA 発現の確認は可能か。

(回答) SP1 遺伝子の 3' UTR には、今回解析の対象とした miR-30c-2-3p の結合サイトが2カ所存在する。SP1 が、miR-30c-2-3p によって、発現制御されているか、重要な点であり、今後調べる課題である。同様に、HMGB2 遺伝子の 3' UTR には、miR-30c-2-3p の結合サイトが3カ所存在する。これら転写因子の発現亢進と、miR-30c-2-3p の発現抑制については、検討課題である。TCGA データベース上でマイクロ RNA 発現の確認は可能であるが、本研究では行っていない。

質問8) TOP2A がシスプラチンに対する耐性を得る機序についてはどのような機序が考えられるか。DNA repair の作用の確認は行ったか。

(回答) TOP2A の発現がシスプラチン耐性にどの様に関与しているか、その詳細な分子機序は不明である。GSEA 解析では、TOP2A 高発現群では、G2M-checkpoint、Mitotic-spindle、DNA repair などの遺伝子群が高発現している。シスプラチンは、DNA の構成塩基であるグアニン、アデニンの N-7 位に結合する。2つの塩素原子部位で DNA と結合するため、DNA 鎖内には架橋が形成される。そのため正常な細胞分裂が阻害されアポトーシスに至る。シスプラチン抵抗の分子機序として、細胞外への薬の流出、アポトーシスの抑圧、DNA 修復の活性化などが考えられている。TOP2A 高発現細胞株 (シスプラチン耐性株) を用いた機能性 RNA 解析が重要であると考えている。

質問9) Figure 1 では2つの膀胱癌細胞株における miR-30c-5p と miR-30c-2-3p は低発現であるが、マイクロ RNA が低発現となる機序はどのようなものが考えられるか。

(回答) マイクロ RNA が低発現となる機序については、メチル化によるマイクロ RNA の分解や LncRNA によるマイクロ RNA 吸着作用の影響が考えられる。

質問10) 何らかの操作を行うことで、膀胱癌細胞株内のマイクロ RNA 発現が増加したという報告はあるか。

(回答) 細胞増殖因子やサイトカインなどは、マイクロ RNA の発現を、正または負に制御する事が報告さ

最終試験の結果の要旨

れている。また、漢方薬に含まれるパーブもマイクロRNAの発現を制御している事が報告されている。
 質問 11) RISC 取り込み実験を行っているが、どのような結果になることを期待して行ったのか。また、実験がうまくいかないことを想定していたのか。

(回答) 本研究では、miR-30c-2-3p (passenger 鎖) に着目した。一般的に、passenger 鎖は、RISC に取り込まれずに、細胞質で分解され機能を有しないとされている。そこで、核酸導入した miR-30c-2-3p が、RISC に取り込まれる事を明らかにした。つまり、passenger 鎖を用いた機能解析実験系の有効性を示した。

質問 12) Figure 8 について、TOP2A の転写を促進する分子として HMGB2 と SP1 の二つに絞った理由はなぜか。

(回答) 癌部で発現高値であり、かつ、高発現で予後不良となる分子を $p < 0.01$ に限定して選択した。

質問 13) HMGB2 は転写因子のようにスライドで表現されているが、HMGB2 は転写因子なのか。

(回答) TOP2A のプロモーター領域には、2カ所の GC box (GGGCGG) と、5カ所の ICB box (CCAAT) の存在が明らかとなっている。SP1 は、GC box に結合する。ICB box には、転写因子である Nuclear transcription factor Y (NF-Y) が結合する。HMGB2 は、NF-Y と相互作用し転写を促進するが転写因子には分類されない。

質問 14) HMGB2 は細胞質に染まることはあるか。

(回答) 今回行った免疫組織化学染色では HMGB2 は核のみ染色された。

質問 15) 16 ページの本文中に acting as competing という文章があるが、競合して作用するとはどのような意味か。

(回答) lncRNA が miR-30c-2-3p を吸着し、結果的に作用し得る miR-30c-2-3p が減少することを表現するために competing を用いた。

質問 16) miR-30c-1-3p の解析は行ったのか。

(回答) 当科の検体を用いて解析した RNA-seq による microRNA 発現プロファイルでは、miR-30c-1-3p は癌部で発現抑制されていなかったため解析しなかった。

質問 17) 10 個の分子が候補として挙げたなかで、TOP2A を選択したのはなぜか。

(回答) 最も癌部で発現が高値であり、実験をするなかで miR-30c-2-3p を核酸導入した際の抑制効果が最も得られていたため、TOP2A を選択した。

質問 18) TOP2A 以外の 9 個の分子について検討は行ったか。

(回答) 今回は検討していない。今後の課題と考えている。

質問 19) ゲムシタピンを用いた感受性試験についての検討は行ったか。

(回答) ゲムシタピンを用いた感受性試験を行ったが、 IC_{50} が測定できなかった。理由としてはゲムシタピンの作用機序が塩基置換作用のため、測定までの時間経過や細胞株の生育環境が影響して結果が出せなかったと考えている。

質問 20) TOP2A の細胞内局在はどこか。

(回答) 免疫組織化学染色では核に陽性であった。

質問 21) TOP2A を選択した理由について、他に着目した理由はないのか。

(回答) 18 個の分子のうち、臨床病理学的因子について多変量解析を行ったところ、遺伝子発現が独立した予後因子となったものは 10 個であった。さらにその 10 個の分子のなかで、今回は特に癌部で発現が高かった TOP2A を選択した。

質問 22) HMGB2 と SP1 は miR-30c-2-3p とは関係なく発現しており、miR-30c-2-3p は直接悪性化に影響するわけではなさそうだが、どう考えているか。

(回答) 今回の検討では、miR-30c-2-3p が調節する癌抑制型遺伝子である TOP2A を見出し、次いで TOP2A を起点とし TOP2A を調節する因子の検討を行った。miR-30c-2-3p との直接的な関連については検討していない。

質問 23) TOP2A が細胞の悪性化に影響しているのか、それとも、薬剤耐性等を介して予後不良に影響しているのか、どちらと考えているか。

(回答) TOP2A ノックダウン細胞株での実験を通して、細胞増殖能や遊走、浸潤能の抑制効果が得られたことから、TOP2A が細胞の悪性化に寄与している可能性があると考えている。

質問 24) 抗がん剤を用いた検討で、ゲムシタピンやオキサリプラチンではなく、なぜシスプラチンを用いたのか。

(回答) ゲムシタピンを用いた検討を行ったが IC_{50} での比較が行えなかったため、既報にあるシスプラチンを用いて検討を行った。他剤での検討が今後は必要と考えている。

質問 25) 今後の展開について既存薬再開発とあるが、その意図はなにか。

(回答) microRNA は多数の遺伝子に影響を及ぼし得るため、microRNA を用いた治療薬開発は現時点では難しいのではないかと考えている。microRNA を起点にして候補として挙げた分子からさらに候補となる分子を見出し、その分子に対する既存薬がある場合には既存薬を用いた再開発が有効であると考えている。

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。