

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	605号	学位申請者	米澤 智一
審査委員	主査	武田 泰生	学位	博士(医学)
	副査	古川 龍彦	副査	大塚 隆生
	副査	吉本 幸司	副査	橋口 照人

主査および副査の5名は、令和3年3月22日、学位申請者 米澤 智一 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) 臨床検体の背景について、女性患者の検体が多いがこれは腎癌の疫学的背景を反映しているか。

<回答> 腎細胞癌の新規罹患男女比は、男性2~3:女性1と男性が多い。そのため採用した検体は男女差を反映したものではない。検体選択の条件は、腎癌病変部と正常腎組織を同時に採取できていること、とした。

質問 2) Table 2で、“American trypanosomiasis”が二つあるが間違いか。

<回答> MAPK signaling pathway 下の記載は間違いであるため取り下げさせていただく。

質問 3) GEO データベースからアレイデータを選択して使用しているが、選択の基準について述べよ。

<回答> GEO データベースには腎癌検体や腎正常検体の遺伝子発現アレイデータが公開されているが、同一のアレイプラットフォームを用いたデータや含まれるサンプル数は限定的である。正常検体のアレイデータはさらに少なく、今回の解析には正常検体が組み込まれている GSE36895 と GSE22541 を選択した。この2つのアレイには合計で腎癌 53 サンプル、正常腎 23 サンプルが登録されている。

質問 4) miR-1274a 発現は A498 株で最大だが、同 microRNA ノックダウン後の BMPR1B 発現は低い。その機序をどう考えるか。

<回答> A498 株のノックダウン効率が低いために BMPR1B の発現が回復しない可能性と、BMPR1B pathway を介さずに表現型を変化させているオフターゲット効果の可能性がある。

質問 5) TCGA データベースでは、miR-1274a 発現と生存率の相関を認めたのか。

<回答> 同データベースには miR-1274a の発現データがないため、相関については解析できていない。

質問 6) 免疫抗体が BMPR1B 発現同定に使用できることを評価したのか。

<回答> 市販の抗体を購入して使用した。メーカーが実験を行い検証しており、下記 URL がそのデータになる。

<https://www.genetex.com/Product/Detail/BMPR1B-antibody-N3C3/GTX102453>

質問 7) 免疫における BMPR1B の発現について、正常腎組織の発現と悪性度 G2 腎癌組織の発現強度を比較したか。

<回答> 今回は行っていないが、追加の解析を行い確認したい。

質問 8) 腎癌において SMAD family 遺伝子座転位や欠失があるのか。

<回答> 腎癌における SMAD 遺伝子座の転位や欠失などは、これまで報告されていない。

質問 9) アポトーシスアッセイにおいて、アポトーシスとネクローシスの区別を行ったか。

<回答> ヒストグラムにおいて左上のプロットはネクローシスで右下と右上はアポトーシスのプロットであるが、右下と右上のプロットのみで評価している為、ネクローシスは含まれていない。

質問 10) BMPR1B 遺伝子は癌抑制遺伝子と考えてよいか。

<回答> 他の多くの癌腫で癌抑制遺伝子と報告されているが、我々の解析では癌抑制遺伝子と同時に癌遺伝子の機能も有すると考える。

質問 11) BMPR1B が直接アポトーシスを誘導することを証明することが必要と思われるが、どのように解析を行うのか。

<回答> BMPR1B の発現を変化させてアポトーシス細胞やカスパーゼの影響を確認する解析が挙げられる。その一つとして、BMPR1B 遺伝子をノックインした細胞を用いた機能解析を行うことが必要と考える。

質問 12) microRNA ノックダウン手法のうち、morpholinos について説明せよ。

<回答> morpholinos はオリゴヌクレオチドの一種で、microRNA のガイド鎖や Drosha, Dicer の機能を阻害して、microRNA の機能を抑制する。

質問 13) miR-1274a が sorafenib で上昇するとされるが、その機序をどのように考えるか。

<回答> BMPR1B は TGF- $\beta$  受容体と類似の構造を有し、TGF- $\beta$  superfamily の一員であることが知られている。過去の報告では、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の遺伝子発現の変化が、microRNA の発現に変化(フィードバック)をもたらしている。miR-1274a/BMPR1B pathway にも同様な機序が存在する可能性があるため、sorafenib 投与後に BMPR1B の発現が変化してシグナル伝達がフィードバックし、miR-1274a 発現が上昇した可能性がある。

質問 14) 本研究で採用したサンプルは、同上のような影響がないものを採用しているのか。

<回答> sorafenib が投与されたサンプルは入っておらず、影響がないものを採用している。

質問 15) 発現が亢進している microRNA 研究が、発現が低下している研究より遅れている理由についてどう考えるか。

<回答> microRNA の研究では細胞機能解析が必要である。発現が低下している microRNA については gain-of-function assay を行うが、細胞質内のリボソーム付近でおこる現象であるため、細胞外から microRNA 類似体を核酸導入することで十分な発現の亢進が得られる。一方、発現が亢進している microRNA の機能解析では、loss-of-function assay が必要だが、ノックアウト以外の手法では十分なノックダウン効果が得にくく、十分なノックダウン効果を得るには高濃度の試薬が必要になるため、オフターゲット効果の懸念が挙げることが理由

として考えられる。

質問 16) 本研究では上の問題点をクリアしたと考えてよいか。

<回答> miR-1274a の oncogenic な作用は他の複数の癌腫でも報告されており、本研究結果は概ねそれらと一致するものでクリアできていると考える。

質問 17) リガンドの BMP は培養液や体液内に含まれるか。受容体の発現だけでは論者のいうシグナル伝達は起こりにくいのではないか。

<回答> 培養液や体液内の BMP を測定していない。リガンド依存性なのか非依存性なのか、解析を行いたい。

質問 18) BMPRI1B の遺伝子座が mutation をおこしている可能性はないか。mutation があれば過剰発現を起こしリガンドがなくても下流にシグナルが伝わる可能性がある。

<回答> 今回使用した腎癌細胞株において、BMPRI1B の mutation は報告されていないが、BMPRI1B の mutation が軟骨異栄養症の原因となっているという報告がある (J Med Genet. 2005 Apr;42(4):314-7.)。そのため、BMPRI1B の mutation の有無が疾患(腎細胞癌)の原因となっている可能性があるため、同遺伝子 mutation の有無を解析する必要がある。

質問 19) 細胞アポトーシスに比して細胞増殖能がおちている。細胞周期停止の可能性はどうか。

<回答> 細胞周期停止の影響は十分に考えられる。今後、細胞周期の解析を行い、確認したい。

質問 20) SMAD 依存性のアポトーシスについて説明せよ。

<回答> アポトーシスがおこるためにはカスパーゼの活性化が必要だが、SMAD 複合体が核内へ移行したのちシグナルがミトコンドリアへ伝達されてカスパーゼ経路が活性化されるという報告がある。

質問 21) 本解析では p53 を含め多数の遺伝子が動いている。BMPRI1B が(表現型変化の)本体ではない可能性はないか。

<回答> miRNA は複数の遺伝子を制御することが知られており、BMPRI1B 以外の遺伝子も miR-1274a の標的遺伝子として表現型変化の原因となっている可能性は十分にあると思われる。

質問 22) 免疫染色に使用した臨床検体は、凍結標本か、パラフィン切片か。

<回答> 凍結標本を使用した。

質問 23) Caki1 の miR-1274a 発現亢進が有意ではないのに機能解析に使用した理由はなにか。

<回答> 機能解析する細胞株数は多い方が実験結果の信頼性が上がると考えた。また miR-1274a をノックダウンした際に Caki1 でも増殖能が低下していることが確認した。そのため、miR-1274a の発現亢進は正常と比べて有意差はなかったが傾向を認めた為に解析に採用した。

質問 24) Figure 1B, C, D について、miR-1274a の発現が癌検体では亢進しているが、静脈浸潤の有無や T 分類では発現に有意差がなかったのか。

<回答> 臨床検体 40 例の解析では有意差を認めなかった。

質問 25) 標的遺伝子探索のために ACHN 株を採用しているが、miR-1274a 発現が高かったのは A498 株である。ACHN 選択の理由は何か。

<回答> 標的遺伝子の推定には、ノックダウン前後の mRNA の発現変化を解析する。そのため miRNA のノックダウン効率を最重要視し、ACHN を採用した。

質問 26) Table 2 について、KEGG パスウェイ解析で 73 個の遺伝子に絞られたが、提示された遺伝子の合計はそれより多くみえる。

<回答> Table 内の遺伝子は重複している遺伝子もあるためである。

質問 27) 標的遺伝子候補は当初 694 個であった。どのようにして 9 個に絞っていったのか。

<回答> マイクロアレイで発現が有意に上昇した遺伝子 694 個を、KEGG パスウェイで解析し、統計学的アルゴリズムで有意とされた 73 個の遺伝子へ絞った。実際の臨床検体で異常発現を示すことが重要なので、GEO データベースのアレイデータを参照して、腎癌検体で実際に低下している遺伝子と照合した結果、9 個の遺伝子に絞られた。

質問 28) PAK6 の解析は行ったか。また BMPRI1B 選択の理由はなにか。

<回答> PAK6 の mRNA 発現は miR-1274a のノックダウンで上昇していたが、BMPRI1B が Table 3 の候補遺伝子の中で最上位であったため、今回は BMPRI1B のみ解析を行った。

質問 29) Figure 5 と他癌腫の考察について、BMPRI1B 発現が低いと予後がよいが、免疫では癌腫では発現が低下している。また癌悪性度が高くなると BMPRI1B タンパクの発現が上昇している。本結果に整合性をもたせる仮説をのべよ。

<回答> BMP/BMPRI1B シグナル伝達は、先に述べた理由で TGF- $\beta$  パスウェイと類似の動きをする可能性が高い。TGF- $\beta$  は正常細胞では癌抑制的な機能(細胞増殖の抑制や細胞外マトリックスの蓄積など)を有する。しかし癌が進展するにつれ、EMT 化を促しメタプロテアーゼを誘導することで、遊走浸潤能が高まり癌促進的な機能へかわる。この TGF- $\beta$  スイッチとよばれる現象が該当する結果に整合性をもたせる仮説と考える。

質問 30) BMPRI1B の発現について。転写を増幅するメカニズムは分かっているか。

<回答> BMPRI1B 発現上昇の機序についてはわかってない。

質問 31) microRNA 発現が亢進する機序について、総論的なことが分かっているのか。

<回答> microRNA の発現を亢進させる共通した機序は不明である。一方腎細胞癌における miR-1274a の発現亢進については miR-1274a が位置する 5p13.1 に認める Z5O101 遺伝子の発現亢進が、その可能性として考えられる。Z5O101 遺伝子発現が亢進している機序についてメチル化異常やヒストン修飾などが関与している可能性があり、解析が必要と考える。

質問 32) miR-885-5p は、miR-1274a の近傍ではないか、またなぜ注目しなかったのか。

<回答> miR-1274a は 5 番染色体上、miR-885-5p は 3 番染色体上にあり両者の位置は近傍ではない。また miR-1274a の Ct 値は 24-26 に対して、miR-885-5p の Ct 値は 30 程度であり、発現の高い miR-1274a を解析対象とすることにした。

質問 33) A498 株の解析結果 (miR-1274a の発現量が最も亢進していてアポトーシスが強く誘導されるのに BMPRI1B の発現がノックダウン後も上昇しない)から、BMPRI1B がアポトーシス誘導の本体ではないと感じる。この疑問点をどのように解消していくのか。

<回答> 本解析では高濃度試薬によるノックダウンの限界 (不十分なノックダウン効率とオフターゲット効果)を感じている。そのため CRISPR/Cas9 でノックアウトを行い比較すること、また BMPRI1B をノックインして機能を解析することなどが必要と考える。

質問 34) BMPRI1B の発現は、癌悪性度がたかまるにつれて発現が亢進していくと考えるか。

<回答> そのように考えている。

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。