

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 608 号	学位申請者	岡村 俊介
審査委員	主査	古川 龍彦	学位
	副査	井上 博雅	副査
	副査	武田 泰生	副査
<p>主査および副査の5名は、令和3年3月31日、学位申請者 岡村 俊介に面接し、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) 臨床検体においてシスプラチン感受性組織と耐性組織の発現の違いなどは検討しましたか。 <回答> シスプラチン耐性の組織を集めることが困難で、十分な検体数確保できなかったため、今回は細胞株を用いて解析を行いました。</p> <p>質問 2) 同様にシスプラチン耐性細胞株を用いた解析を行った報告はあると思いますが、そのなかで <i>miR-486-5p</i> の報告はあるのでしょうか。 <回答> T24 でシスプラチン耐性株を作成した報告はありますが、その論文で <i>miR-486-5p</i> について報告されていません。</p> <p>質問 3) 考察において <i>miR-214</i> や <i>miR-218</i> がシスプラチン耐性に関与していると記載されていますが、今回のシーケンスの解析ではどうだったのですか。 <回答> 今回の解析では <i>miR-214</i> や <i>miR-218</i> が候補に挙がりませんでした。</p> <p>質問 4) EHHADH がアポトーシスに関与していると報告していますが、どのように関与しているのでしょうか。 <回答> 今回シスプラチン耐性に関与している遺伝子として着目し、シスプラチンが最終的にアポトーシスを誘導する薬剤であることから、アポトーシスの誘導がキーポイントと考えました。PPAR が TP53 に関与するとの報告がありましたので、ペルオキシソームがアポトーシスの経路に何かしら影響を及ぼすのではないかと考えました。</p> <p>質問 5) <i>miR-486-5p</i> が耐性株で低下している機序について、欠損によるものなら耐性株で変化しないのではないかと。 <回答> microRNA の発現は long-noncodingRNA や AGO 蛋白での削除などにより調節されることが考えられますが、<i>miR-486-5p</i> の発現を調節する明確なメカニズムは解明できておりません。</p> <p>質問 6) 親株と耐性株のシスプラチン非存在下での増殖能はどうなのですか。 <回答> 親株と耐性株での増殖能の変化はありませんでした。遊走能、浸潤能は計測しておりません。</p> <p>質問 7) 今回の題名は EHHADH をメインにおいており、<i>miR-486-5p</i> がメインになってないのはなにか意図があるのでしょうか。 <回答> 今回の論文投稿当初は <i>miR</i> をメインにした題名だったのですが、投稿直前に <i>miR-486-5p</i> をメインにした別の論文が投稿されてしまいました。論点を変えて差別化をはかるために EHHADH をメインにした題名としました。</p> <p>質問 8) 細胞株にシスプラチンを投与した前後での <i>miR-486-5p</i> や EHHADH の発現の変化はあったのですか。 <回答> 今回はシスプラチン投与後の発現の変化は解析しておりません。</p>			

質問 9) 正常組織と癌組織を比較したときに *miR-486-5p* の発現は変化しているのですか。

<回答> 候補の miR を抽出するときに正常組織と膀胱癌組織を比較した発現プロファイルを用いて、癌組織で発現低下している miR を抽出しております。よって正常組織と比較して癌組織では発現低下しており、耐性組織ではさらに低下していることが予想されます。

質問 10) 逆に EHHADH を過剰発現させると耐性化されるのですか。

<回答> 過剰発現での機能解析も考えたのですが、今回は行っておりません。今後の研究課題だと思っております。

質問 11) 遊走、浸潤も抑制されておりますが、EHHADH の下流に遊走、浸潤を抑制するような遺伝子があるのでしょうか。

<回答> 今回は増殖がメインと考えており、遊走、浸潤能に関しては詳しい解析は行っておりません。EHHADH と遊走、浸潤能との関連性の報告も見受けられませんでした。

質問 12) 使用した BOY, T24 の遺伝子解析において、いままで報告されたシスプラチン耐性に関与する遺伝子変異などの報告はあるのですか。

<回答> BOY は当科で樹立した細胞株なので報告はありません。T24 ではシスプラチン耐性株が作成され、シスプラチン耐性株での BCL2、MCM7、および CCNE1 のアップレギュレーションが報告されております。

質問 13) Fig1A は縦軸がシスプラチン濃度で、横軸は時間、シスプラチンにさらした時間ということですか。

<回答> シスプラチン耐性細胞株作成時の培養条件で、シスプラチン濃度を示したものです。

質問 14) 臨床サンプルにおいて *miR-486-5p* と EHHADH の相関関係はどうなっておりますか。

<回答> 補助 Figure にて、TCGA の database にて *miR-486-5p* と EHHADH の発現に負の相関がないことを確認しております。

質問 15) EHHADH が薬剤耐性に関与しているのはシスプラチン特異的なものなのか、他の薬剤の耐性にも関与していると考えますか。またこれらのシスプラチン耐性細胞は他の薬剤にも耐性を持っていますか。

<回答> 今回私が考察した機序では pre target resistance に関与しており、薬剤により細胞内への取り込みの方法は異なるため、シスプラチンに特異的なものではないかと考えております。他の薬剤との交差耐性については確認しておりません。

質問 16) 膀胱癌において脂肪酸の代謝がどうなっているのか検索していますか。

<回答> 今回膀胱癌での脂肪酸の代謝は検討しておりません。

質問 17) 他の脂肪酸の代謝の酵素発現の上昇でも耐性となると考えますか。

<回答> 他の酵素上昇により β 酸化の活性化や、細胞内環境の変化により耐性化が起こることが推測されます。

質問 18) 抑制型 miR や EHHADH を実臨床で利用するためには、どうしたらいいのでしょうか。

<回答> 腫瘍マーカーでの使用は難しいと思います。食道癌や胃癌では *miR-486-5p* の発現低下が予後不良因子として使用できるのではないかと報告はあります。

EHHADH の臨床利用としてはオメガ 3 タイプ多価不飽和脂肪酸が、がん細胞の成長や転移を抑制することが報告されており、食事療法による効果に期待できるのではないかと考えます。

質問 19) 耐性株でシスプラチンと EHHADH の knockdown の相加効果を見ていますが、親株でも効果はありますか。

<回答> 親株でも相加効果はありました。

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。