

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 623 号	学位申請者	保坂 優斗
審査委員	主査	井戸 章雄	学位
	副査	井上 博雅	副査
	副査	榎田 英樹	副査
			博士 (医学)
			古川 龍彦
			山田 保俊

主査および副査の5名は、令和3年9月13日、学位申請者 保坂 優斗 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) 細胞株 HuCCT1 は腹膜播種細胞であるが腹水から採取したものか。接着能はどうであったか。

(回答) 腹水から採取したものである。腹膜播種細胞由来ではあるものの形態は上皮細胞様であり、ほかの胆管細胞癌細胞株と同様に接着し培養も問題なく可能であった。

質問2) HuCCT1 は増殖能がよかったとのことであるが、遊走能と浸潤能はどうであったか。

(回答) 通常の状態では遊走能と浸潤能ともに強く、細胞量を調整し実験を行った。

質問3) 遊走能と浸潤能をみるときに Scatter Factor などの因子を加えたか。

(回答) 今回の解析では特別な因子は加えず実験を行った。

質問4) microRNA 発現は何によって制御されているか。

(回答) 今回の研究では実証できていないが、ほかの癌腫では lncRNA による吸着や DNA の脱メチル化、TP53 の変異などが miRNA の発現低下に関与していることが報告されている。また TGF- $\beta$  亢進によって Smad2/3 を介して miR-29-3p の発現が抑制されることも報告されている。

質問5) miR-29-3p の生理的働きはどのようなものがあるか。

(回答) 生理的機能は不明である。ただし、癌では miR-29-3p の発現低下によって代謝が活性化することが知られており、正常組織でも miR-29-3p の発現低下が代謝を活性化し組織修復を改善させている可能性はある。

質問6) SP1 は発現レベルで調整されているか。メチル化によるものでないか。6 つの転写因子 (SP1, CREB1, MAX, FHL2, RFX1, HIF1A) の中で miR-29-3p の結合部位を持つものは SP1 のみか。

(回答) DNA のメチル化は SP1 の転写調整に大きく関与しているが、SP1 の過剰発現が悪性化に寄与することも報告されており、メチル化と同様に SP1 の発現量は転写の調整に重要な要素と考えられる。6 つの転写因子のうち miR-29-3p の結合部位を持つものは SP1 のみであった。

質問7) 肝内胆管癌とほかの胆管癌との違いはあるか。

(回答) 最近の全ゲノム解析で肝内胆管癌と肝外胆管癌はそれぞれ特異的なドライバー遺伝子変異が報告されている。そのため、肝内胆管癌と肝外胆管癌は分子生物学的にも違いがあると考えられる。肝内胆管癌では FGFR 1-3, IDH1/2, BAP1 の変異が特徴的であり、肝外胆管癌では PRKACA-PRKACB 融合遺伝子や ARID1B, ELF3 の遺伝子変異が特徴的である。

質問8) インテグリンの発現が上昇することで運動能が亢進する報告はあると思うが、今回の20個の癌促進経路の中には EMT などに関わる経路が入っていないがなぜか。

(回答) miR-29-3p に結合する分子の中で EMT に関わる分子が少なかったことが原因と考えられる。

質問9) ITGA6 はインテグリン $\alpha$ サブユニット (ITGA) の中でよくみかけるものではないと思うが、ほかの ITGA も肝内胆管癌で発現上昇しているのになぜ ITGA6 を選択したか。

(回答) miR-29-3p に結合部位を持ち、かつ、癌部で高発現を示したインテグリン $\alpha$ サブユニットは ITGA2 と ITGA6 の2つであった。ITGA2 は細胞株を用いて miR-29-3p を核酸導入行っても qPCR で結果が得られなかった。そのため、ITGA6 に絞って実験を行った。

質問10) ITGA6 と ITGB1 は多機能幹細胞に発現しているということが報告されているが、stemcellness の観点から調べたか。

(回答) 今回の研究では調べていない。stemcellness とは異なるが ITGB1 はノックアウトすると胎生致死を起こすということが報告されており、重要な分子であると考えられる。

質問11) 肝内胆管癌で miR-29-3p あるいはインテグリンの発現と予後との関連があるかは調べているか。

(回答) 肝内胆管癌は1施設ごとの登録患者数が少なく TCGA のデータベースの登録でも36例しかない。そのため TCGA のデータベース上では ITGB1 の発現量で予後に差が付きそうな結果が得られたが、有意な差は認めなかった。当科の臨床検体ではさらに患者数が少ないため検討を行っていない。

質問12) miR-29-3p が SP1, ITGA6, ITGB1 を制御することだが、SP1 をノックアウトすることで、ITGA6 と ITGB1 と miR-29-3p の関係はどうなるのか。

(回答) 今回の研究では SP1 をノックアウトした実験は行っていない。SP1 をノックアウトするとさらに ITGA6 と ITGB1 の機能が低下することが考えられる。

質問13) 肝内胆管癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果はどうか。

(回答) 肝内胆管癌の中に PD-1/PD-L1 遺伝子の発現が高く、かつ T 細胞関連遺伝子の発現が高い群が一定数いることがこれまでに報告されている。そのため、免疫チェックポイント阻害剤が効果を示す症例は少なからず存在すると考えられるが現在はまだその有用性を示す明確なデータはない。

質問14) 肝内胆管癌に対する特異的な変異 FGFR1-3, IDH1 の阻害剤の効果はどうか。

(回答) IDH1 阻害剤は有効であるという報告があるが、登録症例数が少ないため結論は得られていない。

## 最終試験の結果の要旨

- 患者数が少ないため難しいが、多施設による大規模な前向き試験で効果が証明されることを期待したい。
- 質問 15) 今回使用した 2 種類の細胞株では、肝内胆管癌に特異的な遺伝子変異の検索をしたか。  
 (回答) 今回使用した細胞株の遺伝子変異については解析していない。
- 質問 16) miRNA プロファイルでほかの miRNA が上位にあるのになぜ *miR-29-3p* に着目したのか。  
 (回答) 今回解析に用いたプロファイルで上位の miRNA はすでに報告されているものが多く、*miR-29-3p*-family がすべて癌部で有意に発現低下していたため、*miR-29-3p* に着目した。
- 質問 17) 肝細胞癌と肝内胆管癌の miRNA プロファイルの差異はあるか？  
 (回答) 肝細胞癌と肝内胆管癌の 9 種類 (*miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, miR-223*) の miRNA の発現量を比較した報告はあるが、網羅的に検索した報告はない。今回使用した肝内胆管癌 miRNA プロファイル上位 10 個はいずれも肝細胞癌でも癌抑制 miRNA として機能していることが報告されていた。
- 質問 18) *miR-29-3p* の核酸導入では増殖能が変化しなかったのに、なぜインテグリンをノックダウンすると増殖能が抑制されるのか。  
 (回答) インテグリンのノックダウン効率が結果に影響を与えた可能性がある。今回の研究では miRNA の核酸導入もインテグリンの siRNA の投与も一律に 10nM で投与し調整は行わなかった。
- 質問 19) インテグリンの構造変化(不活化)と miRNA の関与は調べられたか。  
 (回答) これまでにインテグリンの構造変化には細胞外基質のフィブロネクチンや細胞内部の Talin が関与する報告があるが、miRNA が関与するという報告はない。本研究でもインテグリンの構造変化と miRNA の関連については調べていない。
- 質問 20) *miR-29* は 1 番染色体 (Chr1. q32. 2) と 7 番染色体 (Chr7q32. 3) に存在するがこの領域のコピー数の欠失や変異について CGH アレイで調べた報告はないか。その領域に関してメチル化の報告はないか。  
 (回答) 胆管癌のコピー数の変異を調べた報告は 3 編ある。いずれの報告も詳細なデータは確認できなかったが、すべての報告で 1q と 7q はコピー数の増幅が確認された。肝内胆管癌のメチル化を調べた報告はあるが、1 番染色体 (Chr1. q32. 2) と 7 番染色体 (Chr7q32. 3) に特異的なデータは確認できなかった。
- 質問 21) 増殖能について *miR-29-3p* の核酸導入では差がなかったが、インテグリンのノックダウンでは増殖能が抑制されたのはなぜか。ノックダウン効率の差がこの増殖能の結果に影響したのではないか。  
 (回答) インテグリンのノックダウン効率が結果に影響を与えた可能性がある。今回の研究では miRNA の核酸導入もインテグリンの siRNA の投与も一律に 10nM で投与し調整は行わなかった。
- 質問 22) *SPI* は転写の際に、*miR-29-3p* は転写後に *ITGA6* と *ITGB1* を制御しているが、*SPI* だけを siRNA でノックダウンした際の *ITGA6* と *ITGB1* の発現は調べなかったか。  
 (回答) *SPI* 単独の *ITGA6* と *ITGB1* を制御機構について今回の研究では調べていない。*SPI* をノックアウトするとさらに *ITGA6* と *ITGB1* の機能が低下することが考えられる。
- 質問 23) 肝内胆管癌のリスクファクターは肝炎などの炎症が関与するのか。胆管細胞は肝細胞と異なるため、肝炎の影響を全く受けないのか。  
 (回答) 肝内胆管癌は B 型肝炎や C 型肝炎、非アルコール性肝炎などの慢性肝炎がリスクファクターである。最近のゲノム研究で肝内胆管癌の約 3 割は肝細胞由来であると判定され、慢性肝炎のある肝臓に発生した肝内胆管癌は肝細胞由来である可能性があり、肝炎の影響を受けていると考えられる。
- 質問 24) 今回の検討では細胞株と炎症との関連はどうか。  
 (回答) 今回の実験で用いた 2 種類の細胞株は B 型と C 型肝炎の既往のない細胞株を用いた。
- 質問 25) 疫学的に性差は関係あるか。  
 (回答) 国際がん研究機関が発行する Cancer Incidence in Five Continents によれば男性の方が女性に比べて罹患率が高いと報告されているが、国や地域によって男女比の報告はさまざまであり明らかな差はないと考えられる。
- 質問 26) 2 種類の細胞株の特徴は？  
 (回答) 腹水から採取した腹膜播種細胞由来の HuCCT1 と原発巣由来の RBE を用いた。HuCCT1 は腹膜播種由来であるが、上皮細胞様で生着もよく、増殖能がよい。RBE は HuCCT1 に比べると増殖は穏やかで実験の再現性がよかった。
- 質問 27) *miR-29-3p* のほかの組織での発現はどうか。  
 (回答) 多くの癌腫(腎細胞癌や胃癌、前立腺癌など)でも同様に癌部で発現が低下していることが報告されている。また癌だけでなく肝細胞や腎細胞で線維化が亢進している組織では発現低下の報告がある。
- 質問 28) 今回の研究をバイオマーカーとして活かしていくためには今後どのような方法が考えられるか。  
 (回答) 胆汁を含む十二指腸液から採取したエクソソーム内の miRNA の発現量を用いて胆管癌のバイオマーカーとして用いることが可能かもしれない。またインテグリンの発現を血清や十二指腸液で検出できれば今後、バイオマーカーとして活用できる可能性はあると考えられる。
- 質問 29) *miR-29-3p*-family すべて同時に投与した (co-infectant) の実験は行わなかったか。  
 (回答) 今回の実験では行っていない。seed-region が同じであるため、投与量に応じた抑制効果が得られることが予想される。
- 質問 30) 腫瘍の増大などに関与は実際どうか。in vivo の実験で確認はしなかったか。また臨床検体での進行度はどうであったか。  
 (回答) in vivo の実験は今回行っていない。TCGA の肝内胆管癌のデータベースではインテグリンの発現量と進行癌の割合に関して明らかな差は認めなかった。

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。