

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 658 号	学位申請者	永田 俊行
審査委員	主査	大塚 隆生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井上 博雅	副査 金蔵 拓郎
	副査	榎田 英樹	副査 原口 みさ子

主査および副査の5名は、令和4年3月22日、学位申請者 永田 俊行 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) DEC2 の発現が独立した予後因子ではなかったが、検討対象症例や症例数が影響していないか。

(回答) 本研究の免疫染色による蛋白発現解析において、DEC2 の発現は、正常肺と肺腺癌の非浸潤部 (上皮内癌、浸潤癌の lepidic growth pattern)、腫瘍浸潤が気管支壁内に限局している早期肺門部扁平上皮癌で確認されたが、腫瘍の浸潤部ではほとんど認めないことを示した。この結果から、DEC2 は非浸潤癌から浸潤癌への悪性化進展に関与し、浸潤化にともない減少することが強く示唆され、adenocarcinoma in situ (AIS) や lepidic predominant adenocarcinoma の症例が検討により多く含まれば、予後解析でも DEC2 発現が独立した予後因子となることは十分に考えられる。

質問2) NSCLC や adenocarcinoma では OS で差があるが、独立した予後因子にはなっていない。臨床バイオマーカーとして利用できるのか。

(回答) 病理上 AIS は画像上の pure GGN に相当し、pure GGN の 15% が浸潤癌へ移行するとの報告がある (Kakinuma R et al. J Thorac Oncol. 2016)。本研究の免疫染色で DEC2 の発現は AIS 症例に多く確認されたが、発現していない症例もあった。AIS 症例に絞り検討を加える必要があるが、非浸潤癌から浸潤癌への悪性化に関与している可能性は十分にあり、バイオマーカーになり得る。

質問3) DEC2 の免疫染色は、非浸潤部 (lepidic growth pattern) の染色陽性が多く、浸潤部はほとんど認めない結果であったが、lepidic の中で予後との相関はあるのか。

(回答) 肺癌取り扱い規約第8版は2011年に発表された IASLC/ATS/ERS の腺癌分類が導入された。この分類の最も大きな特徴は非浸潤癌と浸潤癌の明確化であり、浸潤癌の中でも lepidic predominant adenocarcinoma は予後良好と報告されている (Travis WD et al. J Thorac Oncol. 2016)。

質問4) Fig1 の in silico 解析において、high 群と low 群の分け方はどのように設定したのか。

(回答) カットオフポイントを、中央値、80%未満・20%以上、20%未満 (100例)・80%以上 (400例) で検討したところ、20%未満 (100例)、80%以上 (400例) でより低く有意な P 値 (P=0.0111) が得られたため、最適なカットオフポイントとして高発現群と低発現群に分けた。

質問5) Fig1 の扁平上皮癌において有意差はついていないが予後が逆転しているのはどの様に解釈しているか。

(回答) 自験例では、肺扁平上皮癌 43 例中 DEC2 陽性例 2 例 (4.7%) であったが、早期肺門部肺扁平上皮癌 18 例の追加検討から、肺扁平上皮癌も肺腺癌と同様に DEC2 が非浸潤癌から浸潤癌への悪

## 最終試験の結果の要旨

性化進展に関与し、浸潤化にともなって早期に減少することを確認した。TCGA のデータには蛋白質の陽性症例にあたる早期肺扁平上皮癌はほぼ含まれていないと考えられるので、腫瘍細胞でも DEC2 の発現はほぼないと推測できる。DEC2 はリンパ球でも発現するため、腫瘍浸潤リンパ球の影響を受けている可能性はある。

質問 6) DEC2 の過剰発現で細胞増殖能やその他の蛋白質の発現の有無等を見ているが、siRNA でノックダウンすると逆の結果になるのか。

(回答) DEC2 の発現は癌の種類や細胞株によって異なり、またその作用も腫瘍に対して促進的に働くものや抑制的に働くものまで報告がある。DEC2 の発現が低い肺癌細胞株に siRNA を導入しても効果が限定的であると考えて、DEC2 遺伝子発現をノックダウンすることは本研究では検討していないが、発現の高い細胞では逆の結果となる可能性はある。

質問 7) 浸潤部で DEC2 の発現が低下するメカニズムは? DEC2 の発現が低下したから浸潤性を獲得したのか、浸潤癌で結果として消えたのか。

(回答) DEC2 の発現低下によって浸潤性が促進したと予想している。DEC2 が減少する機構が重要であり、今後の検討課題である。

質問 8) DEC2 と EMT の関係は。

(回答) 本研究では検討していないが、子宮内膜癌で DEC2 が TWIST1 の発現を抑制し、EMT を抑制すると報告 (Asanoma K et al. Molecular and Cellular Biology. 2015) があり、肺癌でも関連する可能性はある。

質問 9) 細胞増殖を検討するのであれば、MTT assay では不十分ではないか。

(回答) 今回はオートファジー細胞死に注目して評価しており、増殖抑制的に機能しているかは解析しなかった。細胞周期やプロモデオキシウリジンの取り込み等を今後行いたい。

質問 10) DEC2 の発現による増殖抑制にアポトーシスが大きくは関与していないとの結果であるが、フローサイトメトリーは行ったのか。細胞周期、cyclinD1 との関連があるとの報告があるが。

(回答) フローサイトメトリーによる検討を行ったが、DEC2 の発現誘導で subG1 の増加は見られなかった。また、グリオブラストーマ U87 および U251 細胞株を用いて DEC2 発現状況による細胞機能の変化を、ウェスタンブロット解析、軟寒天コロニー形成アッセイ、CCK8 アッセイ、フローサイトメトリーなどで評価した検討において、DEC2 の過剰発現が神経膠腫細胞の増殖とコロニー形成を促進すること、ノックダウンでこれらのパラメータ全てに逆効果となったこと、DEC2 が cyclinD1、D3、E1 の発現を上昇させ、これらのサイクリンのアップレギュレーションにより G1 期から S 期、G2 期への相転移を促進させること、DEC2 がアポトーシスに影響を与えなかったことが報告されている (Chen W et al. Cancer Management and Research. 2019)。DEC2 が腫瘍に対して促進的に働いており、自験例や肺癌報告例の抑制系とは逆の結果であった。

質問 11) DEC2 のターゲット gene は何か。

(回答) 本研究では報告していないが、DEC2 は MYC と同じ E-BOX 配列に結合する。我々は BAX プロモーターの MYC 結合領域に作用すること、DEC2 の発現はこれまで知られている複数の MYC 制御性の遺伝子発現を抑制することを見出している。

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。