

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 607 号		学位申請者	谷川 健悟	
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学) 歯学・学術	
	副査	榎田 英樹	副査	大塚 隆生	
	副査	奥野 浩行	副査	上田 和弘	
<p>主査および副査の5名は、令和5年1月18日、学位申請者 谷川 健悟 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。</p> <p>質問 1) Figure 2D で miR-30a-5p と比較して miR-30a-3p の発現が低下しているが、PCR における Ct 値の違いを述べよ。 (回答) Ct 値は平均値で miR-30a-5p が 25.41、miR-30a-3p が 29.66 であった。</p> <p>質問 2) Figure 2B で miR-30b、miR-30c、miR-30d、miR-30e の発現は低下していたか述べよ。 (回答) log₂ (fold change) 値で miR-30b-5p は -1.35217、miR-30b-3p は 0.26909、miR-30c-5p は -1.968688、miR-30c-1-3p は 0.145405、miR-30c-2-3p は -1.49217、miR-30d-5p は -0.76482、miR-30d-3p は -0.68984、miR-30e-5p は 0.482232、miR-30e-3p は -0.52112 であり、発現は低下傾向であった。</p> <p>質問 3) miR-30a-5p と miR-30a-3p の両方が制御する遺伝子の探索を行ったか述べよ。 (回答) 今回の研究で miR-30a-5p と miR-30a-3p の両方が制御する遺伝子の検証は行わなかった。TargetScanHuman 8.0 のデータベースから miR-30a-5p と miR-30a-3p の両方により制御される候補遺伝子は 892 遺伝子あった。892 遺伝子の内、小細胞肺癌の遺伝子発現解析データ GSE162102 で発現が上昇していた遺伝子は 527 遺伝子であり、これらは miR-30a-5p と miR-30a-3p の両方が制御する癌遺伝子候補と考えられる。</p> <p>質問 4) アポトーシスの実験以外に細胞増殖能や浸潤能などの実験を行ったか述べよ。 (回答) 細胞増殖能 (Figure 3A, Figure 6A) と遊走能 (Figure S1, Figure S4) の評価を行い、miR-30a および DONSON の siRNA の核酸導入で増殖能の抑制、miR-30a-3p および DONSON の siRNA の核酸導入で遊走能の抑制を確認した。浸潤能に関しては H82 が浮遊細胞であり、接着細胞の SBC-3 は浸潤能に乏しかったため実験を行わなかった。</p> <p>質問 5) DONSON と予後に関連があるか述べよ。 (回答) 検索した範囲内で小細胞肺癌と DONSON の予後に関連する報告はみつけられなかった。腎透明細胞癌では DONSON の発現上昇と予後不良との関連が報告されている (Transl Oncol 2020; 13: 100844)。</p> <p>質問 6) DONSON の過剰発現の実験を行ったか述べよ。 (回答) 今回の実験では過剰発現の実験は行わなかった。乳癌の細胞株に DONSON を過剰発現させることで増殖能と遊走能の亢進、アポトーシスの抑制が報告されている (J Breast Cancer 2022; 25: 327)。</p> <p>質問 7) パッセンジャー鎖とガイド鎖の発現が異なる原因を述べよ。 (回答) 2 本鎖の microRNA (miRNA) が Argonaut 2 (Ago 2) に取り込まれた際に、2 本鎖の両端の内 5'末端が熱力学的安定性の低い不安定な側の鎖、あるいは 5'末端が U または A である側の鎖がガイド鎖として Ago 2 に残存しやすく、もう一方の鎖のパッセンジャー鎖は Ago 2 タンパク質より取り除かれて分解されるため発現が異なると考えられている。</p> <p>質問 8) 小細胞肺癌で miR-30a の発現が低下しているが、miRNA 生合成のどの過程において miRNA の発現が低下するのか述べよ。 (回答) 染色体異常、エピジェネティック異常、転写レベルでの変化に加え、miRNA プロセシングに関わるドローシャやダイサーの発現変化、核外輸送を担うエクスポートチン 5 の遺伝子変異などが miRNA の発現に関わっている。小細胞肺癌では EZH2 が過剰発現しているという報告 (PloS One 2013; 8: e71670) があり、エピジェネティック制御が miRNA の発現に関わっている可能性が考えられ、今後の検証が必要である。</p> <p>質問 9) シナプトフィジンは一般的に肺癌で染まるのか述べよ。 (回答) 肺癌において神経内分泌癌に該当する小細胞肺癌や大細胞神経内分泌癌ではシナプトフィジンに染色されることが多い。肺腺癌や肺扁平上皮癌では一般的に染色されない。</p> <p>質問 10) Figure 3B で miR-30a-5p はアポトーシスを誘導しているのか述べよ。 (回答) 反復した実験で統計学的に有意差があり、アポトーシスに関与していると考えられる。直腸結腸癌において miR-30a-5p が HSPA5 を制御し、アポトーシスに関連していたと報告されている (Int J Mol Sci 2020; 21: 7315)。</p>					

最終試験の結果の要旨

(697)

質問 11) 細胞周期を解析する際の細胞数を述べよ。また、細胞周期の解析で *miR-30a-3p* や *DONSON* の siRNA で G₂/M と subG₁ に影響した理由を述べよ。

(回答) 細胞周期の解析の細胞数は 1 回の解析当たり 1 万個で行った。*DONSON* は S 期と G₂/M 期のチェックポイントを活性化する働きが報告されており (*Nat Genet* 2017; 49: 537)、*DONSON* の機能を抑制することで G₂/M 期の細胞の割合が増加したと考えられた。subG₁ の細胞が増加した原因としてはアポトーシスが誘導された影響が推察された。

質問 12) シスプラチニンと *miR-30a-3p* を同時に投与したらどうなるのか述べよ。

(回答) 予備実験で小細胞肺癌の細胞株にシスプラチニンと *miR-30a-3p* を同時に投与することで、アポトーシス細胞の増加がみられており、相加的あるいは相乗的な抗腫瘍効果が期待できる可能性がある。

質問 13) 今回の実験は薬剤により誘導されるアポトーシスであり、ミトコンドリアが関連していると考えられるが、p53 と caspase 9 の発現を確認したか述べよ。

(回答) 今回の実験では p53 と caspase 9 の発現の確認は行わなかった。検索した範囲内で *miR-30a-3p* や *DONSON* が p53 や caspase 9 の発現に影響する報告はみつけられなかつたが、*DONSON* をノックダウンすることで BCL-2 の発現が低下し、BAX の発現が上昇したという報告があることから (*J Breast Cancer* 2022; 25: 327)、ミトコンドリアが関連していると考えられる。

質問 14) *DONSON* の局在と機能を述べよ。

DONSON の局在は細胞質と考えられる。*DONSON* は DNA 植製、細胞周期、アポトーシス、EMT に関わっていることが報告されている (*Nat Genet* 2017; 49: 537, *J Breast Cancer* 2022; 25: 327)。

質問 15) ミトコンドリアに *DONSON* の蛋白質の発現があるか述べよ。

検索した範囲内でミトコンドリアに *DONSON* の蛋白質の発現がある報告はみつけられなかつた。

質問 16) Figure 2D で miRNA PCR に使用した臨床検体の採取方法について述べよ。

(回答) 外科切除 6 例、病理解剖 4 例、胸水セルブロック 2 例の 21 検体を使用して解析した。

質問 17) *miR-30a* の発現が低い細胞株を選んだのか述べよ。

(回答) 当科で所有している小細胞肺癌の細胞株の H82 および SBC-3 において RT-qPCR を行い、*miR-30a-5p* および *miR-30a-3p* の発現が低いことを確認して実験を行つた。

質問 18) 細胞株は薬剤耐性株を使用したか述べよ。

(回答) 今回の実験では薬剤耐性株は使用せず、購入した状態のままの細胞株 (H82, SBC-3) を使用した。

質問 19) パッセンジャー鎖の *miR-30a-3p* もガイド鎖と同じように Ago 2 に取り込まれるか述べよ。

(回答) ガイド鎖と比較して取り込まれる割合は低いが、パッセンジャー鎖の *miR-30a-3p* も Ago 2 に取り込まれる。小細胞肺癌の細胞株でも抗ヒト Ago2 抗体による免疫沈降法で取り込まれることを確認している。

質問 20) 今回の研究で治療前と治療後で *miR-30a* の発現の違いを確認したか述べよ。

(回答) 今回の研究では治療前と治療後で *miR-30a* の発現の違いは評価できなかつた。検索した範囲内で小細胞肺癌における治療前後の *miR-30a* の発現の違いを報告したものはみつけられなかつた。

質問 21) *miR-30a* の発現低下が判明している細胞株をどのように選択してきたのか述べよ。

(回答) 小細胞肺癌の細胞株の H82 および SBC-3 において miRNA の RT-qPCR を行い、*miR-30a* の発現が低いことを確認して実験を行つた。

質問 22) 細胞株で *miR-30a* の発現が高い場合にはどのように実験を進めたのか述べよ。

(回答) H82, SBC-3 以外の小細胞肺癌の細胞株で *miR-30a-3p* の発現を確認し、低下している細胞株がなければ、ガイド鎖とパッセンジャー鎖の両方が低下していた *miR-34b*, *miR-34c*, *miR-223*, *miR-4529* を標的とする予定としていた。

質問 23) Figure 2D の相関図はどのように解釈するのか述べよ。

(回答) ガイド鎖の *miR-30a-5p* と相関してパッセンジャー鎖の *miR-30a-3p* の発現が増加しており、本来分解されるパッセンジャー鎖が一定数分解されずに Ago 2 に取り込まれ、miRNA として機能している可能性があると考えられる。

質問 24) 小細胞肺癌では性差があるか述べよ。

(回答) 小細胞肺癌の発症者は大多数が喫煙者であり、日本では男性に多い。

質問 25) *DONSON* はどの染色体にあるか述べよ。

(回答) 21 番染色体長腕 (21q22.11) に位置する。

質問 26) 今回特定された 25 個の遺伝子で Y 染色体上にある遺伝子があるか述べよ。

(回答) 今回特定された 25 個の遺伝子で Y 染色体上にあるものはみられなかつた。

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。