

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 700 号	学位申請者	平島忠寛
審査委員	主査	橋口 照人	学位
	副査	谷本 昭英	副査
	副査	榎田 英樹	副査
			博士 (医学)
			井上 博雅
			東 美智代

主査および副査の5名は、令和5年1月31日、学位申請者 平島 忠寛 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) non-coding RNA は microRNA 以外にどのようなタイプがあるか。

(回答) non-coding RNA には、microRNA 以外に、転移 RNA (tRNA)、リボソーム RNA (rRNA)、核内低分子 RNA (snRNA)、核小体低分子 RNA (snoRNA)、シグナル認識複合体 RNA (SRP RNA) などがあり、転写、RNA processing、RNA 分解、翻訳などの遺伝子発現のさまざまな段階に影響を与えることが知られている。

質問2) 使用した3種類のヒト乳癌細胞株の遺伝子 type のチェックは行ったか。

(回答) 今回の解析では、使用した3種類の細胞株について、遺伝子 type については調べていない。使用した細胞株は、2020年の論文作成のための実験 (Toda et al., Mol Oncol. 2020 Feb;14(2):426-446.) で、American Type Culture Collection から購入した細胞株を使用した。

質問3) siRNA を用いて FAM64A 発現抑制の効果をウエスタンブロッティングで確認できたか。

(回答) 今回の解析では、ウエスタンブロッティングは行っていない。その理由は、2種類の抗体を使用したのが、いずれも明確なバンドが検出できなかったためである。

質問4) エンリッチメント解析で細胞周期に影響があることが予想されたが、古典的な方法で実際に確認したか。G2M チェックポイントを制御する遺伝子に影響することは言えるが実際に細胞周期に影響があったと言えるか。

(回答) FAM64A の発現異常が細胞周期に影響を与えるか証明する実験を行っていない。FAM64A を過剰発現、または、ノックダウンした細胞株を用いて細胞周期の解析を行う必要があるが、当研究期間内に細胞周期の解析を行う手技を確立することができなかった。

質問5) どのように FAM64A がどのタンパクを阻害して細胞周期に関連しているのか。

FAM64A がどのような細胞周期関連遺伝子 (蛋白) に作用して、細胞周期に影響を与えているか、十分に解析していない。今後、FAM64A をノックダウンさせた細胞株における網羅的な遺伝子発現解析を行い、FAM64A の発現が影響を及ぼしている遺伝子を探索する予定である。

質問6) 乳癌組織で抑制されていた miRNA で miR-139, miR-144 もガイド鎖、パッセンジャー鎖が抑制されていたが、なぜ miR-99a に注目したのか。

(回答) TCGA (The Cancer Genome Atlas) 解析から、乳癌患者において、miR-99a-5p および miR-99a-3p の発現が、癌組織において顕著に抑制されていたため、これらのマイクロ RNA から機能解析を行うことにした。今後、miR-139 と miR-144 についても解析を行う予定である。

質問7) Table1 で miR-99a-5p と miR-99a-3p で抑制されていた遺伝子が複数あるが FAM64A のみが共通だったのか。

(回答) 今回の解析 (Table 1) では、miR-99a-5p 標的分子と miR-99a-3p 標的分子について、共通する分子は、FAM64A のみであった。

質問8) 臨床的な subtype において FAM64A の発現に差異はあるのか。

(回答) 実際の臨床検体でのサブタイプ別の FAM64A 発現は確認はしていない。TCGA データベース上のサブタイプ別の発現は LuminalB, HER2, TN のサブタイプで発現が上昇していた。

質問9) Fig2 の 4A と 4B の Kaplan-Meier 解析で症例数がグラフ毎に違うのはなぜか。

(回答) TCGA のデータでは、遺伝子によっては発現データが得られていない患者が存在するため、遺伝子ごとに患者数に若干の違いが生じる。

質問10) FAM64A 高発現の方が予後が良かったという結果だったが、CDK4/6 阻害薬の効果が良かったと考える理由は。また、それを証明するにはどのようにするか。

(回答) FAM64A 高発現の患者は、細胞周期関連遺伝子 (蛋白) の異常により細胞周期の活性が亢進していると予想される。そのため、細胞周期関連蛋白である CDK4/6 阻害薬が著効したため、効果が得られたと考える。このことを実験的に証明するためには、FAM64A を過剰発現、または、ノックダウンした細胞株を用いて、CDK4/6 阻害薬の効果を調べる必要がある。

質問11) 従来 miR-99a-5p がガイド鎖、miR-99a-3p がパッセンジャー鎖だが、乳癌においてはどちらもガイド鎖ということでもいいのか。また実際に行った PCR で CT 値はどの程度だったか。

(回答) miRBase によると miR-99a-5p がガイド鎖、miR-99a-3p がパッセンジャー鎖となっている。実際に行った PCR は、コントロールとして RNU48 を用いて、RNU48 の CT 値は 26~28、miR-99a-5p の CT 値 30~32、miR-99a-3p の CT 値は 35~37 であった。

最終試験の結果の要旨

(700)

質問 1 2) TCGA データベース上で 2 つの miRNA の発現の高低で乳癌において差はでているのか。

(回答) TCGA 上の発現での予後は *miR-99a-5p* の高発現群が低発現群に比べ 10 年生存率が高いという結果だった ($p=0.0002$)。 *miR-99a-3p* においては発現による有意差は認めなかった ($p=0.1608$)。

質問 1 3) TNM 分類と *FAM64A* の発現に相関はあるか。

(回答) TCGA データベース上で、TNM 分類による Stage と *FAM64A* 発現の相関を確認したが明らかな有意差を認めなかった ($p=0.1627$)。

質問 1 4) *SIFAM64A* を用いた細胞機能解析で細胞遊走能、細胞浸潤能解析で有意差を認めることから EMT も関連していると思われるが、エンリッチメント解析では EMT との関連が低いという結果であり矛盾していると思われるが、どのように解釈するか。

(回答) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析結果と機能解析 (遊走能、浸潤能) 結果が一致しない理由を明確に答えることができない。*FAM64A* ノックダウン細胞では、細胞の増殖に大きな影響を与えたため、見かけ上、癌細胞の遊走能、浸潤能が抑制された結果になった可能性がある。

質問 1 5) CDK4/6 阻害薬は市販されているのか。どのような患者に使用されているのか。 *FAM64A* の高発現の Triple Negative 乳癌患者に使用するアイデアはどうか。 ER(-)だと *FAM64A* の発現が低下していると言えるのか。

(回答) CDK4/6 阻害薬は、パルボシクリブ、アペマシクリブがホルモン受容体陽性、HER2 陰性の手術不能または再発乳癌に適応があり、パルボシクリブは 2017 年 12 月から、アペマシクリブは 2018 年 11 月から保険適応となっています。CDK4/6 阻害薬が著効する患者を選別し、治療効果を上げることは、分子標的薬の使用にあたり重要な課題と考える。現在は、エストロゲン受容体を介したシグナル経路により、CDK4/6 の活性化が起こるという前提に基づき、治療患者の選別を行っている。しかしながら、CDK4/6 阻害薬に関して、有用なマーカーが存在しない現状がある。*FAM64A* を含め、CDK4/6 阻害薬を使用する患者の選別のためにマーカー分子の探索は重要な課題であると考える。

質問 1 6) *FAM64A* が乳癌組織での悪性度が高い組織で高発現となっているが、悪性度が高い組織とは組織型かサブタイプか。どのタイプで発現が高いのか。また、組織型による差はあったのか。

(回答) 今回の評価はサブタイプ別で行い、予後が不良である luminal B, HER2(+), TN 乳癌での発現が高値であった。また、組織型での評価は行っていない。

質問 1 7) CDK4/6 阻害薬を使うにあたって ER(+)でないと効果はないのか。

(回答) 現時点では、エストロゲン受容体を介したシグナル経路により、CDK4/6 の活性化が起こるという前提に基づき、ER(+)の患者が、CDK4/6 阻害薬の適応になっている。ER(+)の患者の中にも、CDK4/6 阻害薬が著効する患者、しない患者が存在する。ER の発現以外に CDK4/6 阻害薬を使用する患者の選別のためにマーカー分子が必要と考える。

質問 1 8) 免疫染色の評価方法と組織中央部とはどこを指すのか。

(回答) 染色プレパラートの細胞数が多い代表部位での評価を行った。評価方法は 2019 年の論文 (Jiang L, et al., EBioMedicine, 2019;43:188-200.) での評価方法と同様の方法で評価した。腫瘍細胞の割合を 0 (陽性腫瘍細胞なし), 1 (0-10%陽性), 2 (10-50%陽性), 3 (50%以上陽性) としてスコア化し、染色強度を 0 (染色なし), 1 (弱染色=淡黄色), 2 (中東度染色=黄褐色), 3 (強染色=褐色) とし、陽性腫瘍細胞の染色強度スコア比として計算し染色指数 (SI) を算出した。

質問 1 9) *miR-99a*, *FAM64A* で乳がんは予後の制御を受けていることと、乳がんの生物活性の意味づけは関係があるのか。

(回答) 1 種類のマイクロ RNA は多数の遺伝子の発現を制御している。また、1 種類の遺伝子は多数のマイクロ RNA によってその発現を制御されている。*miR-99a/FAM64A* の発現制御機構が乳癌の進展や悪性化に影響を与えていることは明らかであるが、程度は分からない。*FAM64A* の過剰発現が、乳癌細胞のどの様な分子経路に影響を与えているか、今後の解析課題である。

質問 2 0) Fig4.E でゲノム不安定性と *FAM64A* の乳癌の悪性度における関連はどう考えるか。

(回答) *FAM64A* 高発現患者では、細胞周期の活性化が起こると推定される。そのため、DNA の複製エラーや DNA 修復が十分でない細胞が蓄積されることにより、ゲノムの不安定がおこり、悪性化に関与していると考えられる。

質問 2 1) *pre-miR-99a* から 133 の遺伝子が同定され、さらに 16 の遺伝子が予後に影響していることが示されたが、*TRIM25* 等の分子間の関係が論文で報告されているか。

(回答) 今回の解析では、癌抑制型マイクロ RNA である *miR-99a-5p* および *miR-99a-3p* に着目し、これらマイクロ RNA が制御する遺伝子の探索を行った。その中で、16 種類の遺伝子は、乳癌患者の予後に影響を与えていた。これら遺伝子 (蛋白) が、それぞれどのような関連を持って乳癌細胞で機能しているか、本研究では調べていない。まずは、それぞれの機能解析を行い、乳癌における役割を調べていく予定である。遺伝子 (蛋白) 間の相互作用を網羅的に調べることは、生命科学の研究に重要な課題である。選択された遺伝子 (蛋白) の相互作用を調べる戦略について検討を重ねていきたいと考える。

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。