

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 903 号	学位申請者	安留 龍太郎
審査委員	主査	上野 真一	学位 博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	井上 博雅	副査 榎田 英樹
	副査	水野 圭子	副査 山田 保俊
<p>主査および副査の5名は、令和5年3月29日、学位申請者 安留 龍太郎 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) 本研究で <i>miR-139</i> を解析対象として選択した理由はなにか。  (回答) 当科 miRNA 発現プロファイルにおいて、発現抑制されている miRNA のうち guide 鎖 / passenger 鎖両方が挙がってきた 16 ペアの中で、未だ報告のないものうち最も発現が低下していた <i>miR-139-5p / -3p</i> を選択した。</p> <p>質問 2) <i>miR-139-5p</i> が解析対象として選択されなかった理由はなにか。  (回答) 大腸癌細胞株を用いた機能解析で、<i>miR-139-3p</i> がより強い腫瘍抑制効果を呈していたためである。</p> <p>質問 3) <i>miR-139-5p / -3p</i> の実際の発現量を加味した核酸導入の実験系を組んだのか。  (回答) 本研究では大腸癌組織における実際の発現量を考慮した核酸導入は行なっていない。実際の発現量より十分多い量のプレカーサーを核酸導入する実験系を組んだ。</p> <p>質問 4) 今回使用した大腸癌細胞株の特性を述べよ。また、他の大腸癌細胞株において KRT80、AKT、KRT80 siRNA 導入による p-AKT の発現はそれぞれどうなっていたか。  (回答) HCT116 は大腸癌原発巣由来、DLD-1 は大腸癌リンパ節転移巣由来の大腸癌細胞株である。本研究では細胞株ごとの KRT80、AKT の発現量の検討は行なっていない。HCT116 は p-AKT の発現量が他の大腸癌細胞株と比べて低いとする報告もあったが、WB 法によって <i>miR-139-3p / KRT80 siRNA</i> 核酸導入による p-AKT の蛋白発現を確認することができたため、本研究ではすべての実験を前述の2種類の細胞株で行った。</p> <p>質問 5) 正常組織における KRT80 の部位別発現量はどうか。KRT80 を治療対象とした際に起こりうる有害事象とその対策はどのように想定しているか。  (回答) 皮膚で非常に多く発現していることが The Human Protein Atlas で確認できる。大腸癌に適応のある EGFR 阻害薬：パニツムマブも皮膚障害の副反応の多い薬剤だが、皮膚保護剤の併用で対応できており、KRT80 阻害により出現が予想される皮膚障害も対応できる可能性がある。</p> <p>質問 6) KRT80 の切除組織における発現確認として免疫染色を提示しているが、in situ hybridization (ISH) で <i>miR-139-3p</i> の発現と KRT80 の発現の相関を確認したか。  (回答) 本研究では行っていない。パラフィン切片より抽出した RNA を用いて、RT-qPCR 法により <i>miR-139-3p</i> と KRT80 の発現に負の相関を確認した。</p> <p>質問 7) AKT 解析で <i>miR-139-3p</i>、KRT80 siRNA TF による WB を提示したが、apoptosis assay や cell cycle assay は行ったか。  (回答) 本研究では両 assay は行っていない。</p> <p>質問 8) KRT80 が浸潤能、遊走能の制御に強く関連すると述べたが、下流遺伝子中に EMT 関連遺伝子は見られたか。  (回答) KRT80 siRNA TF 細胞株より抽出した RNA をアレイ解析に提出し、発現抑制されている分子を検索した。その中には SMAD4、SMAD13 が含まれており、TGF-<math>\beta</math> / SMAD pathway との関連が示唆された。</p> <p>質問 9) HK2 の制御にも話が及んでいるが、腫瘍細胞における hypoxia との関連が報告されている分子でもある。大腸癌においても腫瘍発育の過程で hypoxia による内部崩壊は起こるか。  (回答) 大腸癌が管腔臓器に発生する腺癌であることから指摘のような内部崩壊、中心性壊死は起こりにくいと考えられる。医中誌でも中心性壊死を伴う直腸平滑筋肉腫の症例報告を2例認めるのみであった。</p> <p>質問 10) 研究のまとめの図で KRT80 は HK2 を抑制するとなっているが、促進ではないのか。  (回答) 促進である。</p> <p>質問 11) KRT80 の細胞内局在はどうか。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

( 763 )

(回答) KRT80 は細胞の分化に関与し、分化の初期にはデスモソームの近くに局在するが、分化が終った細胞では細胞質全体に分散する。

質問 12) KRT80 は typeII ケラチンとのことだが、他の typeII ケラチンと腫瘍制御の関連はどうか。

(回答) 54 種類あるケラチンのうち 26 種類が typeII ケラチンに分類され、不明な点も多いが、KRT5/7/8 に関しては報告が多く、KRT5 と卵巣癌・非小細胞性肺癌・前立腺癌、KRT7 と乳癌・卵巣癌、KRT8 と胃癌・肺腺癌の関係の報告がある。

質問 13) KRT80 を候補に選んだ理由はなにか。他に候補となる分子はあるか。

(回答) 正常大腸組織でほとんど発現がなく、大腸癌組織でのみ発現が上昇しており、治療対象とした際に正常組織への影響を最小限にすることが期待でき、標的分子として望ましかった。KLK6 もケラチン関連分子であり候補として挙がる。

質問 14) GEPIA2 とはどのようなデータベースか。

(回答) TCGA 及び GTEx の 2 つのデータベースより臓器別の癌組織と正常組織における対象 mRNA の発現を抽出できるプラットフォームである。

質問 15) miR-139-5p/-3p を同時に核酸導入した場合どのようなことが予想されるか。

(回答) miR-139-5p/-3p を本研究のように十分量投与すれば、より強い腫瘍抑制効果が観察されると予想する。pri-miRNA の状態で投与すれば、実際の癌組織での発現比率に近い形で miR-139-5p/-3p が発現することが予想される。

質問 16) ステージごとで miR-139-3p の発現量は変わるか。

(回答) 本研究ではその検討は行っていない。

質問 17) 潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患と miR-139-3p の関連は検討したか。

(回答) 本研究では検討しておらず、また文献上も miR-139-3p と炎症性腸疾患との関連は確認できなかった。腫瘍促進型 miRNA として知られる miR-21 においては炎症関連の発癌を促進する可能性がある、との報告があった。

質問 18) 腸内細菌叢と大腸癌発癌について、miR-139-3p との関連は検討したか。

(回答) 本研究では行っていない。また文献上も miR-139-3p と腸内細菌叢の大腸癌発癌への影響は確認できなかった。Fusobacterium Nucleatum が大腸癌発癌に関連しており、F.Nucleatum 感染により miR-21 の発現が上昇、腫瘍抑制遺伝子である RAS1 の発現が低下し、腫瘍促進に働くとする報告がある。

質問 19) 2 種類の大腸癌細胞株の選択の理由はなにか。

(回答) HCT116, DLD-1 とともに増殖速度が早く、実験系の構築に有用であったため選択した。

質問 20) 直腸癌が結腸癌より予後が悪いのは何故か。

(回答) 下部直腸は漿膜を持たないため周囲組織へがりがやすい可能性がある、直腸が骨盤内深い部位に位置し手術難度が高い(側方リンパ節郭清等)、StageI 治癒切除例の再発率や肺転移再発、吻合部再発が結腸癌に比べて多いことなどが予後に影響を与えている可能性があると考えられる。

質問 21) StageIV 大腸癌において転移巣によって予後に差があるか。

(回答) 同時多発再発等もあり、転移巣ごとの予後の考察は困難だが、転移巣の切除が可能かという点が StageIV 大腸癌の予後に影響する。

質問 22) KRT80 は大腸癌では予後に差がないとのことだが、他癌種ではどうか。

(回答) TCGA データベースによると、肺腺癌、子宮体癌、皮膚黒色腫、淡明細胞型腎細胞癌で 5 年生存率に差がある。

質問 23) miR-139-3p は KRT80 だけでなく、HK2 も直接制御ということだが、HK2 は AKT pathway を活性化するか。

(回答) HK2 が AKT pathway を活性化するか、AKT のリン酸化を制御するかは本研究では明らかにできなかったが、p-AKT が HK2 をリン酸化し細胞質からミトコンドリアへ局在を変化させ、ミトコンドリア依存性の細胞死を回避することが知られている。

質問 24) K-RAS 変異型と野生型で miR-139-3p の作用は異なるか。K-RAS や AKT などのドライバー遺伝子に対する miRNA の関与はどうか。

(回答) K-RAS を含め、特定の遺伝子変異の有無の状況下での miR-139-3p の発現量の検討は行っていない。今回 KRT80 が AKT のリン酸化を制御することが明らかになったように、ドライバー遺伝子の制御に miRNA 及びそれによって制御される分子が関わっている可能性はある。今後はドライバー遺伝子の変異を加味した miR 発現プロファイルを作成し解析することによって、更なる研究の発展が期待できる。

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。