

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 785 号	学位申請者	満枝 怜子	
審査委員	主査	榎田 英樹	学位	博士 (医学)
	副査	家入 里志	副査	上田 和弘
	副査	山田 保俊	副査	田中 謙太郎

主査および副査の5名は、令和7年2月5日、学位申請者 満枝 怜子 さんに面接し、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) 乳癌の疫学の人種差や先進国と途上国の違いについて述べよ。

(回答) 欧米女性の乳癌は年齢を重ねるごとに発症数が増えるが、アジア人女性の乳癌は若年で発症する特徴がある。また、アフリカ系アメリカ人女性に TNBC が多い。開発途上国では半数以上がステージ 4 で診断されている現状がある。今後、発展途上国においても食生活の欧米化が進み、出産数が減れば乳癌の発症数は増えると予想される。

質問 2) アジア人の TNBC の細胞株の中に研究で使えるものはあるのか。

(回答) 36 歳のイラン人女性より確立された Parl-ICR が存在するが、国内で使用できる環境は整っていない。

質問 3) *miR-30a-3p* を研究対象としなかった理由を述べよ。

(回答) *miR-30a-3p* についても研究対象として、論文報告をした。(Noncoding RNA, 2024 Nov 30;10(6):60.)

質問 4) 乳癌において heterogeneity があるのか、miR の発現は部位や細胞レベルで異なるか述べよ。

(回答) 乳癌でも heterogeneity はある。miRNA 発現は in situ hybridization で確認できるが今回は施行していない。

質問 5) *miR-30c-3p* の機能の傾向はこれまで研究グループで報告してきた他癌種での研究結果と同じか。

(回答) 今回の報告と同様、膀胱癌において *miR-30c-2-3p* は癌抑制型 miRNA であることは確認をしている。

質問 6) in vivo 実験はしていないのか。

(回答) 固形癌で in vivo 実験が重要であることは確かだが、当科では行っていない。

質問 7) ガイド鎖とパッセンジャー鎖は共に RISC に取り込まれ同様の働きをするという理解でいいのか。

(回答) *miR-30c-1-3p*, *miR-30c-2-3p* は共に配列依存的に *TRIP13* と結合し、RISC に取り込まれ *TRIP13* の発現を抑制することを確認したことから、パッセンジャー鎖もガイド鎖と同様に RISC に取り込まれ同様の働きをすると考えられる。

質問 8) 細胞株により浸潤能・遊走能解析の結果が大きく異なるが、細胞株での発現を調べ原因について探索したか。

(回答) 細胞株の miRNA 発現は調べてない。元の発現の違いで差が出た可能性はあるが実験結果との関連は不明である。

質問 9) *TRIP13* はどのような症例で発現が多いと言われているか。

(回答) TNBC や増殖能の高い Luminal B type で、増殖能の低い Luminal A type に比べ発現量が多い結果であった。

質問 10) 早い段階で miRNA の発現低下があれば、早期発見に使える可能性はあるか。

(回答) 元々 miRNA の発現量が非常に少ないため、その発現量の違いで癌の早期発見に繋げることは難しいと思われる。

質問 11) 年齢で乳癌の病理やサブタイプに違いはあるか。

(回答) 若年乳癌は増殖能の高いタイプが多く、高齢乳癌はホルモン受容体陽性の進行が遅いタイプが多い傾向にある。

質問 12) 術後のフォローアップはどのようにしているか。

(回答) 年 1 回のマンモグラフィと問診・視触診によるフォローアップが推奨されている。

質問 13) 遺伝子を扱う研究であったが、倫理的な配慮について説明せよ。

最終試験の結果の要旨

(回答) ヘルシンキ宣言のガイドラインに従い実施され、鹿児島大学倫理委員会の承認を得た(承認番号 160038 28-65)。

質問 14) 他のサブタイプを使った実験はしていないのか。他のサブタイプでも免疫染色した方がいいのではないのか。

(回答) luminal type に対しても一部実験は行なったが、今回は確実な治療法が確立していない TNBC に照準を絞った。

質問 15) 低侵襲で乳癌の miRNA サンプルを取ることはできないのか？

(回答) 母乳中 miRNA を解析する研究は存在するが、授乳期のサンプルで乳癌との関連について検証はされていない。

質問 16) TRIP13 の免疫染色では正常組織でも発現が見られるが、この解釈について述べよ。

(回答) 正常組織でも細胞周期に関与する遺伝子であるため、発現が見られるものと考えられる。

質問 17) miRNA を診断で使うのは難しいのか。

(回答) 発現量がかかなり少ない miRNA であることから、診断に利用することは難しいと考える。

質問 18) TRIP13 の発現で悪性度の程度を測ることや、発現量の違いで治療法が変わることではないのか。

(回答) TRIP13 と悪性度の相関については検証しておらず報告は見られなかった。BRCA1 変異陽性肝細胞癌で TRIP13 が高発現で PARP 阻害薬耐性に関わる報告があり治療に際し留意が必要である。(J Cancer. 2022 Apr 11; 13 (7) : 2226-2237.)

質問 19) 機能解析の結果の差は核酸導入の効率の違いなのではないか。

(回答) TF 効率について今回の研究で確認してはいないが、Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent の導入効率はほぼ 100% との記載があり、これまでの研究結果からもほぼ導入されているものと考えられる。

質問 20) RIP assay の際、miRNA は翻訳の際に結合するという理解で良いか。

(回答) miRNA が RISC に取り込まれ、配列依存的に TRIP13 の mRNA と結合すると考えられる。

質問 21) TRIP13 はどのような機構で REV7 を抑制しているのか。

(回答) TRIP13 は REV7 を不活性化する構造変化をきたし抑制する。(Proc Natl Acad Sci USA. 2020 Nov 10; 117 (45))

質問 22) なぜ miR-30-family に着目したのか。

(回答) 当研究グループでは他癌種で miR-30-family が癌抑制型 miRNA であることを報告してきたが、乳癌に関する検証はこれまでしてこなかった。今回 miR-30-family が標的とする乳癌の癌遺伝子を探索するため研究した。

質問 23) TNBC のプロファイルでは miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p の発現はどうだったのか。

(回答) 有意な発現低下は見られなかった。

質問 24) miRNA, TRIP13 の発現量とステージに相関は見られたのか。発現量はどの数値で区切っているか

(回答) miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p, TRIP13 の発現量とステージを相関分析した結果、相関係数はそれぞれ -0.05, -0.07, -0.002 といずれも明らかな相関は見られなかった。発現量は中央値で区切った。

質問 25) miR-30c-1-3p, miR-30c-2-3p と TRIP13 の発現量は他のサブタイプではどうだったか。

(回答) 少ない症例数の検証ではあるが、miR-30c-1-3p の発現量は Luminal type でやや少なく、miR-30c-2-3p の発現量は HER2 type でやや少ないという結果だった。また、TRIP13 の発現量は Luminal A type で少ない結果だった。

質問 26) TRIP13 は細胞周期に関わる遺伝子だが、フローサイトメトリの実験をしたか。

(回答) フローサイトメーターの実験は行っていないが、今後検討の余地はある。

質問 27) 浸潤能アッセイで差が見られたが、EMT 関連遺伝子と関連はあるのか。

(回答) 肺癌において、TRIP13 の過剰発現により接着因子である E-cadherin が減少し、EMT 関連遺伝子である N-cadherin, Vimentin, Snail が増加するとの報告がある。(J Mol Histol. 2021 Feb; 52 (1) : 11-20.)

質問 28) TRIP13 阻害薬の臨床試験は進行しているか。TRIP13 阻害薬の毒性はどのようなものが考えられるか。

(回答) 現在臨床試験はない。細胞周期の進行を停止させる薬剤であり骨髄抑制や口内炎、脱毛が起る可能性がある。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。