

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 326 号	学位申請者	石原 由香
審査委員	主査	中川 昌之 ()	学位 博士 (医学)
	副査	堂地 勉 ()	副査 橋口 照人 ()
	副査	古川 龍彦 ()	副査 武田 泰生

主査および副査の5名は、平成 27年3月2日、学位申請者 石原 由香 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) CKS2 の免疫染色で、20%を陽性細胞の cut off 値とした根拠は何か。

(回答) 全症例の CKS2 発現の平均が約 20%であったので、20%を cut off 値として用いた。

質問 2) CKS2 の陽性率を他の分類で検討したか。

(回答) 今回は検討していないが、CKS2 発現の cut off 値を変えると差を認める可能性もある。

質問 3) 細胞周期のリズムに合わせて CKS2 の増減はあるのか。

(回答) 細胞が分裂するには 24 時間かかるとされているので、細胞周期が G2 期、M 期で停止した場合と、その他の時期で停止した場合には CKS2 の増減があることも予想される。

質問 4) CKS2 に関して、細胞増殖の下流にあってパラレルに関与する因子はあるのか。

(回答) 今回は CKS2 のみの検討で、下流の因子との相関は検討していない。甲状腺癌細胞株の報告では miR-26a を用いて CKS2 遺伝子の発現を抑制すると、cyclinB1 と cdk1 の発現も抑制されることが示されている。

質問 5) CKS2 ノックダウンで invasion assay などは行ったか。

(回答) CKS2 ノックダウンで invasion assay は行ったが、差が見られなかった。

質問 6) 他の報告において CKS2 と Ki-67 との相関はあるのか。

(回答) CKS2 と逆相関の関係にある miR-26a を導入した甲状腺乳頭癌細胞株をマウスに接種して形成させた腫瘍では導入していない細胞の腫瘍に比べて、Ki-67 発現は減少し、腫瘍の成長が減速したという報告がみられる。

質問 7) 免疫染色の CKS2 陽性所見は腫瘍の中心部と先進部で差があったか。

(回答) CKS2 発現に関して、中心部と先進部での検討は行っていない。今回は tissue array を用いたため、評価した範囲はほとんどが中心部であった。

質問 8) 今回の検討は、すべて術前治療を行っていないサンプルでの検討か。

(回答) 術前に化学療法や放射線療法は行っていないサンプルを用いている。

質問 9) mRNA と蛋白で発現に差があったのは、CKS2 のユビキチネーションによる変化ではないのか。

(回答) CKS2 の働きでユビキチネーションとの関連を示す報告はないが、相同性 81%の CKS1 はユビキチネーションに関与しているという報告がある。mRNA と蛋白発現の異同に関しては様々な因子の関与が考えられる。

質問 10) 本研究の対象は男女を一緒にしたデータか。

(回答) 今回は男女別の検討は行っていない。

質問 11) stage が同じであれば男女間で予後は同じか。

(回答) 今回、stage 別の男女間の予後検討は行っていないが、女性は女性ホルモンの関与や術前心肺機能が良好なことより術後侵襲からの回復が良いと言われている。男性よりも女性の方が予後は良いという報告もある。

質問 12) 卵巣癌での CKS2 発現のデータはあるのか。

(回答) 香港での卵巣癌の網羅的遺伝子発現解析の報告では、卵巣癌部に発現上昇している遺伝子の一つに CKS2 が挙げられ、CKS2CKS2 が高発現していると予後が不良であったとされている。

質問 13) CKS2 (+)と(-)で stage にばらつきはなかったのか。

(回答) Stage I, II よりも III, IV で CKS2 蛋白発現は高くなっていた。

質問 14) CKS2 蛋白発現は多変量解析で予後因子ではなかったが、深達度とリンパ節転移のどちらの因子に影響を及ぼされているか。

(回答) 深達度の Relative risk (CI: confidence Interval)は 1.680, リンパ節転移の CI は 1.639, どちらの因子にも同様に影響を受けていると考えられる。

質問 15) オステオポンチンと CKS2 の相関と予後について検討したのか。

(回答) オステオポンチンとの相関については今回検討していない。今後、是非検討したい。

質問 16) 免疫染色において、negative control として非特異的 IgG ではなく PBS を使ったのはなぜか。

(回答) negative control における非特異的 IgG に対する反応は考慮しないで PBS を使用した。

質問 17) CKS2 は増殖に関わるが、癌では増殖と転移は別々な現象か、それとも一連の現象か。

(回答) 癌は原発巣で増殖し、その癌細胞がリンパ管や血管内に浸潤後、転移を起こし、転移先でまた増殖を始める。多くの消化器癌では一連の現象と考えられる。

質問 18) 非癌部で CKS2mRNA の 0 はどのようなものと考えるか。

(回答) Figure 上 0 に近似しているが、実際発現が全くない症例は無かった。

質問 19) Table 1 で分化度と CKS2 発現の差はみられたか。

(回答) 今回の検討では有意差を認めなかった。

質問 20) CKS1 と CKS2 のホモロジーは 81%であるが、Fig. 3 においてノックダウンした際に CKS1 までノックダウンされていないか。

(回答) 今回は CKS1 ノックダウンの確認は行っていない。使用した siRNA は過去の報告を参考に、市販品を使用しているので、CKS2 のみに特異的な siRNA であると考えて使用した。相同性も高く、哺乳類で高度に保存された遺伝子配列である。詳細は不明であるが、類似した機能もあると予想している論文もあるので、CKS1 の発現について確認を行うべきであったと考える。

質問 21) miR-26a はどの遺伝子由来か。

(回答) 甲状腺乳頭癌細胞株において CKS2 の 3'側非翻訳領域に結合し発現を抑制すると報告されている miR-26a は、ヒトゲノムにおいては Chromosome 3 (p22.2)に位置する蛋白のリン酸化活性に関連する蛋白である CTDSPL を coding する領域のイントロンから転写される。

質問 22) CKS2 の発現に関して、細胞質と核内で予後の差はないか。

(回答) CKS2 が結合するサイクリン B1 と CDK1 の複合体は、細胞周期では G2 期から M 期にかけて発現が高くなる。サイクリン B1 と CDK1 の複合体は G2/M 期チェックポイントで、核膜を崩壊し、M 期開始を担っていることから、異常な細胞がチェックポイントを通過すると考えると、細胞質よりも核内で発現が高くなっている方が予後不良と推測される。以前、食道癌でサイクリン B1 を検討した結果、細胞質より核内で発現している方が予後不良であった。従って CKS2 の発現に関しても同様に、核内で発現している方が予後不良であると推測される。

質問 23) 癌部と非癌部で CKS2 機能の差はあるか。

(回答) 非癌部での機能は正常な細胞増殖に関与しており、癌部でも細胞増殖に関与すると考えられるが、癌部と非癌部で、機能に差があるかは現在のところ明らかになっていない。

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。