

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 334 号		学位申請者	井口 智生
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)・歯学・学術)
	副査	武田 泰生	副査	夏越 祥次
	副査	橋口 照人	副査	古川 龍彦
<p>主査および副査の5名は、平成27年5月1日、学位申請者 井口 智生 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 1 A で BOY, T24 における miR-24-1 の発現は同じくらいに見えるが、トランスフェクタントでアポトーシス効果に差があるのはなぜか。</p> <p>(回答) 過去の実験でも同様の傾向がみられており、BOY 細胞株では microRNA トランスフェクションによるアポトーシス誘導の効果が強く出ている。その機序は不明であるが細胞株による導入効率の違いがあるものと考えている。</p> <p>質問2) Figure 4 で G2 arrest がおこっているのは p27 に関連しているのか。</p> <p>(回答) そのように考えている。今後の検討が必要である。</p> <p>質問3) リストアップされた遺伝子がすべて標的というわけではないのか。</p> <p>(回答) In silico 解析にて標的候補としてリストされたものであり、必ずしも全てが標的遺伝子というわけではない。</p> <p>質問4) 臨床サンプルで miR-24-1 と FOXM1 の発現に逆相関の関係はあったのか。</p> <p>(回答) 解析したが今回の実験では逆相関の関係はみられなかった。</p> <p>質問5) 逆相関がなかった理由をどう考えるか。</p> <p>(回答) microRNA は複数の遺伝子を制御しており、逆に標的遺伝子も複数の microRNA から制御されている。FOXM1 も他の microRNA によっても制御されており、miR-24-1 の発現とは逆相関の関係が弱かったと思われる。</p> <p>質問6) miR-24-1 の発現は早期がんと進行がんで差があったのか。</p> <p>(回答) miR-24-1 の発現と全ての臨床病理学的所見との関連はなかった。</p> <p>質問7) FOXM1 の発現が臨床病理学的所見と相関している一方、miR-24-1 の発現は臨床病理学的所見と関係がなかったことをどのように解釈するか。</p> <p>(回答) FOXM1 は他の microRNA によっても制御されているために、miR-24-1 単独の発現では臨床病理学的所見と相関が出なかった可能性がある。FOXM1 を制御する複数の microRNA を評価できれば相関が出る可能性がある。</p> <p>質問8) これまでに膀胱癌で検討してきた他の microRNA と比較して、miR-24-1 の有用性はどうか。</p> <p>(回答) アポトーシスを誘導することに関しては非常に強力であり、miR-1, miR-133a などに匹敵すると考える。</p> <p>質問9) 有用な microRNA を組み合わせて投与することで、強い抗腫瘍効果をもたらし、臨床応用は可能となるか。</p> <p>(回答) これまでの in vitro 実験では、複数の同時にトランスフェクトしても相乗効果は得られていないが、新しく複数の microRNA の組み合わせを検討することは重要と考える。</p> <p>質問10) 浸潤能や遊走能については検討しなかったのか。</p> <p>(回答) 増殖能が著しく抑制されていたため、浸潤能や遊走能も抑制されていたが、意義が低いと考え掲載していない。</p> <p>質問11) miR-24-1 の働きが癌種によって異なる理由について言及した論文はあったか。</p> <p>(回答) 癌抑制型、癌遺伝子型それぞれ複数の論文があったが理由については言及されていなかった。</p> <p>質問12) Introduction の膀胱癌の罹患率の順位が発表と異なるのはなぜか。</p> <p>(回答) 最新の統計結果に更新したため異なっている。</p>				

質問 1 3) 今回の検討で測定した FOXM1 の転写バリエーションはどれなのか。total と考えていいのか。

(回答) バリエーションを個別に検討しておらず、total を検討している。

質問 1 4) FOXM1 と細胞老化とは関係があるのか。

(回答) 細胞老化が起こると CDK インヒビターの発現により RB 蛋白質が活性化されて、E2F/DP 転写因子の転写活性が抑制される。このため転写因子である FOXM1 の発現レベルが低下するという報告がある。

質問 1 5) 論文での gain-of-function と loss-of-function という言葉はどのように使い分けたか。

(回答) gain-of-function は microRNA を導入、loss-of-function は遺伝子をノックダウンして表現型の変化をみるという意味で用いた。

質問 1 6) miR-24-1 トランスフェクション実験では用量依存性がみられたか。

(回答) 基本としている 10 nM で clear な結果を得たので、他の濃度では検討していない。

質問 1 7) Figure 3 の PARP, cleaved PARP を別の抗体を用いて検討しているが、一つの抗体で染まるバンドの高さで評価することはできないのか。1 枚の膜で PARP, cleaved PARP を検出するほうが figure として適切ではないのか。

(回答) PARP, cleaved PARP はそれぞれ別の抗体で検出し、プロトコールが異なるため 1 枚の膜上に同時に検出することは出来ない。使用した膜は同じものである。

質問 1 8) miR-24-1 は膀胱癌では癌抑制型とのことだが、miR-24-1 は正常膀胱上皮では発現が恒常的に高いのか。

(回答) そのように考えている。膀胱癌の検体を採取する場合は手術の性質上、同じ個体の正常膀胱を採取できずペアでの比較はできない。正常膀胱は前立腺全摘術時に採取したもの(非膀胱癌患者)を使つての比較ではあるが、Figure 1 A のように膀胱癌に比べて miR-24-1 の発現は高い。

質問 1 9) miR-24-1 を膀胱癌細胞株に導入するとアポトーシスが誘導されるが、もともと発現が高い正常膀胱ではアポトーシスが起らないのは発現レベルの問題なのか。

(回答) トランスフェクションにより細胞の中にどれだけ miR-24-1 が導入されたかを評価するのは困難であるが、過剰発現によりアポトーシスが誘導されている可能性はある。

質問 2 0) miR-24-1 の発現低下のメカニズムは何か。

(回答) 詳細は不明であるが、プロモータ領域のメチル化の可能性はある。また以前に当科で膀胱癌細胞株を用いた CGH アレイで miR-24-1 がコードされる領域(9q22.32)の発現が欠落しており、この領域が不活化することにより調節されている可能性もあると思われる。

質問 2 1) FOXM1 の下流で動いている Survivin (BIRC5) の発現変化について miR-24-1 トランスフェクタントで確認したのか。

(回答) miR-24-1 での Survivin の発現変化については今回検討していない。膀胱癌で Survivin は miR-195/497 cluster が直接制御することを過去に報告している。Survivin は FOXM1 だけでなく他の遺伝子や microRNA などでも複雑に制御されており、今回の研究はそのパスウェイ解析の一部である。

質問 2 2) Table 2 の中で標的遺伝子として FOXM1 を選択した理由は何か。

(回答) 最初は異種間保存領域 (conserved site) が 2 か所あり他の癌種で報告がみられた CHI3L1 に注目していたがウエスタンブロットで細胞株での発現がみられず、実験構成上、適当でないと判断し次に最上位の FOXM1 に着目した。

質問 2 3) 膀胱癌が女性より男性に多い理由は何か。

(回答) 膀胱癌のリスクファクターである喫煙者、染料や化学薬品を使う仕事をする人が男性に多いことが原因の一つと思われる。性別による遺伝子的な違いがあるかどうかは今のところ分からない。

質問 2 4) microRNA は 20 塩基対ほどの小さな RNA だが PCR で定量的な評価が可能なのか。

(回答) 特殊な Specific looped RT primer を用いて各 microRNA に特異的な cDNA を作成しこれをテンプレートに TaqMan probe で Real-time PCR を行う方法で約 98% の確率で正確な定量評価が可能である。

質問 2 5) BOY に miR-24-1 を導入することや FOXM1 をノックダウンすることで細胞の形態変化は見られたか。

(回答) miR-24-1 の導入で細胞形態は円形に変化することが観察されたが、FOXM1 のノックダウンでは変化は見られなかった。

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。