

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 337号	学位申請者	石原 知明
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井戸 章雄 ()	副査 武田 泰生
	副査	谷本 昭英	副査 速見 浩士

主査および副査の5名は、平成27年5月28日、学位申請者 石原 知明 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) stem-loop RT-PCR とはどのような原理であるか。

(回答) 特殊な Specific looped RT primer を用いて各 microRNA(miRNA)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 を行う方法であり、約98%の確率で正確な定量評価が可能である。

質問2) mature miRNA とは何か。

(回答) mature miRNA は pre-miRNA から切り出された長さ22塩基程度の2本鎖RNAであり、miRNAの最終産物である。mRNAの3'末側非翻訳領域に配列特異的に結合してmRNAの分解や翻訳阻害を起こす。

質問3) miRNA の transfection の効率ほどの程度か。

(回答) lipofectamine 試薬を用いた transient な transfection で、導入効率はほぼ100%であることが、miR-1によるPTK-9 knockdown 系で確認されている。

質問4) 標的候補として挙げられているEGFRとMETの発現をmiR-23b, miR-27bが抑制するという理解でよいか。

(回答) miR-23b, miR-27bによるEGFR, METの直接的な制御は証明されていない。他の分子を介した間接的制御である可能性もある。

質問5) METの活性型変異に対してもmiR-23b, miR-27bは作用すると考えられるか。臨床検体においてMETの活性型変異の頻度とmiR-23b, miR-27bの発現の関連について調べたか。

(回答) METの活性型変異の頻度および、miR-23b/27bの発現との関連については確認していないが、重要な指摘と思われる今後の検討課題としたい。

質問6) 採取した正常腎は、高発癌リスクの背景腎臓として、対側の腎とは組織、環境的に異なるものであるのか。

(回答) 小径腎癌の部分切除後の正常腎組織から腎癌が発生することは稀であり、患側腎正常部位は対側腎と比べて発がんのポテンシャルが高いとは言えない。つまり、対照正常組織として検討するのに問題はない。

質問7) Figure 4のwound healing assayについて、スクラッチした面積でなく、距離で測った理由はなぜか。

(回答) これまでの我々の報告に倣って距離を測定したが、今後、スクラッチした面積での測定も検討したい。

質問8) XTT assayで増殖抑制がみられているが、真に増殖抑制か、細胞が死んでいるのか、あるいはその両方か。

(回答) 測定時の鏡検では、細胞が死んでいる所見は認めず、真の増殖抑制によるものと考えられた。

質問9) 腎細胞癌61症例はすべて腎摘の症例であるか。部分切除の症例も含まれているか。

(回答) 1例の腎部分切除の症例が含まれていた。

質問10) miR-23b, miR-27bの発現が予後と関連する一方で、table 2では転移の有無とmiR-23b, miR-27bの発現には関連はなかったと示されているが、転移と関係ない理由で予後不良となると考えられるのか。

(回答) 腎細胞癌では診断時に転移が存在しても、cytoreductive surgeryを行うと術後にインターフェロンや分子標的薬が奏功して長期生存する症例が存在するためと考えられる。

質問11) 今回の症例で予後の悪かった症例はどのような理由で死亡しているのか。

(回答) 癌死が確認できた症例は4例である。癌死であったかどうか確認できなかった症例も含まれており、その中には他因死の症例も含まれている可能性がある。

質問12) miR-23b, miR-27b cluster の source gene は何か。

(回答) miR-23b/27b cluster は c9orf3 のイントロン領域に存在する。この転写産物は M1 zinc aminopeptidase family の一つであり、亜鉛存在下にペプチド N 末端のアミノ酸鎖を加水分解する酵素であるが、癌細胞における詳細は不明である。

質問13) miR-23b, miR-27b が癌腫によって癌抑制型や促進型として機能するのであれば source gene の発現も癌腫によって上昇や低下していると思われるが報告はあるか。

(回答) 前立腺癌細胞株において、miR-23b, miR-27b と host gene である c9orf3 の発現が、共に低下していたとする報告があるが、他の癌種における報告は検索し得る限りなかった。

質問14) 標的候補として EGFR や MET を挙げているが、今回用いた臨床検体における発現はどうであったか。

(回答) Real-time PCR による解析では EGFR, MET の発現は癌組織において上昇していた。

質問15) EGFR や MET を標的すると報告されている miRNA は今回用いた臨床検体で発現は低下していたか。

(回答) miR-23b, miR-27b 以外の miRNA は今回測定していないが、今後検討したい。

質問16) 使用した腎癌細胞株に miR-23b, miR-27b を transfect すると EGFR, MET の発現は減少したか。

(回答) western blotting による解析では、miR-27b を transfect した 786-O において EGFR の発現が抑制された。

質問17) 組織の中にある miRNA が血液中でも見つかるという理由、メカニズムはどのようなものか。

(回答) 癌の増殖、転移のために miRNA が exosome に内包されて細胞外へ放出され、血液などの体液中を循環し、あたかもホルモンのように、他の細胞に取り込まれて機能することが示唆されている。

質問18) Figure 3, 4, 5 について、mock と control-miRNA とコントロールを2つおいた理由はなぜか。

(回答) mock は transfection 試薬のみの添加である。control miRNA との差異を比較することにより、予期しない遺伝子抑制効果 (off-target effect) の有無を確認するためである。

質問19) 2つの miRNA を同時に transfect することは可能か。同時に transfect した場合に単独よりも抑制効果が強まることが考えられるか。

(回答) 同時に transfect することは可能であり、抑制効果が強まる可能性も考えられる。今後の検討課題としたい。

質問20) miR-23b, miR-27b を臨床に応用することを考えた場合、診断と治療のどちらに有望であると考えられるか。

(回答) 過去に研究された miRNAs と比較して、それほど腫瘍抑制効果は強くないため、予後予測マーカーとしての活用が有用と思われる。

質問21) Figure 2 で、miR-23b, miR-27b の発現が低い群でも5年生存率が6割ほどになっているが、通常腎摘後の予後はどのようなものであるか。

(回答) 腎摘後の5年生存率はI期95.4%、II期85.8%、III期71.4%、IV期22.7%との報告があり矛盾しない。

質問22) Figure 1B でプロットしてある検体は正常腎か、癌組織のものか。

(回答) 正常腎と癌組織の両方を測定してプロットしている。

質問23) Figure 1B で、正常腎と癌組織を分けると違いが出ることは考えられないか。

(回答) 癌組織のみにおいても、miR-23b と miR-27b の発現には正の相関を認めた。

質問24) 今回用いた臨床検体で VHL の発現はどのようなようであったか。

(回答) VHL の発現については今回測定していないが、その影響については今後の検討課題としたい。

質問25) miR-23b, miR-27b の機能が癌種によって変わるとすると、どのようなメカニズムが考えられるか。

(回答) 癌腫によって、異なるシグナル伝達経路が活性化しており、それらを制御する miRNA の発現パターンも変化するためと考えられる。

質問26) Table 3 で、cell adhesion molecules や focal adhesion にはどのような遺伝子が含まれていたか。

(回答) focal adhesion には CAV2, MET, COL4A2, CCND1, KDR, PIK3R3, COL5A2, COL4A1, EGFR, FLT1, COL6A3 が、Cell adhesion molecules (miR-23b) には SIGLEC1, ITGAM, NLGN1, HLA-DPB1, ITGAL, ICOS, SELL, VCAN が、Cell adhesion molecules (miR-27b) には SIGLEC1, CD86, ITGAL, ICOS, CD8A, SELL, VCAN, CDH5 が含まれていた。

質問27) miR-23b, miR-27b を transfection した細胞で、細胞の形態変化は見られなかったか。

(回答) 鏡検における観察では細胞の形態の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。