

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 353 号		学位申請者	松下 良介
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堂地 勉	副査	武田 泰生
	副査	夏越 祥次	副査	速見 浩士
<p>主査および副査の5名は、平成27年12月28日、学位申請者 松下 良介 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) 3つのmicroRNA(miRNA)はクラスターを形成しているということだが、クラスターとは何か。 (回答) miRNAクラスターとは、染色体上の発生部位が非常に近接しており、そのプロモータが共通しているものである。通常は10,000塩基以内に存在するmiRNAを指す。</p> <p>質問2) miRNA-451a/144-3p/144-5pはクラスターを形成しているが、増殖抑制効果が異なるのはなぜか。 (回答) クラスターを形成しているこれらのmiRNAは同じpathwayを制御すると仮説を立てたが、実際はそれぞれ別のpathwayを制御していると考えている。</p> <p>質問3) 論文では増殖能を調べる実験が提示されているが、遊走能・浸潤能を確認する実験は行ったか。 (回答) 行っている。miRNA-144-5pは遊走能・浸潤能も強く抑制していたが、今研究では、その標的遺伝子として細胞周期関連遺伝子を挙げたため、論文には増殖能の実験結果のみ提示した。</p> <p>質問4) Cyclin Eタンパクの発現を確認したか。また他の論文でCyclin Eのタンパクレベルでの報告はあるか。 (回答) Western Blotを行ったが、バンドが確認できず、論文には提示していない。Cyclin Eタンパクはユビキチン化による分解が早いため検出できなかった可能性がある。なお他の論文でCyclin Eをタンパクレベルで調べている報告はある。</p> <p>質問5) 転移巣の組織でのCCNEの発現はどうなっているか。そのような論文報告はあるのか。 (回答) 転移巣の組織は検体の入手が困難であり、CCNEの発現は調べていない。またそのような論文報告はない。</p> <p>質問6) 尿中のmiRNA-144-5pで膀胱癌を診断できるか。また、これまで尿中のmiRNAを調べたことはあるか。 (回答) miRNA-144-5pはもともと発現が低いパッセージャー鎖であり、さらに膀胱癌組織では発現が抑制されているため尿中測定による膀胱癌診断は現実的ではないと考えている。我々は既に、膀胱癌の診断マーカーとして尿中miRNA-96とmiRNA-183の測定が有用であると報告している。</p> <p>質問7) これらのmiRNAの発現が膀胱癌組織で抑制される原因は何か。 (回答) 我々の行った実験では、プロモータ領域のメチル化や脱アセチル化は関与していないことが分かった。複数の膀胱癌細胞株を用いたCGHアレイではmiRNA-451a/144-3p/144-5pがコードされる領域(17q11.2)の発現が欠失しており、膀胱癌ではこの領域の欠失により調節されている可能性がある。</p> <p>質問8) miRNA-144-3pの標的遺伝子については検討したか。CCNEは標的ではないのか。 (回答) 本研究ではその対象をmiRNA-144-5pに絞ったため、miRNA-144-3pの標的遺伝子探索は詳しくは行っていない。</p> <p>質問9) このmiRNAはG0/G1 arrestを起こすが、apoptosisは誘導しないのか。またはapoptosisのシグナルは動かないのか。G1期で増殖が止まったままということか。 (回答) このmiRNAを核酸導入した細胞を用いてapoptosis assayを行ったが、apoptosisの誘導は認められなかった。miR-144-5pはCCNE・CDC25Aを抑制しcell cycle arrestを誘導するが、apoptosisには関係しないと思われる。</p>				

質問 10) Cyclin E タンパクのリン酸化は調べていないのか。

(回答) 本研究では Cyclin E タンパクのリン酸については検討していないが、今後の検討課題としたい。

質問 11) Fig.4 で *CCNE1* と *miRNA-144-5p* の発現の相関に有意差はない。マーカーとするなら有意差があることが必要ではないのか。

(回答) 4つの標的遺伝子と *miR-144-5p* の発現は負の相関にあるが、*CCNE1* とのみ有意差は認められなかった。しかし、ルシフェラーゼレポーターアッセイで *CCNE1* の mRNA を *miRNA-144-5p* が直接制御することを確認しているため、検体数を増やすことができれば有意差が得られると考えている。

質問 12) *CCNE* の転写制御については確認していないのか。

(回答) 本研究では *CCNE* の転写制御について検討していないが、miRNA による制御と比べてどのような関連にあるのか興味があり、今後の検討課題としたい。

質問 13) *CCNE* が重要な癌遺伝子ということだが、それは膀胱癌に特異的なのか。

(回答) 膀胱癌だけでなく、乳癌、卵巣癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌など多くの癌腫で癌遺伝子であるという報告がある。

質問 14) 今回実験に使用した膀胱癌の組織型は移行上皮癌か。それとも扁平上皮癌あるいは腺癌か。

(回答) 本研究に用いた、臨床検体・細胞株とも尿路上皮癌（移行上皮癌）である。

質問 15) *CCNE1/2* は独立した予後因子となるか。

(回答) 多変量解析を行ったが、独立した予後規定因子とはならなかった。

質問 16) 検体数を増やすことができれば、独立した予後規定因子となる可能性はあるか。

(回答) 乳癌や卵巣癌、肺癌では独立した予後規定因子であるという報告が複数あり、それらで用いられた臨床検体数は 200-900 程度であった。本研究で用いた臨床検体数は 60 であり、さらに検体数を増やすことができれば独立した予後規定因子となる可能性がある。

質問 17) この miRNA や *CCNE* を術前診断として利用できるか。

(回答) *miRNA-144-5p* や *CCNE* は組織での発現を測定している。*miRNA-144-5p* は組織での発現が低値のため、血中や尿中での測定は適さないと考えている。術前の診断に利用するなら、血中や尿中の *CCNE* を確認することになると思うが、今後の検討課題としたい。

質問 18) qRT-PCR の実験で苦勞した点は何か。

(回答) qRT-PCR では 96 well プレートを用いて行った。1つの well が小さく、また加える試薬や sample も 1~3μl 程度と微量であり、実験精度を担保するために訓練を要した。

質問 19) 3回実験しているが、Figure に反映しているか。

(回答) バーの高さは、3回の実験値の平均を表している。またエラーバーの距離は標準誤差を表している。

質問 20) 中央値ではなく平均値をとるのはなぜか。

(回答) 有意差検定を行うために平均値での提示を行っている。臨床パラメータのようにそれぞれの値にばらつきが大きい場合は、中央値を示した方が良いと考える。

質問 21) Deep sequence がゴールドスタンダードとなりうるか。

(回答) 従来のアレイ解析や stem-loop PCR 法は解析処理能力に限界があり、また既知の塩基配列以外は検出できなかったが、次世代シーケンサーによる Deep sequence では解析処理能力が大幅に向上し、未知の塩基配列も読み取ることが可能である。また再現性・正確性が高く、コストも低下していることから、遺伝子発現解析において Deep sequence が今後のゴールドスタンダードとなると考えている。

質問 22) *miRNA-144-5p/3p* を同時に核酸導入することは技術的に可能か。

(回答) 可能である。これらの miRNA を同時に核酸導入し機能解析を行ったが、相乗効果は認められなかった。

質問 23) 4つの標的遺伝子で *MYT1* は *CDK* の作用を抑制する作用があり、ほかの標的遺伝子とは異なるのではないか。

(回答) *MYT1* (*PKMYT1*) は Cyclin B-CDC2 複合体を不活化させることで、細胞周期において G2 期から M 期への移行を負に制御している。一方、Cyclin E タンパクや *CDC25A* タンパクは G1 期から S 期への移行を正に制御している。*miRNA-144-5p* が *CCNE* や *CDC25A* だけでなく、*MYT1* を制御する意味は明らかではない。*MYT1* が癌遺伝子であるという報告はないが、GEO data set では膀胱癌検体でその発現が上昇しており、今回の解析では標的遺伝子として提示した。

質問 24) Cyclin E タンパクの免疫組織学的検討は行っていないのか。

(回答) 本研究では行っていないが、今後の検討課題としたい。

質問 25) Cyclin E タンパクはユビキチン化により分解されるが、分解された Cyclin E タンパクは調べたか。

(回答) 本研究では分解された Cyclin E タンパクについては検討していない、今後の課題としたい。

質問 26) Table1 を見るとチェックポイントの抑制に関連するよう見えるが、この点に関しては調べたか。

(回答) 本研究では検討していないが、G1/S 期の移行においてチェックポイントである CDK 阻害因子 (Ink4 ファミリー, Cip/Kip ファミリー) については、*miRNA-144-5p* がこのチェックポイントを抑制している可能性があると考えている。

質問 27) 膀胱癌で関連の深い癌遺伝子として *Ras* があるが、それとの関連はどうか。

(回答) 本研究では *Ras* 遺伝子との関連は検討していないが今後の検討課題としたい。

質問 28) *CCNE1* の Low, High と *miRNA-144-5p* の High, Low で 4 群に分けて調べたか。

(回答) 「*CCNE1* 高発現かつ *miRNA-144-5p* 高発現群」と「*CCNE1* 低発現群かつ *miRNA-144-5p* 高発現群」の比較、「*CCNE1* 高発現かつ *miRNA-144-5p* 低発現群」と「*CCNE1* 低発現群かつ *miRNA-144-5p* 高発現群」の比較では全生存率で有意差が認められたが、それ以外の組み合わせでは有意差は認められなかった。

質問 29) 今後、この miRNA をどのように利用していくか。

(回答) *miRNA-144-5p* を今後、治療や診断に応用することは考えていない。この miRNA 単独での腫瘍抑制効果はそれほど強くないため、これを膀胱癌治療に用いても十分な効果は得られないと考えている。しかし、この miRNA の標的遺伝子として同定された *CCNE1/2* や *CDC25A* は膀胱癌の新規治療標的となる可能性はある。

質問 30) 大腸癌で *miRNA-144-5p* の発現が上昇しているのはなぜ。

(回答) この miRNA が大腸癌患者の糞便中や癌組織で発現が亢進している理由は明確ではない。癌腫における発現の違いもあるのかもしれないが、明らかな理由は不明である。

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。