




学位論文審査の結果の要旨

令和 2年 2月 7日

審査委員	主査	舩形 尚 		
	副主査	岡野 圭一 		
	副主査	片脇 則光 		
願出者	専攻	医学系研究科	部門	(平成27年度以前入学者のみ記入)
	学籍番号	18D723	氏名	平田 正大 (小野)
論文題目	Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in human hepatobiliary, pancreatic, and gastrointestinal cancer cell lines			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 ・ <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)			

〔要旨〕

背景/目的]

テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) 遺伝子のプロモーター領域は、TERTの発現、テロメラーゼ活性、およびテロメラーゼ長に影響を与えることができる制御要素である。TERTプロモーター領域内の変異は、多くのがんで最もよく見られる変異である。本研究では、肝胆膵臓癌、消化器癌の細胞株におけるTERTプロモーター変異の状態を明らかにした。

【方法】

デジタルPCRを用いて、肝胆膵臓癌、消化器癌の細胞株におけるTERTプロモーター変異の状態を明らかにすることを目的とした。12の肝癌細胞株、5つの胆管癌細胞株、12の膵臓癌細胞株、17の消化器癌細胞株、および3つの正常細胞株において、TERTプロモーター変異の有無を評価した。C228T、C250TTERTプロモーター変異の両方において正常細胞株のうち大腸上皮細胞が最もTERTプロモーター変異率を有していたため、大腸上皮細胞のTERTC228T及びC250Tの変異率を基準として種々の癌細胞と比較を行った。

【結果】

C228TTERTプロモーター変異において3種類の正常細胞株の中で、正常大腸上皮細胞が最も変異率が高い (Figure1)。12種類の肝臓癌細胞株の中で9種類の細胞で高い変異率を認めた (Figure2)。正常大腸上皮細胞と肝臓癌細胞株の中で高変異率を認めた9種類の細胞株を比較し、9種類すべてで有意な上昇を認めた (Figure3)。9種類の肝臓癌細胞株を除いたすべての細胞を正常大腸上皮細胞と比較し、有意差がないことが確認された (Figure4)。C250TTERTプロモーター変異において3種類の正常細胞株の中で、正常大腸上皮細胞が最も変異率が高い (Figure5)。8種類の食道癌細胞の中で、唯一TERTプロモーター変異を高頻度に認めたのはKYSE850のみであった (Figure6)。正常大腸上皮細胞とKYSE850のTERTプロモーター点変異率を比較し、KYSE850は有意に高値だった (Figure7)。

KYSE850を除いたすべての細胞を正常大腸上皮細胞と比較し、有意差がないことが確認された (Figure8)。

【結論】

C228Tプロモーター変異は、様々な消化器癌細胞株の中でも肝臓癌細胞株に特異的である。これらのデータは、今後の腫瘍発生メカニズムの研究や、変異を検出するためのデジタルPCRの臨床利用に貢献する可能性がある。

令和4年2月4日に行われた学位審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

1. HCCの細胞株別の原因を述べよ
→全12種類の内、B型肝炎は4種類、その他はウイルス関連ではなかった。その他の詳細な原因については昔の細胞のため不明だった。
2. dPCRとリアルタイムPCRの違いは？
→dPCRは各ウェルでそれぞれDNAの増幅を見れる直接定量で希少な遺伝子変異を検出することができる点がリアルタイムPCRと異なる。
3. HCCで変異が陽性で、消化器癌で陰性とのことだが、その違いは何か？
→テロメラーゼ活性を起こす理由としてTERT遺伝子変異が挙げられるが、他の臓器の発癌はテロメラーゼのメチル化やALT(alternative of lengthening telomere)によることが関係していると考えられていることが理由だと考えられている。
4. HCCで変異が多いとの既報があるとのことですが、今回の論文の新規性は何か？
→これまでの既出は肝細胞癌において次世代サンガーシーケンス法やリアルタイムPCRで報告されていることをデジタルPCRでおこなったことと、デジタルPCRを用いて種々の消化器癌細胞株の網羅的解析をおこなったことに新規性がある。
5. 変異は治療効果判定についての知見はあるのか？
→まだ研究段階だが、1例の患者の治療前後の血清中のTERTC228Tの変異のデータを示し、今後の検討の余地がある。
6. 正常細胞と変異を比較する必要性はあるのか？
→正常細胞を用いることで偽陽性を除外できることに目的がある。
7. エラーバーが大きいのはなぜか？データが変動しやすいということか？
→DNAの抽出の濃度などで多少の誤差がある。既出の報告でも今回の研究と同様の誤差が生じている。
8. Mutation Rateについて、変異があれば均一に結果が出ると思われるが、おおきくずれがあるのはなぜか？
→デジタルPCRにおいて同じ条件で行っても、DNAの増幅がうまくいかなかったものや蛍光で染まらなかったもの、またどちらの蛍光で染まったものがあり、そのような理由で変異の割合にずれが生じているものとおもわれる。
9. 実験に使用したwell数についていくつのものか？
→2万のウェルのチップを用いている。

10. C228TとC250Tのそれぞれの違いについて述べよ。
→染色体の変異の場所が異なるだけで、最終的に機能は同様である。
11. 日付の記載の矛盾について述べよ。
→出版社の誤植である。
12. 変異の有無は何と関連しているのか？HCCで高いのは何の影響か？
→既出の論文ではHCV感染が肝癌を起こす時にTERT遺伝子変異を引き起こすと報告されている。その他の原因に関しては今後の研究が期待される。
13. 組織標本のHBV症例で割と変異が高いのは何故か？
→今回のB型肝炎関連肝細胞癌では対象症例が5例のうち3例がTERTC228Tプロモーター点変異の高頻度だったものが3例だったが、これはn数が少ないため高くなっているものと思われる。いくつかの既出の報告でもどの報告でもB型肝炎関連肝細胞癌ではTERTプロモーター点変異の頻度は総じて低いと報告されている。
14. 進行度によりmutationに違いがあるようだが、今回使用した細胞株はどのような状態のものだったのか？
→細胞株のそれぞれのステージなどは明らかになっていない。12種類の細胞株の中で4つほどはリンパ節や腹水などから採取されている癌細胞株であり、少なくとも1/3は進行している状況と考えられている。
15. 凍結検体でないと調べられないのか？
→血清などでも調べることができ、現在血中に流れ出している循環DNAの研究に取り組み始めている。
16. 治療判定や早期発見にリキッドバイオプシーのような形でつながるのか？
→その可能性があり、現在の研究で取り組んでいるところである。
17. 治療標的として使用できる可能性はあるのか？
→これまでTERTプロモーター点変異に対しての分子標的薬などの開発などが報告されているが、TERTプロモーター点変異に対しての薬剤を投与しても予後が変化しないと言われている。今後の研究が期待される分野である。
18. dPCRの欠点を述べよ。
→dPCRはリアルタイムPCRと比較してダイナミックレンジが小さく、高発現遺伝子の検索はリアルタイムPCRに軍配があがる。
19. 膵臓癌で応用できる可能性はありますか？
→既存の報告でもTERTプロモーター点変異は膵臓癌では見られていないと報告されており、今回の研究でもTERTプロモーター点変異は認めていないことから、膵臓癌においてTERTプロモーター点変異を用いた応用はできない可能性が高い。

令和4年2月4日に開催された学位論文公開審査会において、口頭発表の後、指定討論者及び審査委員による質疑応答が実施され、上記の例のような質問に対して適切な回答が得られた。従って、審査員一同は一致して本論文が学位授与に値すると判断した。尚、本論文は既に受理され発行されている。

掲 載 誌 名	In Vivo 第 36巻, 第 1号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2022年 1月	出版社(等)名	International Institute of Anticancer Research

(備考) 要旨は, 1, 500字以内にまとめてください。