









学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・ 	第 3 2 9 号	氏 名	坂 下 博 之
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	杉 尾 賢 二 	
	副査氏名	横 山 泰 生 	
	副査氏名	岸 田 哲 子 	
論文題目			
<p>Identification of the NEDD4L Gene as a Prognostic Marker by Integrated Microarray Analysis of Copy Number and Gene Expression Profiling in Non-Small Cell Lung Cancer          (非小細胞肺癌におけるコピー数と遺伝子発現のマイクロアレイの統合解析からの予後因子としての NEDD4L 遺伝子の同定)</p>			
論文掲載雑誌名			
Annals of Surgical Oncology			
論文要旨			
<p>【対象と方法】肺腺癌 11 症例の凍結標本から腫瘍部を Laser microdissection 法で採取し、RNA、DNA を抽出し、それぞれ遺伝子発現アレイ、CGH アレイを施行した。次に DNA analytics を用いてコピー数と発現の相関する遺伝子を抽出した。その中でコピー数の低下と遺伝子発現低下の関係を認めた NEDD4L 遺伝子を選択し、84 例の手術検体で mRNA の発現を調べ、臨床病理学的因子と予後との関連を調べた。</p> <p>【結果】CGH アレイの結果から、18q 領域を解析の target とし、次に遺伝子発現とコピー数に関連のある遺伝子を抽出した。Del-nonDel t-test(コピー数減少の有無と発現低下の関係をみる)で抽出された 149 遺伝子のなかで 18q 領域には 4 遺伝子存在し、TGF-β と関連があり予後に差があった NEDD4L に焦点を当て、その発現を非小細胞肺癌(NSCLC)84 例で検討した。NEDD4L 発現量は非癌部に比べ、癌部で優位に低下していた。NEDD4L の発現を中央値で高発現群と低発現群に分けて検討したところ、性別、喫煙、組織型、分化度、腫瘍径、T 因子、リンパ節転移、病理病期で、高発現群と低発現群で有意差を認めた。また、NEDD4L 低発現群で有意に生存率が低かった。NEDD4L の発現は、予後に関して、単変量解析では有意差を認めたが、多変量解析では有意差はなく、独立予後因子にはならなかった。</p> <p>【結論】NEDD4L 遺伝子は 18q21 に存在し、E3 ubiquitin ligase のひとつで、上皮の Na channel を制御するとされている。NEDD4L は ubiquitin を介し、Smad2 や TGF-β R1 を分解することで、TGF-β のシグナルを抑制するとされている。以上より NEDD4L の発現低下が癌の進展に関与する可能性が示唆された。</p>			
<p>本研究は、コピー数と発現低下が関係する遺伝子 NEDD4L に焦点を当て、非小細胞肺癌で初めて予後との関係を検証し報告したもので、癌の進展を考えるうえで有意義な研究である。          このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

~~最終試験~~

## の結果の要旨

## 学力の確認

審査区分 課・ 	第329号	氏名	坂下博之
審査委員会委員	主査氏名	杉尾賢二 	
	副査氏名	権山繁生 	
	副査氏名	岸田哲子 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 手術切片を研究に使用する際の同意は包括同意で得たのか、この研究のために個別で得たのか。</li> <li>2) 4施設に所属しているが、主にどの施設で行った研究か。</li> <li>3) Laser microdissection で一症例あたりどの程度の組織切片数を採取したのか。</li> <li>4) Array での検討を、腺癌を対象に行った理由は。</li> <li>5) Array での検討は腺癌を対象に行われているが、臨床検体での検討は腺癌だけではなく、扁平上皮癌も含まれているが、その理由は。</li> <li>6) 病期で発現に差が目立つ他の遺伝子もあるが、18q を選んだ理由は何か。</li> <li>7) 第18染色体で候補にあがった4遺伝子 (NEDD4L, SMAD2, ZNF397, MALT1) のうち、NEDD4L, SMAD2 の2つに絞り、さらに NEDD4L を対象とした理由を述べよ。</li> <li>8) 18q にターゲットを絞って行われた研究は他に例があるのか。あればその結果はどうだったのか。</li> <li>9) 腺癌より扁平上皮癌で NEDD4L の低発現が多いのはなぜだと考えるか。</li> <li>10) NEDD4L の発現低下が、男性、喫煙者、かつ扁平上皮癌で多いことは、喫煙との関連を考えるべきと思うが、どう考えるか。</li> <li>11) real-time RT-PCR (Fig. 2a) は79例で行われているが、臨床病理学的因子と NEDD4L 発現を表した Table 2 の症例が84例になっている。理由は何か。</li> <li>12) NEDD4L の発現は予後に関して、単変量解析では有意差を認めたとあるが、多変量解析では有意差がなかったとある。具体的にはどのようなようであったのか。</li> <li>13) 生存曲線において、5年以上の経過観察期間があるにもかかわらず、打ち切りが多いが、フォローアップはどのようになされていたか。調査は十分されていたか。</li> <li>14) 過去の報告では NEDD4L の発現が亢進した癌と減弱した癌があり、特に前立腺癌では両方の報告がある。このような2面性のある NEDD4L は臨床応用しにくいのではないか。</li> <li>15) TGF-<math>\beta</math> は、本来細胞増殖抑制に働くと考えられているが、本研究で、NEDD4L と癌との関係において、TGF-<math>\beta</math> の役割について説明せよ。</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 坂下 博之

## 論 文 題 目

..... Identification of the *NEDD4L* Gene as a Prognostic Marker by Integrated Microarray  
..... Analysis of Copy Number and Gene Expression Profiling in Non-Small Cell Lung Cancer  
..... (非小細胞肺癌におけるコピー数と遺伝子発現のマイクロアレイの統合解析からの  
..... 予後因子としての *NEDD4L* 遺伝子の同定)

## 要 旨

## 緒言

..... 癌細胞における遺伝子発現は各種の因子で影響をうけることが知られているが、ゲノムのコピー数変  
..... 化に伴い発現の変化する遺伝子は、癌遺伝子や癌抑制遺伝子として重要であると考えられる。近年乳癌  
..... を中心に遺伝子発現アレイと CGH アレイの統合解析が報告されているが、肺癌については十分ではな  
..... い。今回我々は、Laser microdissection を行った非小細胞肺癌において、2つのアレイの統合解析を行い、  
..... 重要と思われる遺伝子を抽出した。その中の *NEDD4L* 遺伝子について、さらなる解析を行った。

## 研究対象及び方法

..... 大分県立病院の呼吸器外科で手術を行った肺腺癌 11 症例を用いた。凍結標本より腫瘍部を Laser  
..... Microdissection(LMD)法で採取し、RNA および DNA を抽出し、それぞれ遺伝子発現アレイ、CGH ア  
..... レイを施行した。次に解析ソフトである DNA analytics を用いてコピー数と発現の相関する遺伝子をい  
..... くつか抽出した。その中でコピー数の低下と遺伝子発現低下の関係を認めた *NEDD4L* 遺伝子を選択し、  
..... 広島赤十字・原爆病院の 84 例の手術検体で mRNA の発現を調べ、臨床病理学的因子と予後との関連を

調べた。

結果

CGH アレイの結果を、stage IA 期の症例と stage IB-IV 期の症例に分けて解析したところ、18q 領域のコピー数減少の頻度に大きな違いを認め、18q 領域をさらなる解析の target とした。次に遺伝子発現とコピー数に関連のある遺伝子を抽出した。Del-nonDel t-test (コピー数減少の有無と発現低下の関係を見る)で抽出された 149 遺伝子のうち、18q 領域にあるものは 4 遺伝子であった。このうちがんとの関わりが報告されている TGF- $\beta$  と関係があり、予後に差があった NEDD4L に焦点をあてた。

NEDD4L 遺伝子発現を非小細胞肺癌(NSCLC)84 例で検討した。NEDD4L 発現量は非癌部に比べ、癌部で有意に低下していた。NEDD4L の発現を中央値で高発現群と低発現群に分けて、各種臨床病理学的因子との関係を検討したところ、性別、喫煙、組織型、分化度、腫瘍径、T 因子、リンパ節転移、病理病期で高発現群と低発現群で有意差を認めた。また、NEDD4L 低発現群で有意に生存率が低かった。NEDD4L の発現は予後に関して、単変量解析では有意差を認めたが、多変量解析では有意差なく、独立予後因子にはならなかった。

考察

NEDD4L 遺伝子は 18q21 に存在し、E3 ubiquitin ligase のひとつで、上皮の Na channel を制御するとされている。癌での報告としては、前立腺癌、胃癌や脳腫瘍において発現低下とがんの進行、予後不良との関係が報告されているが、NSCLC においては初めてである。NEDD4L は ubiquitin を介し、Smad2 や TGF- $\beta$  R1 を分解することで TGF- $\beta$  のシグナルを抑制するとされている。また癌の進展に関わる TTYH2 や SGK-1 を ubiquitin 化することで制御するとされている。以上より NEDD4L の発現低下が癌の進展に関与する可能性が示唆された。また、肺癌と関係の深い間質性肺炎のマイクロアレイ解析の論文から、NEDD4L の EMT への関与が示唆され、その真のメカニズムに関してはさらなる検証が必要と思われる。

結語

コピー数減少と発現低下が関係する遺伝子である NEDD4L 遺伝子は、NSCLC において臨床病理学的因子や予後との解析から、がんの進行の鍵となると考えられ、予後のマーカーとなることが示唆された。