

審 査 結 果 の 要 旨

論文題目 「限局性腎細胞癌術後予後とミトコンドリア DNA 変異との関連」
学位申請者 金 伯士

本論文は、限局性腎細胞癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出した DNA を用いて、ミトコンドリアの ND1 (NADH dehydrogenase subunit 1) 遺伝子と D-loop (displacement loop) 領域の変異を決定し、変異の有無と臨床的予後との関連を検討した研究である。

限局性腎細胞癌には外科的に根治手術が可能な症例も多い一方で、術後再発し転移性腎細胞癌に進展する症例もあるが、今までその予後を予測するモデルは不十分であった。腎細胞癌では VHL, PBRM1, BAP1, SETD2 などの遺伝子変異が知られてきた。一方、他臓器の腫瘍においてミトコンドリア DNA 上に存在する遺伝子 ND1 やミトコンドリア D-loop 領域の変異が報告され、予後不良のリスク因子になる可能性も報告されている。ところが腎細胞癌におけるミトコンドリア DNA の変異と予後との相関に関する詳細な報告は今までなかった。

そこで、申請者らは限局性腎細胞癌における ND1 遺伝子、D-loop 領域の変異の解析を行い、臨床的予後との関連を解析した。対象は 2010 年 1 月から 12 月までの限局性腎細胞癌に対して根治手術を施行された 61 例である。申請者らは、抽出された DNA に対して ND1 遺伝子と D-loop 領域を網羅するプライマーセットを用いて PCR を行い、PCR 産物から ABI3500xL DNA シークエンサーを用いてダイレクトシークエンスを行い配列を決定した。健常者 61 名と比較配列解析を行い変異サイト候補の決定を行った。最終的には対応する正常腎組織の配列と比較して体細胞変異を決定した。さらにそれらの変異と臨床病理学的データ、予後データとの相関を検討した。

その結果、腎細胞癌組織において ND1 遺伝子に体細胞変異がある症例 18 例、D-loop 領域に体細胞変異がある症例 34 例が見つかった。ND1 遺伝子変異は術後再発および癌死の独立したリスク因子であることが判明した。さらに ND1 遺伝子と D-loop 領域ともに変異を認めない 20 症例では非再発生存率は 100% であった。以上より、ND1 遺伝子変異のみならず ND1 遺伝子と D-loop 領域の統合解析は限局性腎細胞癌の予後を予測する新たなリスク因子になりうる可能性が示唆された。

本研究は日本人限局性腎細胞癌における ND1 遺伝子と D-loop 領域の体細胞変異を初めて明らかにした。また、比較的サイズが小さく検査しやすい ND1 遺伝子の変異が限局性腎細胞癌の予後を予測する新規のリスク因子になる可能性を示したという臨床的意義がある。さらに今後様々なミトコンドリア DNA 遺伝子を探索すればさらに有用なバイオマーカーの発見に結びつく可能性があり、将来性のある優れた研究である。

本論文に対して、各審査委員から次のような質疑がなされた。

- 1) 解析した症例に男性が多い理由は？ そもそも腎細胞癌が男性に多い理由は？
- 2) ミトコンドリアの D-loop とは何か？ どんな機能を持っているのか？
- 3) 細胞の中にミトコンドリア DNA は何コピーあるのか？ 腎細胞癌でそのコピー数は異常があるのか？
腎細胞癌で見つかった ND1 や D-loop の変異は、すべてのコピーに存在するのか、一部のコピーのみに存在するのか？
- 4) 通常の PCR よりももっと鋭敏な検出方法を用いれば、ND1, D-loop の変異がさらに多く見つかる可能性はないのか？

- 5) 解析した症例の中に ND1 や D-loop の（体細胞変異ではなく）Germline 変異はあったか？
- 6) 腫瘍以外の疾患で ND1 の変異があることはないのか？ それらの病気で癌（とくに腎細胞癌）のリスクは高いのか？
- 7) ND1 の変異はドライバー遺伝子変異と考えていいのか？ それともパッセンジャー変異なのか？
- 8) ND1 と D-loop の変異と、腎細胞癌で見られる他の遺伝子の変異、例えば VHL とか PBRM1, BAP1, SETD2 との相関は？
- 9) ND1, D-loop の変異を治療のターゲットにはできないのか？
- 10) ND1, D-loop の変異が腫瘍細胞の mutational burden と関係のある可能性は？ 免疫療法への影響に関する考察は？
- 11) 転移巣に関して遺伝子変異は認めたのか？または他癌で検討はなされているか？
- 12) 腎癌のリスク因子の一つである喫煙の既往と ND1 遺伝子と D-loop 領域の変異に相関は認められたか？
- 13) 癌の進展、すなわち臨床病期と ND1 遺伝子変異に相関を認めたのか？
- 14) pT1a 腎癌で ND1 遺伝子変異を認めた症例はどのように経過観察すべきか？
- 15) どうして ND1 遺伝子に注目したのか？
- 16) ND1 遺伝子と薬剤耐性との関わりはどうか？
- 17) 研究資料のがん DNA 抽出の正確性と工夫した点は？
- 18) 全生存率など他のエンドポイントとの関連性は？
- 19) ND 1 遺伝子と D-loop 遺伝子両者に変異があった場合と両者とも変異がなかった場合の比較は行ったか？
- 20) 同一患者の腫瘍でも部位によって変異が違う可能性は？
- 21) 癌種によって ND 1 遺伝子の変異の頻度が違う理由は？

これらの質問に対して、学位申請者は自らの研究経験と文献的考察に基づき的確にわかりやすく回答し、研究の問題点と将来性を踏まえ詳細な説明を行った。今回の研究成果に基づいた今後の研究がさらに発展する可能性を示し、腎細胞癌の再発予測ならびに治療の個別化に大きく寄与することが期待された。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 金 伯士は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（医学）	谷口 俊恭	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	医学博士	貞廣 莊太郎	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士(医学)	岩崎 正之	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士(医学)	座光寺秀典	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士(医学)	宮嶋 哲	医学部准教	（医学研究科先端医科学専攻）