

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	416号	学位申請者	上川路 和人
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査	佐藤 雅美
	副査	橋口 照人	副査	畑中 一仁

主査および副査の5名は、平成29年2月15日、学位申請者 上川路 和人 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) *microRNA-29a (miR-29a)* 導入が細胞増殖を抑制する分子メカニズムについてどう考察するか。

(回答) 本研究で注目した *LOXL2* と *SERPIN1* は細胞の遊走や浸潤に関する報告が多い。*miR-29a* の核酸導入による増殖の低下は、Cyclin E 制御による増殖抑制や、p53 上昇を介したアポトーシス誘導による機序の報告がある。

質問2) 論文では *LOXL2* の細胞外の機能の記載はあるが、細胞内の転写の制御に関する機能はどうか。

(回答) 細胞外でのコラーゲンの成熟に関わる機能に加え、細胞内で E-cadherin の発現を抑制する機能を有し、癌の上皮間葉転換に伴う増悪 (浸潤、転移の促進) の機序の説明に重要である。

質問3) *miR-29a* 導入による遊走・浸潤に関わる以外の機能に関しては他の標的遺伝子によると考えているのか。

(回答) 増殖の抑制は、*miR-29a* 制御下の別の標的遺伝子の影響が大きいと考える。しかし *LOXL2* や *SERPIN1* によるコラーゲンの成熟で Extracellular matrix (ECM) が増生し、ECM 受容体を介して細胞増殖に影響する可能性はある。

質問4) 本研究は合併例での検討だが、肺癌単独症例、肺線維症単独症例で *miR-29a* の発現はどうか。

(回答) 肺癌、肺線維症それぞれの病態で *miR-29a* の発現の低下は報告されている。本研究では、肺線維症単独および肺癌単独症例での検討は行っていない。

質問5) 本研究により肺線維症と肺癌が合併する分子メカニズムの解明はできたのか。

(回答) *miR-29a* の発現低下は肺癌合併特発性肺線維症に特異的ではないが、両病態の疾患抑制型 microRNA として標的遺伝子を探索した。*LOXL2*、*SERPIN1* は肺癌、肺線維症双方の病態の進行への関与を示唆する結果が得られた。

質問6) 癌細胞の微小環境で *LOXL2* はコラーゲン、エラスチンの架橋形成に関わるのか。

(回答) *LOXL2* は癌微小環境でもコラーゲン、エラスチンの架橋形成に関わる。癌微小環境の重要な構成細胞として cancer associated fibroblast (CAF) がある。胃癌、大腸癌、乳癌で CAF における *LOXL2* の高発現が報告されている。

質問7) *miR-29a* が低下するメカニズムとして喫煙や薬剤の関与はあるのか。

(回答) 喫煙によって末梢血単核球中の *miR-29a* の発現低下した報告がある。*miR-29a* ではないが、アルコールによる *miR-29c* の上昇の報告がある。

質問8) 肺癌と肺線維症でいずれも *miR-29a* で低下しているが二つの病態での差異はないのか。

(回答) 肺癌、肺線維症の両病態で *miR-29a* の発現に差異はなかった。

質問9) 正常肺組織では *miR-29a* が抑制されていない。肺には種々の細胞があるが、細胞間での差異はないのか。

(回答) 現在は明確な知見がない。*in situ hybridization* や laser microdissection による解析が有用と考える。

質問10) 肺癌の組織型による違いで *LOXL2* と *SERPIN1* の免疫染色のパターンに差異はあるか。

(回答) 肺癌の組織型による違いで *LOXL2* と *SERPIN1* の発現に差異はなかった。

質問11) 肺線維症の fibroblastic foci とその他の線維化病変で *LOXL2* と *SERPIN1* の染色パターンに差異があるか。

(回答) *LOXL2*、*SERPIN1* いずれも fibroblastic foci での発現が強かった。

質問12) 肺線維症が肺癌の発生母地となる概念は従来からあるが、本研究で新たに判明した知見はあるか。

(回答) 本研究では、microRNA の概念を取り入れて解析し、*miR-29a* の発現抑制と *LOXL2*、*SERPIN1* の発現異常を見出した。肺線維症と肺癌に共通する microRNA の発現異常と、その microRNA の標的分子が両病態に関与することは新しい知見である。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 3) Table 2 に標的候補として挙げた 24 遺伝子の中からなぜ *LOXL2*、*SERPIN1* を選択したのか。

(回答) 線維化の病態では筋線維芽細胞の増殖とコラーゲンをはじめとする ECM の産生亢進が重要である。近年 ECM による癌細胞へのシグナル伝達も注目されている。よって ECM に特に関連が深い *LOXL2*、*SERPIN1* に着目した。

質問 1 4) 本研究の標的遺伝子の選択が妥当なら、リスト中にこれまで報告されているものが出てくるのではないか。

(回答) リスト中の *TRIB3* は肺癌でアポトーシスの抑制により癌促進に機能し、強皮症モデルでは TGF- $\beta$  と共同して線維化を促進するとの報告がある。*RCC2* や *SI00A16* の肺癌における高発現は予後不良因子であるとの報告がある。

質問 1 5) *miR-29a* は治療過程で変化するものなのか。

(回答) 肺癌や肺線維症の治療過程で *miR-29a* 変動を検討した報告は我々が検索した範囲内でなかった。

質問 1 6) *LOXL2* および *SERPIN1* の染色体における局在部位はどこか。

(回答) ヒトでは *LOXL2* は 8p21.3、*SERPIN1* は 11q13.5 に存在している。

質問 1 7) *LOXL2* および *SERPIN1* の染色体異常が、癌や線維症の発症や進展に関与した報告はあるか。

(回答) *LOXL2* および *SERPIN1* の遺伝子増幅や Loss of heterozygosity (LOH) と、線維症および癌の発症や進展に関する報告は、我々が検索した範囲ではなかった。

質問 1 8) *LOXL2*、*SERPIN1* の splicing variant や 3'UTR の欠失等で *miR-29a* による制御が変化する可能性はあるか。

(回答) 可能性はある。*miR-29a* の結合部位に変異が生じた場合も同様に、*miR-29a* の制御が変化すると思う。本疾患での *LOXL2* と *SERPIN1* の変異の程度は、次世代シーケンサーによる臨床検体の解析で解明が可能と考える。

質問 1 9) microRNA が作用するのはスプライシング前かそれとも後か。

(回答) microRNA は転写や翻訳、選択的スプライシングなど様々なプロセスを制御することが報告されている。

質問 2 0) *miR-29a*、*LOXL2*、*SERPIN1* の肺癌と肺線維症の共通病態における重要性を示すためにはどうするか。

(回答) *miR-29a* のノックアウトマウスにより肺線維症、肺癌の自然発症が生じ、それを *miR-29a* の補充により抑制することが確認できれば、病態に重要な分子経路である証明になる。

質問 2 1) *miR-29a* ノックアウトマウスは長期に見たら肺癌が発生するのか。

(回答) 肺癌や肺線維症についての報告はない。肝線維化は *miR-29* ノックアウトマウスで増強した報告がある。

質問 2 2) *miR-29a* の治療実験の報告はあるのか。

(回答) プレオマイシン肺線維症モデルにおいて *miR-29* の補充が有用であったとの報告がある。

質問 2 3) 化学療法による薬剤性肺線維症と特発性肺線維症の病態に差異はあるのか。

(回答) 薬剤性の肺障害は種々の病型があるが、線維症を呈した場合、画像、病理所見は類似しており、鑑別は困難である。薬剤性の診断は、被疑薬の投与歴や肺線維症発症の時間的な関連性を把握することが重要である。

質問 2 4) *miR-29a* を線維芽細胞に導入すると遊走や浸潤を抑制する実験結果は肺線維症の病態を反映するのか。

(回答) 線維芽細胞から形質転換した筋線維芽細胞の増殖や運動能の亢進、コラーゲン産生の亢進は肺線維症の病態形成に重要である。よって本研究の結果は肺線維症の病態を反映すると思う。

質問 2 5) コラーゲンやエラスチンの産生亢進と線維化は関連するのか。

(回答) コラーゲンやエラスチンは、線維化で産生が亢進する ECM の主要な構成成分であり関連する。

質問 2 6) コラーゲンが増えたとなぜ癌細胞の浸潤が促進されるのか。

(回答) コラーゲン等の増生に伴う高硬度の ECM は、ECM 受容体であるインテグリンを介したシグナルを増強し、癌細胞の増殖や浸潤能を亢進させる。また ECM の増生による TGF-beta1 シグナルの増強も癌細胞の浸潤に関与する。

質問 2 7) Figure 4 に関して、*LOXL2* や *SERPIN1* のウエスタンブロットは同一のシートでの評価か。線維芽細胞と肺癌でこれらの遺伝子の発現に差異はあったか。

(回答) *LOXL2*、*SERPIN1* は同一のシートで評価している。ただし、肺癌細胞と比較し肺線維芽細胞では *LOXL2*、*SERPIN1* ともに高発現であったため、検出時間の設定を変えている。

質問 2 8) 肺癌は肺線維症を発生母地とするという仮説を支持する、肺線維症と遺伝子異常に関する報告はあるか。

(回答) p53 の LOH や multiple mutation が、特発性肺線維症における肺癌合併と関連するとの報告がある。

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。