

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 438 号	学位申請者	高木 弘一
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	上村 裕一	副査 宮田 篤郎
	副査	垣花 泰之	副査 原 博満

主査および副査の5名は、平成30年2月19日、学位申請者 高木 弘一 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) IL-13, IL-4は肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 患者で上昇しているか。

(回答) 寄生虫による PAH では血中での IL-4 や IL-13 の上昇はあるが、特発性や膠原病性の PAH では上昇との報告はない。しかし、特発性及び膠原病性 PAH 患者の肺血管内皮細胞で IL-4 および IL-13 受容体のシグナル分子である STAT6 のリン酸化亢進を認めた報告があり、IL-4 および IL-13 が関与している可能性が考えられる。

質問2) PAH 患者の肺組織の免疫で IL-4, IL-13 受容体の発現は亢進しているか。

(回答) 今回の研究では確認を行っておらず、また既報での報告も検索範囲内ではない。今回の研究では他臓器の血管内皮細胞と肺血管内皮細胞で IL-13 受容体の発現について確認を行ったが、明らかな発現の違いは認めなかった。

質問3) EndoMT 及び遊走能に対する影響は miR-424, miR-503 のどちらがより大きいか。

(回答) miR-424 と miR-503 は X 染色体上の近接する遺伝子座に配置され、同じ転写因子、プロモーターの制御下におかれたクラスターとして発現しており、遺伝子配列も相同性があることから、働きに大きな差はないとされている。

質問4) 血管内皮細胞は形態変化をすると、サイトカイン産生などの機能も変化するか。

(回答) EndoMT により内皮細胞から産生される eNOS が減少するなどの報告があり、サイトカイン産生能も変化する事が推察される。

質問5) 住血吸虫で PAH が起こる機序について今回検討したか。

(回答) 今回の研究では検討していないが、既報では血管内に寄生した住血吸虫が肺血管まで到達し、肺血管や気道上皮を刺激し、IL-33 を産生することで肺内自然リンパ球から IL-13 発現を促し PAH が起こることが報告されている。

質問6) Discussion で中枢側のみだけでなく、肺血管末梢側由来の血管内皮細胞での実験も加えるべきと記載があるが、具体的にはどのようなことか。

(回答) PAH では末梢側の肺血管変化が病態への関与が報告されている。そのため、中枢側のみだけでなく、末梢の肺血管由来の血管内皮細胞を用いての実験も今回行った。しかし、増殖速度などの問題もあり、安定した結果が得られなかったため、今回は中枢側の肺血管内皮細胞での評価とした。今後、末梢側の肺血管内皮細胞での研究も必要と考える。

質問7) PAH の主体である血管平滑筋細胞に IL-13 が与える影響はあるか。

(回答) 今回の研究では平滑筋細胞については検討を行わなかった。肺血管内皮細胞が IL-13 により内皮間葉移行をきたし、血管狭窄を起こすことで血行動態のストレスが生じ、平滑筋の増殖に関与している可能性は考えられる。

質問8) IL-13 などの Th2 サイトカインによる炎症をステロイドや免疫抑制剤でコントロールすると、今回の経路による PAH の発症と進行は抑えられるか。

(回答) PAH の発症機序として炎症と変性、増殖などの複数の機序が考えられており、炎症のみを抑えることでは十分な治療効果は得られないと考えられる。また、IL-13 シグナルの一部はステロイド抵抗性であるとの報告もある。

質問9) 今回の経路で将来的な治療標的はどこと考えるか。IL-13 ではなく、mTORC2 を直接標的とすることは可能か。

(回答) 我々は、IL-13 や IL-13 受容体を主に治療標的として考えている。mTORC2 も標的になりうると思うが、mTORC2 を直接強く阻害することにより副作用の発現も予測されるため、mTORC2 と miR-424/503 間の negative feedback の破綻に関与が考えられる IL-13 の反応を標的とする方が今回の結果では望ましいと考える。

質問10) 実際の臨床の場合では、既に進行した肺高血圧患者が多いが、肺血管壁が既に肥厚した症例でも IL-13 による反応を抑制すると治療効果が期待できるか。

(回答) 重症化した肺動脈性肺高血圧症では、肺血管の狭窄による血行動態のストレスが疾患増悪の悪循環を招いていると指摘されており、IL-13 を標的とした治療の他に、既存の肺血管拡張薬による治療が優先されるかもしれない。重症例でも、既存の治療に IL-13 を標的とした治療の上乗せ効果が期待できる可能性がある。

質問11) P. 278 本文中の文献 [51] の記載では hypoxia で miR-503 が downregulate されるが、[52] では hypoxia で miR-424 が upregulate されるとの記載がある。これらの記載は正しいか。

(回答) [51] [52] の論文を再確認した。ともに記載通りの結果であり、相反する報告となる。しかし、[51] では肝細胞癌、[52] では正常の血管内皮細胞を用いた実験であり、細胞種類の違いや癌化の有無により反応が異なる可能性も考え

最終試験の結果の要旨

られる。自験例では hypoxia にてヒト臍静脈細胞 (HUVEC) で miR-424 と miR-503 の発現はいずれも亢進を認めた結果が得られており、これに癌細胞での実験を加えて、既報の結果について検証を行うべきかもしれない。

質問 1 2) introduction では Th1 系のサイトカインがより重要である印象であるが、今回の実験では Th1 系の IL-1 β や TNF α で逆の反応なのは何故か？ 先行論文では mTORC2 が EndoMT と関連していることの報告があるか。

(回答) 今回の研究では IL-1 β と TNF α の濃度の影響もあった可能性がある。また、既報では IL-1 β や TNF α 単独で EMT や EndoMT は起こりにくく、TGF β など他のサイトカインとの共刺激により起こるとした報告が主であり、今回は単独刺激のため反応が起こらなかった可能性も考えられる。また、mTORC2 と上皮間葉移行 (EMT) に関する既報はあるが、mTORC2 と EndoMT の関係を明らかにした報告は検索した範囲ではない。

質問 1 3) Rictor の発現が上がることで mTORC2 の活性化するのか。他に活性化を起こす機序があるのか。

(回答) 既報として、Rictor を過剰発現させることで mTORC2 の下流の Akt のリン酸化による活性化が認められており、Rictor の発現が上がるだけで mTORC2 の活性化が起こると考えられる。また、mTORC2 の構成蛋白である SIN1 の発現を減弱することで mTORC2 の機能が減弱することが既報で認められており、mTORC2 の活性化への関与が考えられる。

質問 1 4) IL-13 が PI3K - Akt 経路を直接活性化しうるか。

(回答) 既報では、デコイレセプターとされていた IL-13 受容体 $\alpha 2$ が肺癌細胞において PI3K を活性化とするとした報告や、大動脈平滑筋細胞で IL-13 が PI3K を直接活性化するとした報告があり、今回の研究で検証はしていないが、IL-13 が miR424/503 や Rictor を介さずに PI3K-Akt 経路を活性化する可能性はある。

質問 1 5) mTORC2 活性化の指標は Akt (Ser473) リン酸化の他ににあるのか。

(回答) 今回の研究では mTORC2 と特に関連がある Akt (Ser473) のリン酸化にて確認を行った。この他の指標として Akt 活性化の指標としての Thr308 や、PKC α や SGK1 などがあるが、今回は確認を行わなかった。

質問 1 6) IL-13 で mTORC1 の pathway は動かないか。

(回答) mTORC1 は Akt の下流に位置しており、Akt のリン酸化による活性化により mTORC1 の pathway も動くことが予測されるが、今回の研究では検討を行わなかった。

質問 1 7) IL-13 と HDAC4/5 のリン酸化抑制のメカニズムについて。

(回答) 今回の研究においてはメカニズムを解明できなかった。脱リン酸化の可能性も含めて今後の研究課題とする。

質問 1 8) HDAC の今回の反応はどのようなときにおこるのか。hypoxia などの他の要因が関連しているのか。リン酸化を抑制するのか、それとも脱リン酸化なのか。

(回答) 既報の一つでは、cAMP シグナル伝達系により HDAC5 が脱リン酸化を受け、核内移行が促進されるとした報告や、DAMPs である Apelin が HDAC のリン酸化を亢進させた報告がある。また、hypoxia で核内での HDAC5 の発現が亢進し HIF-1 発現を誘導するとした報告もあり、HDAC のリン酸化に hypoxia が関連している可能性も考えられる。

質問 1 9) HDAC Inhibitor (TSA) の作用機序は本当に HDAC 自体の発現を減弱させるのか。

(回答) TSA は HDAC の活性を阻害する試薬で、HDAC 自体の発現を変化させることはないと考えられる。今回 TSA による HDAC4 発現減弱があったことについて他因子の影響が関与した可能性もあり、再度検証を行うべきかもしれない。

質問 2 0) 今回の経路において、HDAC4/5 いずれの影響が大きいか。

(回答) 今回の研究では、どちらの影響が高いか明らかにはできなかった。HDAC4/5 は相同性が高いこともあり、その作用の程度は変わらない可能性がある。

質問 2 1) 今回、EndoMT による肺血管内皮細胞の形態変化はみているか。

(回答) tube formation assay にて血管形成の変化について確認をした。IL-13 により血管形成が抑制されたことで、内皮細胞から間葉系細胞に形質変化していることが示唆された。

質問 2 2) EndoMT の反応が劇的ではないので、細胞の反応には細胞毎で違いがあるのか。

(回答) IL-13 受容体の発現は細胞毎で違うことが報告されており、その影響も考えられた。

質問 2 3) Fig2F において、siRictor で STAT6 の発現が低下する機序について。

(回答) 今回の研究で十分に検証しておらず、今後検討する予定である。

質問 2 4) HDAC のリン酸化に影響する因子は明らかになっているのか。IL-13 はリン酸化を抑制するのか、それとも脱リン酸化を亢進するのか。

(回答) cAMP シグナルによる脱リン酸化などの報告があるが、IL-13 による HDAC リン酸化抑制機序については今回の研究では明らかにしておらず、今後の研究課題としている。

質問 2 5) STAT6 のリン酸化によって Rictor の発現が亢進することによって、EndoMT が説明できるか。

(回答) リン酸化された STAT6 が核内移行し、直接 Rictor の発現を亢進するかについて確認は行っておらず、今後追加実験を行い検証する方針とする。

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。