

最終試験の結果の要旨

報告番号	総論第	37号	学位申請者	水野 圭子
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	佐藤 雅美	副査	古川 龍彦
	副査	久保田 龍二	副査	原 博満

主査および副査の5名は、平成31年3月26日、学位申請者 水野 圭子 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) 7つの候補遺伝子から *LOXL2* を選んだ理由はなにか。

(回答) *miR-29s* をトランスフェクションした際に最も発現が抑制されていたためである。他癌腫でも機能解析が行われていたが、肺扁平上皮癌での働きは解明されていなかったため *LOXL2* を選択した。

質問2) Micro array 解析に EBC-1 細胞のみを用いたのはなぜか。

(回答) EBC-1 細胞に *miR-29s* をトランスフェクションすると浸潤、遊走を強く抑制するため、特に浸潤、遊走に関与する遺伝子を検索するために EBC-1 細胞を選択した。

質問3) *miR-29* family は発癌に関与するのか、進行・転移などの late phase で関連しているのか。

(回答) これまでの報告によると発癌の初期および、進行・転移などの進行期のいずれでも関与すると考えられる。

質問4) 臨床検体で病期毎の *miR-29* の発現に差異はないか、差がないのであれば *miR-29* は発癌に関与しているのではないか。

(回答) 今回の研究では病期毎の差異ははっきりしなかったが、検討した症例数が少なく、はっきりと差がないとは言えない。これまでの報告からも発癌以外にも関与していると考えている。

質問5) 肺癌で *miR-29* が低下する機序を示せ。

(回答) ゲノムの異常やエピジェネティックな変化、転写レベルでの変化およびプロセッシング過程での変化などが考えられるが、どの過程で最も大きな変化が起こっているかは明らかになっていない。

質問6) 免疫染色に用いた癌部、非癌部は同一症例の検体か。

(回答) 同一症例ではない。

質問7) *miR-29* を測定する際、測定した数値はどのように標準化したのか。

(回答) 内在性コントロール (*RNU49*) との比率で標準化した。

質問8) *KRAS*, *p53*, *PD-L1* と *miR-29* を含めた microRNA は関連するのか。

(回答) *KRAS* は *miR-140-5p*, *miR-143-3p*, *miR-1224-5p* などと関連する報告があるが、*miR-29* との関連はまだ報告されていない。*p53*, *PD-L1* は *miR-29* と関連しているという報告がある。

質問9) Figure 1 において *miR-29b-1* と *29b-2* の区別はしているのか。

(回答) 区別していない。プライマーのセッティングによっては区別することも可能と考える。

質問10) *miR-29a* は染色体 7q, *miR-29c* は染色体 1q に存在する遺伝子だが、発現量が相関しているのはなぜか。

(回答) 同じ発現制御のメカニズムがそれぞれのプロモーター領域に働いている可能性があると考えている。直接的な証明はできていない。

質問11) Figure 5 における、ルシフェラーゼアッセイで *miR-29a, b, c* のトランスフェクションはルシフェラーゼ発現抑制に対する相乗効果があるのか。

(回答) 不明である。この実験では、サイト毎に *miR-29s* の直接結合を確認することを目的としているため、少しでも抑制が起こることで実験としては十分と考えたので、相乗効果を確認する同時の核酸導入は行っていない。

質問12) *LOXL2* のタンパク発現と *miR-29s* の発現に症例毎の相関はないか。

(回答) 今回は検討していない。

質問13) *LOXL2* は治療標的になりうるか。

(回答) なりうると思う。すでに抗体製剤や siRNA 製剤が開発されている。

最終試験の結果の要旨

質問 1 4) 肺線維症と肺扁平上皮癌に共通するバックグラウンドとは何か。

(回答) いずれの疾患も喫煙者、男性、高齢者に多い。

質問 1 5) 浸潤アッセイを行っているが、基底膜の通過を確認するような実験があるか。

(回答) *in vitro* での実験では難しいと考える。必要であれば *in vivo* での検討となるだろう。

質問 1 6) Figure 2 について *miR-29* は増殖を抑制していると考えているのか。

(回答) 増殖を抑制する力は弱いと考えている。

質問 1 7) Figure 7 について *si-LOXL2* が増殖を抑制していると考えているのか。

(回答) 同様に増殖を抑制する力は弱いと考えている。

質問 1 8) 増殖に関与していないのに、*LOXL2* をがん遺伝子と言ってよいのか。

(回答) *LOXL2* は、がんの発生というよりはむしろ浸潤・転移を促進させると考えられている。がん遺伝子ではなく、がん関連遺伝子、がん促進型遺伝子と考えている。

質問 1 9) *LOXL2* の遺伝子変異とがんの関連の報告はあるか。

(回答) がんとの関連は明らかになっていないが、頭蓋内動脈瘤や mid-dermal elastolysis との関連は報告されている。

質問 2 0) *LOXL2* の機能について、分泌型もあるか。細胞内、外のどちらで機能するか。

(回答) 分泌型の存在も明らかになっており、細胞内外のいずれでも機能している。

質問 2 1) *in vitro* で recombinant *LOXL2* を用いた実験はしていないのか。

(回答) 本研究では機能獲得実験は行っていない。Recombinant *LOXL2* は用いていない。

質問 2 2) *in vivo* のデータはないのか。

(回答) 本研究では *in vivo* の実験は行っていない。

質問 2 3) 酵素活性が作用に重要なのか、不活性化が治療につながるのか。

(回答) リシルオキシダーゼの酵素活性は *LOXL2* の作用において重要であると思われる。そのため抗 *LOXL2* 抗体が肝、腎、肺の線維症治療薬として開発中である。

質問 2 4) *LOXL* のサブタイプ 1-4 の機能について述べよ。

(回答) *LOX* family は *LOX* および *LOXL-1~4* から成る。リシルオキシダーゼはエラスチンやコラーゲンの架橋に関与しており、*LOX* 遺伝子欠損マウスは生後すぐに大動脈が破れて死亡する。*LOX* family はいずれも弾性繊維の形成に関わり皮膚や肺の形成に重要な役割を果たしている。

質問 2 5) 他の *LOXL* と *miR-29* との関連、*LOXL2* 以外の *LOX* family を確認したか。

(回答) *LOX* との関与は報告されているが、*LOXL1, 3, 4* との関連は明らかになっていない。

質問 2 6) コラーゲンの架橋に *LOXL2* がどのように関連するか。

(回答) *LOX* family がエラスチンやコラーゲンの架橋に必須なものであることはわかっていたが、その詳細は不明であった。エラスチンについては分泌されたトロポエラスチンが凝集したところにリシルオキシダーゼが作用し、リジン残基の側鎖同士が架橋され、伸縮可能なエラスチンとなることが知られている。近年、コラーゲンについてもコラーゲン IV 分子が N 末端 7S ドメインで *LOXL2* を介した共有架橋によって安定化されることが明らかとなった。

質問 2 7) *LOXL2* と浸潤についての考察はあるか。

(回答) 本研究の考察では主に転移について言及しているが、転移とは、腫瘍細胞が宿主組織に浸潤し、特異的な遠隔臓器へと転移する能力を意味すると考え、転移も浸潤も癌周囲の微小環境においては同様の機序から発生すると考えた。今後は転移と浸潤を分けて検討することも考えたい。

質問 2 8) がんと炎症が結びつくのか。

(回答) 炎症と癌の発生で理解しやすいのは喫煙による肺炎症と肺癌の促進である。喫煙は肺癌の主な原因である一方、肺での炎症を引き起こすこともよく知られている。長時間の喫煙曝露が好中球やマクロファージにおける *IKKβ-NF-κB* 経路を介する持続的な肺炎症を引き起こしそれが肺癌促進に関与していることが報告されている。

質問 2 9) *LOXL2* の下流に *NF-κB*, *c-Myc* があるか。

(回答) インテグリンを介した *FAK/SRC* 経路の下流に *NF-κB*, *c-Myc* がある。また *NF-κB*, *c-Myc* は *miR-29* を転写レベルで抑制することが知られている。

質問 3 0) 2つの細胞株で *miR-29s* が低下している理由はわかっているのか。

(回答) 本研究では検討できていない。今後、他の細胞株での検討も含め、*miR-29s* が低下する原因を探究することがさらなる機能性 RNA ネットワークの解明にも繋がると考える。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。