

博士學位論文

内容の要旨及び審査結果の要旨

第40号

2016年3月

京都産業大学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 28 年 3 月 19 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1 . 小谷 友理	〔博士（生物工学）〕	1
2 . 森 勇伍	〔博士（生物工学）〕	5
3 . 吉田 亜佑美	〔博士（生物工学）〕	11
4 . <small>オントン パーワレッド</small> Ontong Pawared	〔博士（生物工学）〕	17
5 . 佐々木 大樹	〔博士（生物工学）〕	21
6 . <small>スントンスイット ジーラワット</small> Soonthornsit Jeerawat	〔博士（生物工学）〕	27

論文博士

1 . 上野 信洋	〔博士（生物工学）〕	31
-----------	------------	-------	----

氏名（本籍）	上野 信洋（滋賀県）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	乙工第7号
学位授与年月日	平成28年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	Studies on Fibroblast Growth Factor Receptor 3 IIIc in Esophageal cancer. （食道がんのFGFR3 IIIcに関する研究）
論文審査委員	主 査 瀬尾 美鈴 教授 副 査 中田 博 教授 " 佐藤 賢一 教授

論文内容の要旨

線維芽細胞増殖因子(FGF)とその受容体(FGFR)は、細胞増殖、分化、遊走、生存など多彩な生理作用を制御している。FGFはヒトでは22種類の異なる遺伝子に、FGFRは4種類の異なる遺伝子にコードされている(FGFR1~FGFR4)。FGFRは細胞外に3個の免疫グロブリン様ドメイン(Ig)、細胞膜貫通部位、細胞内にチロシンキナーゼドメインを持つ。FGFがFGFRの2番目と3番目のIgに結合すると、FGFRの自己リン酸化が誘導され細胞内にシグナルが伝達される。FGFR1からFGFR3のN末端から3番目のIgは異なったエクソンIIIbとIIIcにコードされており、組織特異的な選択的スプライシングによりIIIbアイソフォームまたはIIIcアイソフォームを生じる。IIIbアイソフォームは主に上皮系細胞に発現し、IIIcアイソフォームは主に間葉系細胞に発現している。

さまざまながんにおいて線維芽細胞増殖因子(FGF)とその受容体(FGFR)の変異、発現異常はがん悪性化に関与している。脳腫瘍においてFGFR1のキナーゼドメインの点変異により恒常的に活性化し、膵臓がんにおいてはFGFR2IIIcの発現上昇が、がん細胞の細胞増殖を亢進することが報告されている。FGFR3の変異や発現上昇は主に多発性骨髄腫、大腸がん、膀胱がんの悪性化に関与していることが報告されており、様々ながんにおいてFGFR3は分子標的薬のターゲット分子として期待されている。日本における食道がん患者の90%以上は扁平上皮がんである。食道がんの生存率は他の消化器系がん(胃がん:約60%、大腸がん:約70%)と比較して30%と低く、

効果的な治療薬の開発が必要である。

本論文において、未だ報告されていない食道がん患者のがん組織における FGFR 選択的スプライシングアイソフォームの発現異常について検証した。食道がん患者の非がん性粘膜とがん部位の凍結試料を用いて RT-PCR 法により FGFR の mRNA 発現頻度を比較した。その結果、非がん性粘膜において FGFR3IIIc の mRNA 発現頻度が 38% (6 例/16 例) に対してがん部位で 75% (12 例/16 例) を示し、がん部位は非がん性粘膜と比較して FGFR3IIIc の mRNA 発現頻度が 2 倍上昇していた。一方、FGFR3IIIb の mRNA 発現頻度は非がん性粘膜で 69% (11 例/16 例)、がん部位で 75% (12 例/16 例) を示し、がん部位と非がん性粘膜における FGFR3IIIb の mRNA 発現頻度はほぼ同程度を示した。また、他の FGFR アイソフォーム (FGFR1IIIb、FGFR1IIIc、FGFR2IIIb、FGFR2IIIc および FGFR4) の発現頻度は非がん性粘膜とがん部位とで差は認められなかった。食道がんにおける FGFR3IIIc 発現頻度の上昇が他の消化器系がんにおいても生じるかどうか検証するため、大腸がん (18 例) および胃がん患者 (15 例) の凍結試料を用いて FGFR3IIIc 発現について同様に検証した。しかし、大腸がんおよび胃がんのがん部位において、非がん性粘膜と比較して FGFR3IIIc 発現頻度の上昇は認められなかったことから、消化器系がんの中で食道がんのみにおいて FGFR3IIIc の発現頻度が上昇していることが示唆された。大腸がんにおいてがん部位における FGFR3IIIb の発現頻度 (11 例/18 例, 61%) が非がん性粘膜 (5 例/18 例, 28%) と比較して上昇していたことから、大腸がんにおいて FGFR3IIIb の発現は大腸がんの悪性化に関与している可能性が示唆された。

食道がん患者のがん細胞で FGFR3IIIc が実際に発現しているかどうかを明らかにするため、食道がん患者由来のがん組織パラフィン切片を用いて FGFR3IIIc 特異的モノクローナル抗体による免疫染色法で、FGFR3IIIc の発現を検討した。その結果、stage0 のがん組織において SCC-112 (扁平上皮がん細胞マーカー) 陽性細胞に FGFR3IIIc の発現が認められたことから、がん細胞が FGFR3IIIc を発現していることが示された。また、stageIA、stageIB、stageIIB および stageIIIA のがん組織においてもがん細胞に特異的に FGFR3IIIc の発現が認められた。さらに、FGFR3IIIc を発現する細胞は細胞増殖のマーカーである Ki67 陽性であったことから、FGFR3IIIc は細胞増殖能を亢進することにより、がんの悪性化を促進している可能性が示唆された。FGFR3IIIc 発現が食道がんにおける細胞増殖能の亢進に貢献している可能性について、食道がん細胞株 EC-GI-10 を用いた遺伝子強制発現実験により検証した。FGFR3 の非翻訳領域を標的とした siRNA を用いて EC-GI-10 細胞の内在性 FGFR3 をノックダウンすることにより (siFGFR3 細胞)、sicontrol 処置群と比較して細胞増殖能が約 25% 抑制されたことから、食道がんの細胞増殖能に FGFR3 が関与している可能性が示唆された。また、siFGFR3 細胞に FGFR3IIIb (FGFR3IIIb 細胞) または FGFR3IIIc (FGFR3IIIc 細胞) を強制発現させ、それぞれのアイソフォームの細胞増殖能の亢進作用について検討した。FGFR3IIIc 細胞の細胞増殖能は、siFGFR3 細胞と比較して有意に亢進したが (約 1.4 倍)、FGFR3IIIb 細胞の細胞増殖能の亢進は認められなかった。食道がん患者のがん部位および EC-GI-10 細胞で FGFR3IIIc 特異的なリガンドである FGF2 の mRNA 発現が確認されたことから、

FGFR3IIIc 細胞の細胞増殖能の亢進は FGF2 などの FGFR3IIIc 特異的に結合する FGF のオートク
ライン効果である可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、消化器系がんの中でも特に予後の悪い食道がんにおいて線維芽細胞増殖因子受容体 FGFR3IIIc アイソフォームが高い頻度で発現すること、および FGFR3IIIc アイソフォームが食道がん細胞の増殖を促進することを示した。これらの知見は、がん化過程において細胞の増殖を制御する遺伝子の選択的スプライシングが変化することにより、正常では入力されない増殖シグナルが細胞に入り、正常上皮細胞ががん化し細胞増殖が活性化されることについて分子レベルでの機序を説明する興味深い知見である。また、FGFR3IIIc が食道がんの細胞増殖に関わるドライバー遺伝子として働き、創薬のターゲットおよび診断マーカーとして有望であることも示しており、がん治療の新しい治療薬としても期待できることをも示す研究成果である。

以下、本論文の審査過程について記す。1月20日開催された研究科会議において本調査の開始が承認された。その後、2月3日に主査、副査2名により論文調査に関わる協議を行った結果、主査と副査1名は合格、副査1名は不合格と判定した。合格とした主査、副査のポイントは、がんの治療と診断を目的とする研究において、1)がんの分子標的の発見と分子標的薬の開発は最重要課題である、2)様々ながん腫別の標的分子を同定することは、がんの早期発見につながり、副作用の少ない抗がん剤の開発に役立つ、3)本論文は、上記の目標につながる重要な発見を含むとの観点から、本論文は博士論文としての条件を満たしていると判定した。一方、不合格とする意見は、1)用いた実験方法では研究成果の検証が十分に行えていない、2)実験データの解釈が不十分である、3) 実験データの分量と掘り下げ度が十分ではない、の3点に基づくものであった。1)については、PCR 産物の電気泳動写真の全体像を掲載していないこと、FGFR3IIIc だけではなく、FGFR3IIIb についての特異的抗体を用いたタンパク質発現の検証が必要である等の主張であった。また、3)については、本論文で分子標的とした FGFR3IIIc がなぜ食道がん細胞の増殖を促進するのか、その分子メカニズムすなわち細胞内シグナル伝達について追加の解明を求めるものであった。

3者間の協議では、合意に至らなかったため、2月4日に開催された研究科長、大学院委員、主査を含む主任会議構成員による会議で新たに2名の追加調査委員を決定し、博士論文の調査を依頼した。2月12日に、研究科長の司会により、主査、副査2名、大学院委員と2名の追加調査委員を含む協議会を開催した。1名の調査委員は研究成果の意義を認め合格とした、もう1名の調査委員は、主に研究の手法とデータ解釈の正当性についての説明を求めたが、合否判定については協議会の結果に委ねるものとした。主査、2名の副査からもこれまでの調査に基づく意見が付された。協議会の議論においては、本論文はがん診断・治療に関わる新規でかつ重要な知見を得ている一方で、研究手法および一部のデータ解釈に改善の余地があった。協議会では、本論文をもって公聴会に臨むこと、また、論文を修正した上で再度、予備調査から審査を行うことの可能性について議論したが、最終判断は主査に委ねられた。主査は申請者との相談の結果、公聴会に進み審査を受けることとし、その旨を大学院委員に報告した。

2月18日に開催された公聴会で申請者は、食道がんの早期発見と治療を目的として、腫瘍マーカー分子の同定およびそれを分子標的としたがん治療の可能性についての研究成果を発表した。この発表に対して、主に研究方法とデータに関して結論を導き出すまでの過程に関する質問があった。これらの質問に対して、申請者は、研究の背景と目的、さらに採用した実験方法とそれから得られたデータ、また補足的な実験結果なども含めて、導き出した結論の妥当性について適切に説明した。発表後の専攻会議において投票により合否判定が行われ、賛成多数で本論文は合格と判定された。また、同日行われた英語の学力試験においても、博士として十分な英語の学力を持つと判断された。

以上の結果から、本論文は博士学位を受けるに十分な内容を持つものと判定された。