

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 374 号	学位申請者	畠中 美帆
審査委員	主査	古川 龍彦	学位
	副査	小澤 政之	副査
	副査	中川 昌之	副査
			夏越 祥次

主査および副査の5名は、平成28年3月31日、学位申請者 畠中 美帆 君に面接し、学位審査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) エキソソームマーカーとして用いた CD81 はメラノーマ細胞を特異的に認識しているのか。

(回答) CD81 はメラノーマ細胞以外のエキソソームマーカーとしても用いられており、メラノーマ細胞の特定のマ  
ーカーではない。

質問2) エキソソーム中には miRNA などが含有されているが、今後、エキソソームを用いた in vivo の実験で何か予  
定していることはあるのか。

(回答) 今後、検討したい。

質問3) 参考文献によるとメラノーマ患者のエキソソームの血中濃度が高いと予後が悪いという報告があるが、将来的  
に、エキソソームを臨床的に何かのマーカーとして用いたいと考えているのか。

(回答) 悪性腫瘍患者の予後や悪性度の指標になりうると考えている。

質問4) 今回の実験で MMP2 以外との関連は検討したのか。

(回答) 検討していない。

質問5) 報告している MMP1、MMP2、MMP3、MT1-MMP 以外に、メラノーマと MMPs との関連について文献的に  
どのような報告があるのか。

(回答) MMP9 の発現の程度と、悪性黒色腫細胞の浸潤能は相関しているという報告がある。

質問6) A375 細胞の由来は何か。

(回答) ヒト由来である。

質問7) エキソソームやマイクロベジクルの電顕固定を行う際にはアガーに埋めたのか。

(回答) 埋めていない。オスミウムで固定した。

質問8) 肉眼的に確認できるほどペレットは回収できたのか。

(回答) 肉眼的にペレットが確認できるようになるまで、回収する培養上清の量を増やした。

質問9) オスミウム固定液を加えると、沈殿物が広がり見えなくなることはなかったのか。

(回答) なかった。

質問10) ゼイモグラフィーでバンドは2個出現したか。

(回答) 2個出現する場合もしない場合もあった。

質問11) Shed form の CD147 がオートクライン的に自身の細胞に作用する可能性はあるか。

(回答) 可能性はあると思う。

質問12) Shed form の CD147 がオートクライン的に自身の細胞に作用するのかをみるには、どのような実験をした  
らいいと思うか。

(回答) MMP2 高発現の A375 細胞や切断部位を欠いた CD147 の発現細胞を用いれば傍証は可能と考える。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 3) Shed form の CD147 が線維芽細胞に作用し MMP2 産生のシグナルにつながるメカニズムは何か。レセプターなどがわかっているのか。

(回答) レセプターについては、まだ分かっていないが、CD147 が線維芽細胞に作用し、細胞内の p38 が活性化して MMP2 を産生するという報告はある。

質問 1 4) A375 以外の細胞を用いて実験を行ったか。

(回答) 行ってない。

質問 1 5) メラノーマ以外の癌細胞を用いた場合にも CD147 は線維芽細胞に作用し MMP2 産生を促進するのか。

(回答) 膠芽腫、乳癌、肝癌、卵巣癌、網膜芽細胞腫、大腸癌、胃癌などで報告がある。

質問 1 6) MMP2 以外の MMPs も産生が促進されるのか。

(回答) MMP1、3、9、14、MT1-MMP が促進されるという報告がある。

質問 1 7) CD147 の細胞外ドメインはどこが切れるのか。

(回答) 第 1 細胞外ドメインと第 2 細胞外ドメインの間で切れるという報告がある。

質問 1 8) 特定のアミノ酸で切れることが分かっているのか。

(回答) わかっている。

質問 1 9) 糖鎖修飾部位はどこか。

(回答) 細胞外ドメインに 3 か所ある。糖鎖付加反応の程度により分子量も変化する。

質問 2 0) 細胞間伝達機構にマイクロベジクルやエキソソームは関係があるといわれているが、今回の実験では MMP2 の活性化には関連がないということか。

(回答) そうである。

質問 2 1) Soluble の CD147 がメラノーマの患者の血中にでてきているのか。

(回答) 今回の実験では確認していない。

質問 2 2) CD147 の抗体を使った実験でメラノーマ細胞の浸潤が抑制されたとあったが、この抗体の効果を本研究でも確認したか。

(回答) 抗体は抗体研究所で作成されたものである。しかし、現在はないので確認できない。

質問 2 3) Soluble な CD147 を作って実験を行う予定はないのか。

(回答) 今後、検討したい。

質問 2 4) MMP2 の mRNA は増えているのか。

(回答) 確認していない。

質問 2 5) 定量化はどのようにしたのか。

(回答) イメージJという画像処理ソフトで CD147 と  $\beta$  アクチンのバンドの濃さを測定し比率を計測した。

質問 2 6) 上清にも 45 KDa のバンドが薄くでていますがどのような働きをしているのか。

(回答) はっきりわかっていない。今後検討したい。

質問 2 7) shCD147 で MMP2 や MT-1MMP などの発現はどうなるか検討したか。

(回答) 過去に、CD147 の抗体を用いると、ウエスタンブロッティングで MMP1、2、3、MT1-MMP の発現が減少したことを確認している。

質問 2 8) CD147 は膜型で発現したあと、どの酵素で細胞外ドメインが切断されるのか。

(回答) MT-MMP で切断される。

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。