

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 401 号	学位申請者	前田 光喜
審査委員	主査	佐藤 雅美	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	井戸 章雄	副査 橋口 照人
	副査	上野 真一	副査 古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成29年1月18日、学位申請者 前田 光喜君に面接し、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) Capan1M9はクローン化した細胞株であるか。もしくはバルクな細胞か。

(回答) Capan1M9はCapan1を9回 migration chamber を用いて選択し培養したもので、bulkな細胞と言える。shCD133M9についてもLentiウイルスが導入された細胞をFACSで選択したものでありbulkであると言える。

質問2) Luciferase assayで使用した細胞株はクローン化した細胞株か。

(回答) Capan1M9とshCD133M9にCignal Lenti Reporter (SABioscience)を用いてHRE-reporterを導入した。HRE-reporter geneを恒常的に発現するものだけをpuromycinを用いて選択した。よってバルクな細胞株と言える。

質問3) HIF-1 α のWestern blotは核タンパクを選択的に行ったものか。

(回答) Whole cell lysateで行った。

質問4) Capan1を低酸素にした場合にCD133陽性細胞の数が増えるのか。それともCD133陽性細胞の割合が増加するのか。Fig. 1Dにおいては、低酸素でCD133の発現が減少しているが、増加するものではないのか。

(回答) Fig. 1Aの結果のとおりCapan1を低酸素にした場合、CD133陽性細胞の割合が増加する。Fig. 1Dについては、Capan1ではなく、Capan1M9およびshCD133M9を用いてCD133とHIF-1 α をみたものである。低酸素においてCapan1M9におけるCD133のタンパク量は減少していた。

質問5) Wound healing assayのrelative open wound areaの意味はなにか。

(回答) 0時間のopen wound areaと比較して、wound healing areaの割合をrelative open areaとして算出した。例えばCapan1M9の48時間時にはwound healing areaは0時間のopen wound areaと同じであるため1.0となる。

質問6) HIF-1 α の半減期は短くユビキチン化による分解系で調節されるが、CD133が発現レベルを上げるだけでHIF-1 α の発現に影響を及ぼすことが可能であるか。

(回答) 肺癌の腫瘍内は低酸素にあることが知られており、HIF-1 α のユビキチン化による分解系の作用が弱い環境であると言える。そのため、HIF-1 α mRNAの差がHIF-1 α 発現の差につながる可能性がある。

質問7) 特に分解系との関係について、CD133がHIF-1 α を調整するメカニズムはなにか。

(回答) 実験時には低酸素 incubator から細胞株を取り出す際、常酸素になるべく暴露させないように留意しHIF-1 α のユビキチン化による分解の影響を最小限とした。メカニズムについては、CoCl₂のHIF-1 α 分解に対する阻害作用を考慮すると、Capan1M9とshCD133M9のHIF-1 α 発現の差はCD133によるHIF-1 α 遺伝子の転写翻訳に対しての影響によるものが考えられた。今回の実験ではHIF-1 α 分解系のmoleculeについては評価しておらず今後の課題と考えられる。

質問8) CoCl₂のHIF-1 α 分解阻害のメカニズムはなにか。

(回答) CoCl₂ の HIF-1 α 分解阻害のメカニズムとして、Fe の replacement, FIH, ARD1 の阻害作用の報告がある。

質問 9) Stemness property とはなにか。

(回答) 正常幹細胞が有する性質である自己複製能, 多分化能, dormancy などが挙げられる。

質問 10) HIF-1 α の下流にある stemness property を示す分子はなにか。

(回答) HIF-1 α と stemness の維持に関しては様々な報告がある。当教室の研究結果を考慮すると Slug や mTOR 経路が stemness に関与していることも考えられる。

質問 11) 膵癌臨床検体における CD133 陽性と陰性で予後に差を認めるが、stem cell は癌の集団の中で必須なものと言えるのか。

(回答) CD133 をノックダウンしたマウスでも膵癌の発生は可能であったという報告もあり、膵癌の発生において必須とは言えない可能性がある。しかし、臨床的に CD133 発現が膵癌患者の予後に対して負のインパクトを与えている。CD133 陽性細胞が癌幹細胞と一対一の関係でないとしても、癌研究には重要と考えられる。

質問 12) Capan1M9 の Flow cytometry の結果での side scatter は細胞の大きさをみたものか。

(回答) Side scatter は細胞の大きさを見たものである。

質問 13) Capan1M9 と shCD133M9 の蛍光免疫染色の結果であるが、HIF-1 α は本論文のように染色されるものなのか。

(回答) HIF-1 α は過去の報告でも本論文と同様に染色されており、今回の実験結果と矛盾しない。

質問 14) β 2-adrenergic signaling が HIF-1 α の発現を促すメカニズムはなにか。

(回答) 詳細については検討していないが、今後血管新生との関係について検討する必要がある。

質問 15) DMEM-F12 に添加した Chemo-attractant medium はなにか。

(回答) β -FGF など一般に神経幹細胞に使用する stem cell medium の組成を参考にした。

質問 16) Title に cancer stem-like cells とあるが、cancer stem cell との言葉の使い分けはどのようにしているのか。

(回答) 当研究室の松原が Capan1M9 の stemness 維持には mTOR 経路が重要であることを報告した。また、Capan1M9 は Capan1 と比較し sphere 形成能が有意に高いことも未公開データであるが分かっている。以前からの報告で癌幹細胞と EMT は密接な関係があるといわれているが、Capan1M9 は有意に EMT マーカーの発現が高いことも報告した。一方、ゼノグラフトを用いた実験では腫瘍形成能に差は無く幹細胞マーカーについても FACS において差が無かった。よって、Capan1M9 が Cancer stem cell とまでは言えないと考え、Cancer stem like cell とした。

質問 17) CD133 と HIF-1 α の関連に epigenetic な変化の関与はあるのか。

(回答) 今回の研究結果からは CD133 の HIF-1 α に対する epigenetic な関与のメカニズムの詳細については言及できない。CD133-HDAC についての報告もあり、今後の検討課題である。

質問 18) HIF-1 α 阻害薬を用いた実験結果があるか。

(回答) HIF-1 α 阻害薬である PX-478 を低酸素状態において Capan1M9 に作用させたところ migration assay において有意に遊走能が低下した。

質問 19) Capan1M9 と shCD133M9 に細胞増殖の違いはあるのか。また、増殖の違いは migration assay, wound healing assay に影響するのではないか。

(回答) 常酸素状態では Capan1M9 と shCD133M9 の間に細胞増殖の差は無い。低酸素状態における細胞増殖については不明だが、wound healing assay の結果は低酸素により細胞増殖が減少した結果を反映している可能性がある。

質問 20) CD133 cells tended to obtain the tolerance to hypoxia と記載があるが、CD133 の発現が低酸素下で上昇している可能性は否定できるのか。

(回答) Western blot の結果からは、低酸素状態で CD133 のタンパク発現が上昇したとは言えない。そのため、CD133 陽性細胞が低酸素状態で HIF-1 α を多く発現し低酸素に対して耐性を持ったと考えられる。

質問 21) shCD133M9 の作成方法の詳細はどのようなものか。

(回答) 第 2 世代のレンチウイルスベクターである pLVTHM を用いた。pLVTHM に CD133 shRNA を組み込み、293T 細胞へ Fugene6 試薬を用いて、psPAX2 パッケージングプラスミドと pMD2 エンベローププラスミドを共トランスフ

エクシオンした。培地中のウイルス上清を filter 濾過後に、Capan1M9 に 8 μ g/ml のプロタミン硫酸塩と共に 72 時間感染させ shRNA CD133 を導入した。shRNA CD133 は GFP を共発現するため GFP 陽性細胞を FACS Aria で sorting した。

質問 2 2) shCD133M9 の HIF-1 α の発現低下がコロニー・アーチファクトの可能性はあるか。

(回答) CD133 の shRNA 配列 (877 番目からの ggacaaggcgttcacagat) と似た配列が HIF-1 α には無いことを GENETYX で確認済みである。また、他の配列で作成した shRNA-CD133 では効率よく CD133 を knock down できなかった。加えて、常酸素状態では Capan1M9 と shCD133M9 で *HIF-1 α* の mRNA に有意な差が無く off target effect が起きているとは言いがたい。

質問 2 3) HIF-1 α の安定性に関わる VHL や PHD の発現や活性は Capan1M9 と shCD133M9 間で同じと言えるか。

(回答) 常酸素と低酸素で Capan1M9 と shCD133M9 における *VHL* や *PHD* の mRNA と蛋白質について、直接比較はしていないので分からない。

質問 2 4) *HIF-1 α* の mRNA について、常酸素と低酸素では shCD133 の mRNA が低下するのか。それとも Capan1M9 の mRNA の発現が上昇するのか。

(回答) Capan1M9 と shCD133M9 について、常酸素と低酸素で *HIF-1 α* の mRNA の発現を直接比較はしていないので分からない。

質問 2 5) CD133 は第 4 染色体にコードされるが、同部位の amplification やメチル化の報告はあるか。

(回答) CD133 と HDAC の関連性についての報告はあるが、それ以外については不明である。

質問 2 6) Oncogene addiction の観点から CD133 陽性膵癌細胞は治療における真の標的と言えるか。

(回答) 膵癌の発生について Oncogene addiction と言えるような、単一遺伝子変異のみにより膵癌が発生するという報告は無い。KRAS, INK4A, p53, SMAD4 が founder mutation として知られている。膵癌腫瘍内は時間経過と共に変化を起し様々な研究報告はその一部を切り取ったものと言える。経時的に腫瘍内を評価観察する imaging 技術が発達した場合、CD133 陽性膵癌細胞の真の役割が評価できると考えられる。

質問 2 7) 膵癌が低酸素状態であれば、全ての膵癌で HIF-1 α が陽性になるのではないか。膵臓癌の内部は全て低酸素状態と言えるのか。

(回答) 現在まで自験例を含めた膵癌細胞の免疫染色の結果によると、HIF-1 α 発現の有無については腫瘍細胞ごとで異なる。膵癌内の acute hypoxia や cycling hypoxia, chronic hypoxia などの酸素濃度変化や niche の影響により、一様に HIF-1 α の発現が起きていない可能性がある。

質問 2 8) 核と細胞質に分けた Western blot の結果で CD133 が核内と細胞質内に存在している。その結果をどう解釈し今後の研究に発展させるのか。

(回答) 以前我々が報告した膵癌臨床検体における CD133 の免疫染色については、CD133 anti-goat polyclonal antibody を用いた。その結果では細胞質内のみ CD133 は発現していた。今回提示した Western blot で使用した抗 CD133 抗体は AC133 を epitope とする mouse monoclonal 抗体であり、核内に CD133 が存在する可能性を示唆した。CD133 が核内に存在するかどうか、その場合どのようなメカニズムで働くのかについては今後の重要な研究課題と考える。

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。