

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 392 号	学位申請者	田中 荘子
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (歯学)
	副査	佐藤 正宏	副査 松口 徹也
	副査	吉田 昭世	副査 野添 悦郎
<p>主査および副査の5名は、平成28年11月10日、学位申請者 田中 荘子君に面接し、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。</p> <p>質問1) DLD-1、SW480の元々の性質はわかっているのか。</p> <p>(回答) どちらも大腸由来の上皮系腫瘍細胞で、DLD-1細胞は上皮系細胞の性質を残しているが、SW480細胞は間葉系細胞の性質をある程度持つとされている。</p> <p>質問2) 今回の実験ではDLD-1-Snail1 (Snail遺伝子を導入されたDLD-1株)にN-cadherinを導入しているが、DLD-1にN-cadherinを強制発現させることはできるのか。</p> <p>(回答) DLD-1にN-cadherin発現ベクターを導入して発現させることは可能だが、今回の実験では行っていない。</p> <p>質問3) DLD-1-Snail1にN-cadherinベクターを導入すると細胞の性質は変わるのか。</p> <p>(回答) 今回の解析では変化は認められなかった。</p> <p>質問4) EMT(上皮間葉転換)の定義とは何か。</p> <p>(回答) EMTは上皮様細胞から間葉系細胞への転換を意味するが、形態的には敷石状形態から紡錘形態への形態変化を伴い、分子生物学的には一般的にE-cadherin、occludinなどの上皮系マーカーの発現減弱、N-cadherin、vimentin、fibronectinなどの間葉系マーカーの発現増強が認められる。しかし、今回のように、DLD-1のEMTの過程では、N-cadherin、vimentin、fibronectinの発現増強は認められなかったように、必ずしもEMTに伴う分子生物学的マーカーの現段階における定義は厳密なものにはなっていない。</p> <p>質問5) DLD-1は結腸癌細胞で腺癌の細胞だが、口腔癌で同じ腺癌の細胞、例えば唾液腺癌の細胞などで、今回の実験と同じような報告はあるのか。</p> <p>(回答) 唾液腺癌の細胞に限らず、EMTに伴うN-cadherin発現増強失敗についての報告は、検索した限り認められなかった。</p> <p>質問6) 予備実験で他のEMTとは異なる挙動を示したということだが、具体的にはどういうことか。</p> <p>(回答) EMTがおこると形態変化に加え、上皮系マーカーの発現減弱と間葉系マーカーの発現増強を認めるが、DLD-1にSnail1を導入しても間葉系マーカーは発現しなかった。</p> <p>質問7) DLD1-Snail1作成にあたりいくつかのクローンを拾ったと考えられるが、その中にN-cadherinを発現するものはなかったのか。</p> <p>(回答) 少なくとも30個はクローンを拾ったが、N-cadherinを発現するものは一つもなかった。</p> <p>質問8) 大腸癌細胞とN-cadherinに関連した報告はあるのか。</p> <p>(回答) 検索した限りでは、大腸癌細胞とN-cadherinの関連報告は認められない。</p> <p>質問9) DLD-1-Snail1へN-cadherinベクターを導入した際、遊走能、浸潤能が低下しているのは、N-cadherinの接着因子として作用したためとも考えられるがどうか。またこの場合、他のEMTマーカーの発現は確認しているのか。</p> <p>(回答) 遊走能、浸潤能低下の理由はわからない。また他のEMTマーカー発現の詳細は時間的余裕がなく、検討していない。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 0) Dissociation assay では、トリプシン以外の酵素を使っているのか。

(回答) dispase というペプチド鎖の中性、非極性アミノ酸の N 末端側を切断し、培養皿から上皮細胞をシート状に剥離させることができる金属プロテアーゼを使っている。

質問 1 1) DLD-1-Snail の浸潤能が上がる場合、プロテアーゼ活性も上がっていると思われるが、例えば matrix metalloproteinase などの発現は上がっているのか。

(回答) 癌細胞の浸潤能に関与する MMP2、MMP7、MMP9 などの発現変化はマイクロアレイにて検討した。MMP2 では僅かに発現増強を認めたが、MMP7、MMP9 の発現増強は認められなかった。

質問 1 2) MMP2 を上昇させる growth differentiation factor 5 (GDF5) という遺伝子は調べなかったのか。

(回答) 今回は GDF5 に関しては検討していない。

質問 1 3) Snail 以外の EMT 誘導因子 (TGF- $\beta$ 、ZEB1、twist など) による DLD-1 における EMT 誘導は検討しなかったのか。

(回答) DLD-1 へ TGF- $\beta$  を添加したが、EMT を誘導することはできなかった。また、ZEB1 発現ベクターを DLD-1-Snail へ追加導入したが、N-cadherin、vimentin、fibronectin の発現増強は認められなかった。

質問 1 4) EMT によって N-cadherin が発現上昇し、悪性度が上がるという報告があるが、N-cadherin の発現のみで悪性度が上がるという報告はあるのか。

(回答) 過去の報告では、乳癌や前立腺癌の細胞において N-cadherin 発現そのものが悪性度に関わるという報告、N-cadherin が FGFR と 2 量体を形成し、FGF シグナルを活性化させることで各種のシグナルを活性化させ、細胞の増殖、血管新生増強、遊走、浸潤の増強、MMP9 発現などを誘導するなどの報告がある。

質問 1 5) EMT 誘導時に N-cadherin 等の間葉系マーカーが発現しなかったという過去の報告はないのか。

(回答) 検索した限り、過去にそのような報告は認められなかった。

質問 1 6) Snail は EMT 時に E-cadherin プロモーターに結合して直接的にその発現を抑制するが、N-cadherin に対しては直接的にその発現を抑制するのか、あるいは間接的に制御するのか。

(回答) Snail を導入した際、それが N-cadherin プロモーターへ結合し、直接的に N-cadherin 発現を増強させることも、また Snail 導入により誘導された ZEB1 により、N-cadherin が間接的に発現増強されることもあると考える。

質問 1 7) Snail 導入時の N-cadherin 増強が間接的である場合、E-cadherin の発現抑制と N-cadherin 発現増強が同時に起こらなくても、そのメカニズムは説明がつくのではないのか。

(回答) ご指摘のように N-cadherin 発現増強が間接的であり、Snail のみによるものでないということを考えると、E-cadherin 発現抑制と N-cadherin 発現増強が同時に起こらない可能性はある。

質問 1 8) SW480-Snail には形態変化は認められたのか。EMT 様の変化は認められたのか。

(回答) DLD-1 と同様、紡錘形態への変化は認められた。

質問 1 9) vimentin のマイクロアレイと RT-PCR の結果が一致しないのは、probe の場所が違うためか。probe の場所が違うと結果が違ってくることもあるのか。

(回答) その可能性は考えられる。

質問 2 0) 遊走能には Rac 等 small G タンパク質の関与も考えられるが、これらの検討は行っているのか。

(回答) 今回の実験では、small G タンパク質は見えていない。

質問 2 1) Snail 導入時 occludin の蛍光免疫染色のパターン変化が認められるが、この場合 occludin が核内に移行しているという可能性はないのか？

(回答) occludin が核内に移行したというよりは、非特異的な核染色と思われる。

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(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。