

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 <u>426</u> 号	学位申請者	田辺 寛
審査委員	主査	有田 和徳	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 井戸 章雄
	副査	小澤 政之	副査 上野 真一

主査および副査の5名は、平成29年5月10日、学位申請者 田辺 寛君に面接し、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た。

質問1) FLNCの発現が通常、骨格筋や心筋であるのに対して、癌で発現するのはなぜか。

(回答) 癌により FLNC のプロモーター領域の転写調節が外れ FLNC 発現に影響を与えている可能性がある。今後癌における FLNC の発現制御の解析が必要と考えている。

質問2) 癌細胞がリンパ管に侵入する際、FLNCを発現している食道癌でリンパ管を活性化する分子を発現している可能性についてどのように考えるか。FLNCを高発現する癌細胞の培養上清にリンパ管を活性化させる因子があるのか。

(回答) 不完全なリンパ管だと癌細胞がリンパ管内に侵入しやすくなる。癌組織による VEGF・TGF- $\beta$ などのリンパ管新生・維持に関わる分子の調節が行われ、癌細胞がリンパ管内に侵入しやすくなる。リンパ管侵襲・リンパ節転移しやすい FLNC 高発現の食道扁平上皮癌ではこれらの分子が発現している可能性はあるが、免疫染色ならびに *in vitro* での検討はしていない。今後の検討課題としたい。

質問3) 樹状細胞がリンパ節に到達する前にエクソソームがまず到達して環境を整えるという報告があるが、食道癌ではそのような文献はあるか。また FLNC と癌特異的なエクソソームの関係はどう考えるか。

(回答) 食道扁平上皮癌においては組織、血清のエクソソームを抽出し、その microRNA の解析を行い、リンパ節転移や遠隔転移で有意差を認めた報告はある。しかし、エクソソームが転移先での環境を整えているという乳癌やメラノーマ等と同様な報告は、食道扁平上皮癌ではなかった。乳癌では転移先の臓器特異性はエクソソームに発現しているインテグリンの種類が関連していると報告されている。Filamin とインテグリンは細胞内で結合する関係にあるため、癌細胞由来のエクソソームに Filamin が含まれる可能性があり、インテグリンを介して癌細胞の転移に関与することが示唆される。食道癌ではないが、前立腺癌細胞由来エクソソームに FLNC が含まれていたとする報告はある。

質問4) GTP-RhoA, Rac1, Cdc42 の Total とは何を示すのか。その上流の Rho GEF はどうなっているのか。

(回答) Total とは活性型の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型を合わせたものである。Rho GEF の検索には至っていないが、Rho Activation Assay の結果から何らかの Rho GEF の作用の関与が考えられるので、GEF の検索は今後の研究課題である。

質問5) RhoA と Rac1 や Cdc42 で GTPase 活性に明らかな差を認めることに関して、GTP-RhoA が発現していないことは通常起こり得ることか。極めて特殊なことなのか。

(回答) RhoA, Rac1, Cdc42 は協調して働くことにより細胞運動が起こるとされており、活性型 GTP-RhoA だけが検出できないことは特異的なことである。実験検出感度の限界であったと考えている。

質問6) Filamin の A, B, C があるが、臓器分布はどうなっているのか。

(回答) FLNA, FLNB は全身の臓器に発現しているのに対して、FLNC は骨格筋と心筋にのみ発現している。

質問7) FLNA, FLNB, FLNC で機能に差があるのか。

(回答) Filamin は細胞骨格の維持・形成に関わっているが、主に発達に関与していて、変異があると脳、骨、循環器をはじめ様々な臓器に遺伝的疾患を引き起こす。FLNA は主に脳、骨格形成に、FLNB は骨形成に、FLNC は筋肉の形成に関与している。

質問8) 腫瘍辺縁を評価しているが、染色性の定量化は染色細胞数で評価したのか。

(回答) 染色強度、染色割合でそれぞれ評価した。強度と割合は概ね相関していたが、二つを複合的に評価すると煩雑になったためにシンプルに染色割合のみとした。

質問 9) TE1、TE8 の cell line の違いはあるのか。また FLNC 発現の低い食道扁平上皮癌細胞株はあるのか。Over expression 実験は行っていないか。

(回答) TE1 は高分化扁平上皮癌で、TE8 は中分化扁平上皮癌、どちらも東北大学で樹立された食道扁平上皮癌細胞株である。TE1 は TE8 より FLNC が高発現であった。本研究で細胞株を選定する上で複数の食道扁平上皮癌細胞株の FLNC 発現を確認し TE1、TE8 の 2 つは発現が高かったために選択した。FLNC 発現が低い細胞株もあった。Over expression 株の作成は現在検討中である。

質問 10) レンチウイルスの導入効率は 60% だったが、セクションしてバルクでみたのか。シングルクローンからクローン化したのか。シングルクローンであれば、一つの shRNA に対して 2 種類以上のクローンで実験するべきではないか。

(回答) レンチウイルス導入後、シングルクローンからのクローン化を行った。それぞれの shRNA で 1 種類のクローンのみで表現型の検討を行ったので、複数のクローンによる検討は行っていない。今後の検討課題としたい。

質問 11) Western Blotting で FLNA、FLNB、FLNC 発現をみているが、FLNC 発現が他の二つと比較して低いように見えたが、発現の差があるのか。

(回答) FLNA、FLNB と比較して FLNC は mRNA 発現量は少ない。抗体が異なるのでタンパク質発現量について直接比較はできないが、全身に普遍的に発現している FLNA や FLNB と比較すると差があると考えられる。

質問 12) Filamin が高発現になると細胞骨格が強固になって遊走、浸潤しにくくなるのではないか。

(回答) Filamin はアクチンフィラメントの架橋に関わり、細胞形態の維持に関わる。一方、周囲の環境に細胞を適応させるために、活発にアクチンフィラメントの構造を変化させる働きもあり、周囲からの刺激に合わせて遊走や浸潤が促進されると考える。

質問 13) Transwell migration and invasion assay において培地に EGF が入っているのはなぜか。

(回答) EGF 受容体に Filamin は結合し細胞内シグナルを活性化させる。EGF を加えた場合と加えなかった場合でそれぞれ検討してみたが、EGF を加えなかった場合 invasion する細胞数が非常に少なく比較実験として不十分と判断し EGF を加えて実験した。

質問 14) EGF を入れると細胞増殖が亢進するのではないか。

(回答) EGF を加えると細胞の運動能、浸潤能は明らかに亢進した。EGF を加えた状態の増殖能の検討は行っていないが、EGF の影響で増殖能も亢進していた可能性はある。今後の検討課題としたい。

質問 15) EGF 1ng/ml は適切な濃度か。5~20ng/ml 必要ではなかったか。

(回答) さまざまな EGF を添加した実験の報告をみると 1~20ng/ml とばらつきがあり、Transwell assay の実験を検討したところ、EGF を加えなかった場合と比較して 1ng/ml を加えて明らかに運動能、浸潤能が亢進したため十分と判断しこの濃度で比較検討した。

質問 16) invasion した細胞数を migration した細胞数で割って比をとる意義は何か。

(回答) Transwell invasion assay においてカウントした細胞数は matrigel を通過し chamber の膜を通過して膜の底面に移動した細胞の数を観察している。運動能による影響を補正するために Transwell migration assay において膜を通過して膜の底面に移動した細胞数で割ることで、運動能に左右されない浸潤能を評価した。

質問 17) FLNC をノックダウンしたことで細胞の形態学的変化はなかったか。

(回答) Filamin はアクチンフィラメントを架橋することで細胞骨格の維持に働いているため、FLNC をノックダウンすることで細胞骨格に影響がでる可能性は十分考えられるが、実際の実験の際にはコントロールと比較してノックダウン細胞株で細胞形態の変化は観察されなかった。

質問 18) カドヘリンなどの接着分子などの免疫染色やアクチンの免疫染色は行っているのか。

(回答) 接着分子やアクチンの検討は FLNC の解析に重要な意味があると考えられるが、本研究ではその免疫染色までは行っていない。今後の検討課題としたい。

質問 19) Rho Activation Assay の Western Blotting で非特異的なバンドがみられるが抗体は適切だったのか。また TE8 の Western Blotting で FLNB のすぐ下にある太いバンドがあり、TE1 では認められないが、TE1 と TE8 の細胞株の違いは何か。

(回答) Rho Activation Assay は RhoA/ Rac1/ Cdc42 Activation Assay Combo Kit を使用した。抗体はキットに付属している抗 RhoA 抗体、抗 Rac1 抗体、抗 Cdc42 抗体を使用した。TE8 で認められた FLNB の直下のバンドについては非特異反応と考えている。抗 FLNB 抗体は polyclonal 抗体であり、このバンドは TE1 では検出されず、TE8 のタンパク質と非特異反応を起こした可能性が高い。TE8 で反応したタンパク質の特定は出来ていない。

質問 20) FLNC が Rho を活性化する経路はどうなっていると考えるか。

(回答) Filamin は足場タンパクとして働いており、Filamin を足場としてさまざまな分子の複合体ができる。Rho も同様に Filamin を足場として GEF と結合し活性型の GTP 結合型となる。

質問 21) 癌において FLNA、FLNB と比較して FLNC 特異的な機序があるのか。

(回答) FLNA、FLNB と比較して FLNC の癌における機能や他のタンパク質との相互作用の報告は少なく、癌における FLNC の特異性に関しての報告はない。全身に発現している FLNA や FLNB と比較して、骨格筋・心筋にのみ発現している FLNC の発現量は少なく、当研究で示唆された癌特異的な FLNC 発現は有用なバイオマーカー、治療標的になりうると考えている。

質問 22) 表在癌を除いた理由は何か。

(回答) 食道の基底層を越えるまでの表在癌と基底層を越えた癌では腫瘍辺縁のタンパク発現が異なってくる。そのため表在癌も評価に加えると FLNC の腫瘍辺縁部の発現の意味が薄れてしまうため、今回は基底層を越えて深く浸潤した腫瘍を評価対象とした。

質問 23) 免疫染色では FLNC 発現はリンパ管侵襲に関連があったが、リンパ管特異的に作用する機序があるのか。

(回答) 癌組織ではリンパ管新生が進み、リンパ管数が増加することでリンパ管内に侵入する癌細胞が増える。血管内皮細胞増殖因子 VEGF の中でも VEGF-C がリンパ管新生に関与することが報告されており、リンパ管内皮細胞に発現している VEGFR-3 に結合する。当研究の免疫染色の結果より、FLNC と VEGF-C・VEGFR-3 の関連性を今後検討したい。

質問 24) 食道癌に有効な分子標的治療薬はないか。

(回答) 食道癌に有効とされている化学療法はフルオロウラシル、シスプラチン、ドセタキセルといった細胞障害性抗癌剤であり、分子標的治療薬は使用されていない。現在のところ、食道癌に対する分子標的治療はすべてネガティブな結果である。当研究の見解では FLNC 発現が食道扁平上皮癌患者の予後に影響することから、FLNC 発現を調節する因子の同定ができれば分子標的薬の開発につながるかもしれない。

質問 25) FLNC の発現をコントロールしているものは何か。

(回答) FLNC のプロモーター領域に作用する転写因子やメチル化などのエピジェネティック修飾と考える。

質問 26) FLNC 発現が低かった細胞株での遊走実験は行っていないか。

(回答) 複数の食道扁平上皮癌細胞株で FLNC 発現を確認したが、発現が低かったものはそれ以外の表現型の検討は行っていない。現在 Over expression の検討中であり、FLNC の発現が低い細胞に FLNC を Over expression させる計画である。

質問 27) 癌種によって FLNC 発現の差があるが、前立腺癌での報告では逆の結果となっているがどう考えるか。

(回答) これまでの文献によると胃癌や前立腺癌では FLNC は逆の発現をしており、運動能・浸潤能における働きも本研究とは逆であった。神経膠腫の報告では本研究と同様に FLNC 発現は悪性度と相関した。FLNC の役割は組織や臓器によって違うのかもしれない。FLNC 発現は多変量解析で単独予後因子とはなり得なかったため、単独で癌の悪性度に影響を及ぼすのではなく、他の分子との相互作用や周囲の環境で運動能や浸潤能に影響すると考えている。

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。