

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 505 号	学位申請者	中村 康大
審査委員	主査	中村 典史	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	後藤 哲哉	副査 小松澤 均
	副査	佐藤 友昭	副査 犬童 寛子

主査および副査の5名は、平成 31 年 2 月 13 日、学位申請者 中村 康大 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) *BRACHYURY* の名前の由来は何か？

(回答) 由来の詳細は不明だが T(短尾突然変異)遺伝子とも呼ばれている。

質問 2) *BRACHYURY*、*SOX2* は転写因子だが、*TGF $\beta$*  等のシグナルとの関連は？

(回答) 今回の結果から考えると、上流に位置し、*TGF $\beta$*  の発現を調節していると想定される。

質問 3) *BRACHYURY* がダイレクトに *SOX2* の発現を調節しているのか？またその逆は考えられるのか？

(回答) 本研究から直接の関与は不明であるが、*BRACHYURY* が上流にある中心的な制御因子であり、他に複数の因子も *SOX2* の発現に関与している可能性がある。

質問 4) *Wnt* をノックダウンすると *SOX2* は *BRACHYURY* を誘導しなくなるという報告は今まであるか？

(回答) *Wnt* を介して *SOX2* が *BRACHYURY* を誘導するという報告はあるが、*Wnt* をノックダウンさせて確認した研究報告は無かった。

質問 5) ACCS と ACCSM とのマイクロアレイによる比較を行ったのか？

(回答) 比較は行っている。アレイの結果では *BRACHYURY*、*SOX2* はともに順位付けすると上位ではなかった。

質問 6) *BRACHYURY* の阻害剤は、すでに存在しているのか？

(回答) 渉猟した範囲では、今までそのような報告は無かった。

質問 7) 生体における *BRACHYURY* の役割・働きは何か？

(回答) 胎生期における中胚葉形成と中胚葉系への細胞分化に必須である。

質問 8) *BRACHYURY* をターゲットとして治療を行った場合、副作用は生じるのか？

(回答) *BRACHYURY* は胎生期に存在し、成人では癌細胞にのみ発現するため、安全な治療標的と考える。

質問 9) Heat shock protein と本研究で用いた細胞との関係は？

(回答) 本研究では調べておらず、関係の詳細は不明である。

質問 10) 薬剤耐性、放射線耐性と *BRACHYURY* との関係についてはどう考えるか？

(回答) 我々の研究グループは以前、ACCSM から *BRACHYURY* をノックダウンすると、薬剤耐性および放射線耐性が減弱することを明らかにしている。

質問 11) カドヘリンスイッチと EMT との関係は？

(回答) 上皮系接着因子 E カドヘリンの発現が低下し、間葉系接着因子 N カドヘリンの発現が増強することで、EMT が誘導される。

質問 12) *BRACHYURY* は正常の上皮細胞に発現するのか？EMT のどの段階で働くのか？

(回答) 正常の上皮細胞には発現せず、癌細胞における発現時は、EMT の最終的なステップで *Slug* の発現を高め、共に E カドヘリンの発現制御を行っていると思われる。

質問 13) EMT 形質において、*BRACHYURY* と *SOX2* はどちらが上流に位置するのか？

- (回答) *BRACHYURY* がビメンチンを誘導し、また *TGF $\beta$*  との間に正のループを形成するという報告もあり、本研究の結果からも *BRACHYURY* が上流にあり、特に癌細胞の EMT 形質に対し強い促進機能を有していると考え。
- 質問 14) 遊走能と浸潤能の違いは？また *BRACHYURY* と *SOX2* のこれらへの関与は異なるのか？
- (回答) 遊走能は細胞がある場所から別の場所に移動することであり、浸潤能は細胞外マトリックスを分解しながら移動することである。今回の結果から *BRACHYURY* はどちらにも大きく関与し、*SOX2* は浸潤能にのみ関与していると思われる。
- 質問 15) *ZEB2* は、ACCSM では著明に発現亢進しているが、*BRACHYURY*、*SOX2* 単独および同時強制発現株ではほとんど亢進していない。それはなぜだと考えるか？
- (回答) *ZEB2* の発現には他に複数の制御因子が存在し、それら全てが揃って初めて ACCSM と同程度の発現に近づくことが出来ると考える。
- 質問 16) 石井、下田らが EMT 形質を検証した際、E カドヘリン、ビメンチン以外の遺伝子の発現は検討したか？
- (回答)  $\beta$  カテニンやビメンチン  $\alpha 1\sim 6$ 、 $\beta$  についてもウエスタンブロッティング法にて検証を行っている。
- 質問 17) EMT 関連接着因子の発現変化において、*BRACHYURY* 単独発現株で EMT 形質が誘導されているが、なぜ *Claudin* の発現が亢進しているのか？
- (回答) 上皮系接着因子として *Claudin* を今回検討したが、EMT における *Claudin* 減少は必須ではない。実際に ACCSM でも上昇している。上皮接着性について考えると、ギャップジャンクションに関わるため、E カドヘリンが機能しないと *Claudin* は機能出来ず、発現亢進しても EMT には関与しないと考えられる。
- 質問 18) *in vivo* 転移モデルで、*SOX2* ノックダウン時に顎下リンパ節転移の抑制より肺転移の抑制が強かったが、なぜだと考えるか？
- (回答) リンパ行性転移は少なく血行性転移が多いという腺様嚢胞癌の特性が一因と考える。
- 質問 19) なぜ *BRACHYURY* と *SOX2* の同時ノックダウンはしなかったのか？
- (回答) 行ったが細胞の培養が上手くいかなかった。
- 質問 20) 今後の臨床応用の展望は？
- (回答) *BRACHYURY* は分子標的薬のターゲットとなり得ると考えるが、細胞内での局在が膜表面ではないため、抗体治療のターゲットにはなり得ない。しかし細胞質まで分子標的薬が入っていく次世代の核酸医薬のターゲットとしては有望であると考え。
- 質問 21) EMT 形質と癌幹細胞形質との関係は？
- (回答) EMT 形質により浸潤転移する癌細胞は、転移巣を形成するまでに自己複製能によって生存せねばならず、転移巣の成立には、この両形質が必要だと考える。
- 質問 22) リアルタイム PCR 法の発現変化のグラフにおいて、何倍の発現変化で腫瘍の形質は変わってくるのか？
- (回答) 明確に何倍とは言えないが、ACCSM における遺伝子発現量に近づくほど腫瘍の形質変化が生じると考える。
- 質問 23) なぜ *BRACHYURY*、*SOX2* に着目したのか？
- (回答) 過去の文献や報告を参考にこの 2 つの遺伝子に着目した。また我々の研究グループは、腺様嚢胞癌において山中因子 4 つのうち *SOX2* が一番発現していたことを報告している。
- 質問 24) 本研究の結果から想定されるフィブロネクチンの役割は何か？
- (回答) *BRACHYURY* と *SOX2* を同時発現させることで、フィブロネクチン、*TGF $\beta$*  の著明な発現亢進 1 を誘導することから、*BRACHYURY* と *SOX2* で形成される EMT 形質、癌幹細胞形質のループを繋ぐ因子の 1 つであることが示唆された。また、自己複製におけるニッチを提供するものだと考える。
- 質問 25) 仮想原発巣離脱モデルにおいて、凝集塊の辺縁はどのように設定したのか？
- (回答) 100% 蛍光している領域の底辺を、凝集塊の辺縁として設定した。
- 質問 26) *in vivo* 転移モデルにおいて、腫瘍体積はどのように計測したのか？その際麻酔はしたのか？
- (回答) 長径×短径×深さで体積を算出している。測定の際は麻酔を使用している。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。