

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 517 号	学位申請者	大久保 啓史
審査委員	主査	谷本 昭英	学位 博士 (医学)
	副査	古川 龍彦	副査 上野 真一
	副査	橋口 照人	副査 奥野 浩行
<p>主査および副査の5名は、令和元年6月11日、学位申請者 大久保啓史 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) EMT がどの程度起こっているのか、割合で評価するのではなく、EMT が起こっている細胞数を数えた方が良いのではないか。</p> <p>(回答) EMT が起こっている細胞数を評価するのは、二重染色などで個々の細胞での E-cadherin と N-cadherin の発現を評価する必要がある。今回の検討では、サンプル数も多く評価が困難なため割合で評価した。</p> <p>質問2) 正常組織での Snail の発現はあるか。</p> <p>(回答) Snail は癌細胞に EMT が起こる際に発現し、基本的には正常細胞には発現はなく、本研究でも正常組織にはほとんど発現は認めなかった。</p> <p>質問3) 癌細胞が EMT からリンパ節で MET を起こす利点はあるか。</p> <p>(回答) リンパ節で MET が起こり接着能が亢進し、癌細胞が転移巣で増殖していくために必要なプロセスと考える。</p> <p>質問4) Snail switch 症例が予後不良との結果だが、switch を起こしていない組み合わせは、予後に関連していたか。</p> <p>(回答) Snail switch 以外の3通りの組み合わせも検討したが、予後に有意差は認めなかった。</p> <p>質問5) 全例がリンパ節転移症例だが、現在の生存例はどの程度か。</p> <p>(回答) 症例は切除症例であり、stage 2、3の症例が多く、約半数以上は現在まで生存していると考えられる。</p> <p>質問6) N-cadherin は正常細胞ではどの程度発現するか。</p> <p>(回答) N-cadherin は EMT の結果として発現が亢進するため、正常細胞では発現しないと考えられ、本研究でも発現は認められなかった。</p> <p>質問7) N-cadherin の neo-expression とは何を示すのか。</p> <p>(回答) N-cadherin の新規発現という意味であり、正常細胞では発現していない N-cadherin が癌細胞で EMT が生じることで新たに N-cadherin が発現することを指す。</p> <p>質問8) cadherin switch と N-cadherin の発現は、どのような関係性があるのか。</p> <p>(回答) cadherin switch とは、E-cadherin が N-cadherin に発現が変化することであり、EMT のプロセスであるので、N-cadherin の発現は上昇する。</p> <p>質問9) リンパ節から次のリンパ節への転移と、原発巣からのリンパ節転移への転移は区別できるのか。またリンパ節からリンパ節への転移は本当に起きているのか。</p> <p>(回答) 免疫染色では区別不可能だが、センチネルリンパ節転移の理論では、リンパ節から次のリンパ節への転移という転移様式は確立されている。</p> <p>質問10) MET と cell cycle との関係はどのように言われているか。</p> <p>(回答) MET と cell cycle の関連についての報告はないが、EMT に関するシグナル伝達経路は、TGF<math>\beta</math>シグナルや</p>			

## 最終試験の結果の要旨

Wnt シグナル経路などが含まれると報告されており、その逆のシグナル経路などの関与も考えられる。

質問 1 1) miRNA-200c と転移との関連はあるか。

(回答) 大腸癌の肝転移での報告では、肝転移巣で MET が起こるときに、低メチル化が起き、miR-200c の発現が進んで、ZEB1 の発現が低下するという報告がある。本検討でも ZEB1 同様、Snail が低メチル化の影響で低下している可能性も考えられる。

質問 1 2) EMT と cancer stem cell との関係はどうか。

(回答) EMT で転移を起こした癌細胞の中に、cancer stem cell が存在する可能性はあり、その細胞が本検討での Snail switch を発現した症例で多くみられ、予後不良である可能性も考えられる。

質問 1 3) 免疫染色での抗体の信頼度はどうか。

(回答) 本検討に用いた抗体は、他論文でもしばしば使われているものである。ただ、1つの抗体のみで染色しているので、複数の抗体を使用すると信頼を高められると考えられる。

質問 1 4) 免疫染色の評価について、発現の強弱と細胞数での評価などの比較検討は行ったか。

(回答) 免疫染色の強度陽性と細胞数での評価も一部のサンプルで行ったが、N-cadherin や Snail の免染の強度が弱く、評価が困難であり、陽性細胞数での評価がより妥当であったため、最終的には細胞数での評価のみで行った。

質問 1 5) 臨床病理学的因子との相関の検定法について、 $\chi$  二乗検定を使っているが、補正の必要はないか。

(回答) 2 群間の比較で、独立した因子での検定であり、多重検定などでの補正の必要はないと考えた。

質問 1 6) 転移リンパ節で、同一患者でも染色性が異なる場合もあり、正しい生物学的悪性度を示しているか。

(回答) 染色性が異なり評価が正しいかは議論があるが、E-cadherin が1つでも陰性のリンパ節、N-cadherin が1つ以上陽性のリンパ節があれば、転移巣で EMT が起こっており、悪性度を示していると考えられる。

質問 1 7) EMT に関わる蛋白発現を検討しているが、何らかのがん細胞刺激ではなく、がんが元来有する遺伝子異常そのもので、これらの蛋白発現が変化する場合もあるか。

(回答) cadherin については遺伝子異常での発現変化の報告もあり、遺伝子異常自体の関与は可能性としてある。

質問 1 8) Snail switch が起こり、リンパ節で Snail の発現が減弱しているものが予後良好でないか。

(回答) Snail の発現がリンパ節で減弱し MET が起こるが、転移巣では次のリンパ節へ転移するメカニズムで、EMT が起こった症例が予後不良となる。Snail は転移巣では MET に関連し、発現は減弱している症例が予後不良である。

質問 1 9) 胃癌は発現の多様性が高いため多くの切片を用いた方が良いが、免疫染色は1例あたり何切片を用いたか。

(回答) 原発巣は2から3切片で、リンパ節転移巣は、数も多かったため、ほとんどが1切片である。しかし、全ての転移リンパ節を10視野で評価したため、信頼性のある結果と考える。

質問 2 0) 原発巣における分化度と E-cadherin との関連性はあるか。

(回答) 未分化型癌で有意に E-cadherin は低発現し、リンパ節転移の頻度が高く、EMT が起こり易いと考ええる。

質問 2 1) 本検討で術前化学療法の症例は含まれているか。

(回答) 含まれていない。

質問 2 2) 本検討では、原発巣とリンパ節転移巣で EMT を起こした後の結果を見ている。どのような検討をすれば動的な EMT をみることが可能であるか。

(回答) Circulating tumor cell(CTC) をリンパ管で判定可能であれば、動的に見ることが出来るかもしれないが、リンパ管での CTC の評価は難しいと考える。

質問 2 3) 1つの細胞での E-cadherin と N-cadherin の発現を flow cytometry でみた報告はあるか。

(回答) cancer cell line での報告例はあるが、臨床サンプルでの発現を flow cytometry で観察した報告はなかった。

質問 2 4) 抗がん剤治療が、EMT に与える影響はあるか。

(回答) E-cadherin や N-cadherin の発現は、分化度の影響を受ける。抗がん剤治療で癌細胞の分化度が変化する可能性は低いと考えられ、抗がん剤が EMT に直接与える影響は低いと考える。

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。