

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 676 号		学位申請者	近藤 清貴
審査委員	主査	井戸 章雄	学位	博士 (医学 歯学・学術)
	副査	橋口 照人	副査	石塚 賢治
	副査	大塚 隆生	副査	谷本 昭英

主査および副査の5名は、令和4年8月31日、学位申請者 近藤 清貴 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) コアフコースによって Integrin  $\alpha 6\beta 4$  の機能は影響を受けるか。

(回答) 今回の実験においては、機能解析をしていないため、Integrin  $\alpha 6\beta 4$  に関しては不明である。しかし、コアフコースは炎症に関与するという報告が複数あるため、コアフコースは修飾する蛋白質に影響を与えると考えられる。

質問2) sEV が糖鎖を有しているという報告はあるか。

(回答) 以前より報告されている(Liang Y, *J Biol Chem*, 2014)。

質問3) Western blot に関して CD63 のバンドに幅がある理由は何か。

(回答) 糖鎖修飾の影響と考えられる。

質問4) フコシル化は細胞のどこで起こるか。

(回答) N 結合型糖鎖のフコシル化はゴルジ体で起こる。

質問5) 小細胞肺癌に特有な糖鎖構造があるか。

(回答) 今回の解析において、Antennal Fucose, LacdiNAc, Bisecting GlcNAc が小細胞肺癌で多く確認され、それらは非小細胞肺癌では、ほとんど確認されない構造であった。

質問6) sEV と細胞の双方で糖鎖構造を解析した理由は何か。

(回答) sEV が細胞の特性を反映するかを確認するため、細胞との構造の比較が重要と判断し解析をした。

質問7) 癌細胞の糖鎖の変化は癌化の結果なのか、糖鎖の変化の結果癌化するのか。

(回答) 糖鎖の構造変化が結果なのか原因なのかは、まだ明確な解答はない。線維芽細胞に N-ras 遺伝子を導入すると、癌細胞で多く確認される糖転移酵素の一つである Gnt-V の発現が上昇したという報告がある一方、ルイス型糖鎖の CA19-9 が K-ras(G12D) 遺伝子と共に膵臓癌の発症を促進させたという報告もある。

質問8) sEV の解析に関して、正常細胞との比較は行ったか。

(回答) 今回は行っていないが、既報で正常組織由来と癌細胞由来の sEV の比較をしている報告があり、肺癌の sEV では syntaxin 11 や CD36 が有意に高発現していることが確認されている。

質問9) 小細胞肺癌の糖鎖が脳の糖鎖と似ているという結果は、癌細胞の起源と関係しているということか。

(回答) 糖鎖は個々の細胞の特徴を示す顔としての役割を有していることから、肺内の神経内分泌細胞に由来する可能性があると考えている。

質問10) 他臓器の小細胞癌でも今回の結果と同様に脳に似た糖鎖構造を有しているか。

(回答) 他臓器の小細胞癌の糖鎖構造解析の報告は調べた限りではなく、現時点では不明である。

質問11) 今回の解析について 500-1000ml といった大量の検体を必要としているが、臨床応用するのであれば検体をどうするのか。

(回答) 胸水、腹水、尿を用いれば比較的大量の検体採取が可能と考えている。

質問12) 癌細胞と比較する細胞は何を用いるのがよいと考えているか。

(回答) 研究レベルでは実際に確定診断のついた患者の検体と健康対照者もしくは非癌患者の検体を用いて比較することになると考えられる。

質問13) レクチンで pull down し SDS-PAGE など熱を加える処理をしているが、糖鎖は安定な分子なのか。

(回答) 糖鎖は個々の単糖が共有結合で結合しているため、化学構造的には安定している。解析は三回行い、一回の解析に一月程度の時間を要しているが、糖鎖解析の結果については各解析間で大きな差がないため、比較的安定した分子であると考えている。

(676)

## 最終試験の結果の要旨

質問 14) 診断を行うには組織採取が最適であると思われるが、sEV を採取する手間を考えるとその意義があるかどうかについてどう考えているか。また、糖鎖以外の解析対象は何かあるか。

(回答) 診断は組織の採取によって行われるべきであると考えている。ただし、極早期の病変で、画像検査でもその存在の判断が難しいような症例において、sEV を解析することで発癌のリスク評価などに利用できないかと考えている。糖鎖以外の解析対象としては、今回解析した Integrin、癌特異的蛋白質や micro-RNA が挙げられる。

質問 15) 質量分析以外でもっと簡便に糖鎖を解析する方法はないか。

(回答) レクチンマイクロアレイが候補として挙げられる。

質問 16) sEV は細胞周期や細胞の障害など、どのような状況下で分泌されるか。

(回答) 血清を抜いた細胞でも sEV の分泌は確認され、経時的に増加することから細胞周期との関わりは少ないのではと推察される。既報にて小胞体ストレスを受けた細胞が sEV を分泌する報告や、低栄養培地や低 pH 培地で sEV 分泌が促進するといった報告から、細胞へのストレスは sEV の分泌に関与しているのではと考えられる。また、癌細胞の Warburg 効果を抑制することで sEV の分泌が抑制される報告もあり、細胞の糖代謝も分泌に影響を与えられられる。

質問 17) sEV は転移、浸潤する以前でも分泌されているか。早期癌や上皮内癌でも分泌されるか。

(回答) 既報では、sEV の蛋白質を評価する事で健常者と早期肺癌を区別できるという報告があるので、疾患の進行に関わらず分泌されていると考えられる。また、原発の腫瘍から分泌された sEV 膜の Integrin の違いによって転移臓器が決定されることが報告されており、転移前から sEV は分泌されていると考えられる。

質問 18) 細胞株の組織の確認をどのようにしたか。contamination はないか。

(回答) contamination については、細胞株認証を外注し contamination がいないことを確認した。組織型の確認は培養後に細胞の形態を確認し、必要に応じ免疫染色を行う必要があったと考える。

質問 19) 非小細胞肺癌の異なる組織の間で sEV の特徴の違いはなかったか。

(回答) 今回の解析対象は Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  とそれに修飾された糖鎖であったが、今回解析した細胞が基底膜に接着する細胞という共通点があるため、蛋白質に差が確認されなかったと考えている。他の蛋白質を対象にすると腺癌と扁平上皮癌で差が出た可能性はあると考えている。

質問 20) 培養皿から癌細胞を生体に移植した場合でも同じ結果が出ると考えられるか。

(回答) Ras-Erk-Ets 経路は糖転移酵素の Gnt-V の転写を促進させる報告があり、IL-6 も Gnt-IV および Gnt-V の活性を上昇させるという報告がある。糖転移酵素の発現は複数の液性因子の影響を受けている可能性があり、生体内では in vitro より複雑な環境になるため、異なる結果となる可能性は否定できない。

質問 21) 膜蛋白質の糖鎖を解析するにあたり、sEV の単離の仕方に工夫があるのか。

(回答) 抗体を用いて sEV を回収する方法があるが、sEV と反応させる抗体自体に糖鎖が修飾されることから超遠心を用いた。

質問 22) 癌細胞から sEV が多く分泌されるということであれば、液状検体の sEV の濃度を測定することで癌患者の絞り込みができるか。

(回答) 既報で肺腺癌の患者の血中の sEV は健常者と比べて有意に高濃度であったという報告があり、絞り込みができる可能性はある。

質問 23) 糖鎖の違いは細胞の違いを表しているのか、それとも機能の違いを表しているのか。

(回答) 糖鎖は細胞の顔ともいえ、細胞、組織の特性を表している。また、炎症や癌といった疾患において糖鎖構造に変化が生じ、修飾された蛋白質の機能が変化することが解明されていることから、双方の特性を有していると言える。

質問 24) 他の組織の細胞や、正常の肺組織での解析はしていないか。

(回答) 今回の実験では行っていないが、肺の正常組織で糖鎖の解析をした論文では、二分岐の糖鎖、フコースを有する構造、一つのシアル酸を有する構造が多かった。

質問 25) sEV の分泌について、無血清培地の方が通常の培地と比べ低栄養などのストレスがかかることにより分泌量が増えると考えられるか。

(回答) 低栄養培地や、低 pH 培地で sEV の分泌が促進しているという報告があることから、細胞環境の変化に伴い細胞へのストレスが増すと分泌が増えると考えられる。

質問 26) 糖転移酵素を抑えることで、表現型は変化するか。

(回答) コアフコースを付加する糖転移酵素の FUT8 をノックアウトすることで気腫性変化が起こり易くなるという報告があり、糖転移酵素の発現の変化で表現型は変化すると考えられる。

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(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。