

最終試験結果の要旨	
学位申請者氏名	上村 美優
審査委員	主査 鹿児島大学 教授 橋本 文雄
	副査 鹿児島大学 准教授 岡本 繁久
	副査 佐賀大学 教授 石丸 幹二
	副査 鹿児島大学 准教授 加治屋 勝子
	副査 鹿児島大学 助教 坂尾 こず枝
審査協力者	
実施年月日	令和5年1月27日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、令和5年1月27日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	上村 美優
<p>【質問1】 ドーム形成時にALP活性が上がるのは何故か。ドームとALP活性の関係はどういうものか。</p> <p>【回答1】 アルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性は、これまで腸の細胞分化に関する生化学的な分化マーカーとして使用されてきたので、ドームが分化組織であれば活性が上昇すると考えました。つまりALP活性を分化指標の一つとして利用したわけです。生体内でALPは分化した腸細胞のマイクロピリに局在するので、ALP活性の上昇は分化の原因ではなく結果と考えています。</p> <p>【質問2】 酪酸は野菜を食べた時に腸内で生じると言われているが。</p> <p>【回答2】 はい、その通りです。酪酸は腸内細菌により食物繊維が発酵されてできると言われています。腸のルーメンにはミリモルオーダーで存在すると報告されています。</p> <p>【質問3】 MTAはカツラウリからとっているということだが、実際、食べたときに腸にどの程度届いていると考えているのか。また、実際に癌細胞の分化に効いていると考えているか。カツラウリを食べることで得られる酪酸とMTAの量を比べると、酪酸の量の方が高い可能性がある。そうすると、食べることの優位性はあるか。</p> <p>【回答3】 有益なご意見ありがとうございます。MTAは構造活性相関解析の結果、MTPEやMTAEと同じ生物活性を持つ物質として得られたもので、カツラウリからは見つかっていません。ただ、MTAはMTAEの加水分解物なので、胃腸で分解されてMTAが生じると考えられます。しかし、カツラウリに含まれるMTAEの量も微量で、食することで十分量のMTAを得るとするのは現実的ではないと思っています。また、酪酸との割合も先生のおっしゃるとおりで、カツラウリを機能性食品として利用することは難しいと思っています。</p> <p>【質問4】 揮発性物質をどうやって十分にインキュベートしているのか。普通の液体と比べて、揮発性物質を培地に溶け込ませるには工夫が必要だと思うが、どのように行っているのか。RCM-1細胞自体は接着型だからシャーレの底に存在する。培地に混ざって届くのか。</p> <p>【回答4】 揮発性物質であることを考慮して、投与当日に試薬を調製希釈するように心がけていますが、培地へ添加した後の培養に関しては特段の工夫はしていません。タイタープレートの1穴の体積の大部分は培地で満たされており、蓋もあるので培養時に全てが揮発することはないと思っています。また、この系でドーム形成が誘導されたので、先生がおっしゃるようにMTAは気体ではなく液体に溶け込んだ状態で働いていると想像</p>	

しています。

【質問5】ドーム形成に関しては、シャーレがあるから成立するものだと考えるが、生体中やスフェロイドでドームは成り立つのか。

【回答5】先生のおっしゃる通り、ドームは2次元培養で見られる特徴的な構造体です。一方、記憶が少し曖昧なのですが、オルガノイドなどの3次元培養では環状になるという報告があったと思います。生体内でMTAがどのような効果を持つかは興味深いところですが、私の研究では、2次元培養で腸の吸収能力が反映されたドームを分化組織と捉えて実験を進めました。

【質問6】未分化をどう定義しているのか。癌細胞は成熟分化まで段階があるが、これらの段階の中でRCM-1が未分化段階に相当するという証拠はあるのか。

【回答6】ご指摘ありがとうございます。がん組織やそれに由来する細胞株はヘテロな細胞集団で、個々の細胞の分化程度も様々と考えています。低分化型がんは未分化やそれに近い性質を持った細胞の割合が多く、一方、高分化型がんは未分化な細胞もあるが、比較的分化が進んだ細胞の割合が高い集団と考えられています。したがって、RCM-1細胞株が未分化に相当するかと問われると答えようがありません。私は、RCM-1のドーム部分を分化した細胞集団、或いは見かけ上分化した細胞集団と考えたので、その対照としてドームを形成しない部分を未分化細胞集団と考えました。また、薬剤を投与してないRCM-1細胞株は相対的に未分化的と考えました。

【質問7】溶媒にアセトニトリルを使っているが、細胞毒性はあるのか。DMSOはそもそも分化促進剤としては有名なため、避けたいところではあるが、その代わりにアセトニトリルを使ったら分化に影響はないのか。

【回答7】共同研究者の系に倣い、当初はアセトニトリルを溶媒として用いました。使用した濃度範囲ではドーム形成に影響はなかったと記憶しています。その後、薬理学的解析を行うに当たってDMSOでないと溶けない薬剤がでてきたので、その後はDMSOを溶媒として用いました。私もDMSOが分化を誘導することを知っていましたので、使用する濃度範囲ではRCM-1細胞でドームを誘導しないことを確認した上で使いました。

【質問8】ドーム形成アッセイの期間がどの程度かかるのか、結構、薬の開発となると、2-3日から1週間出ないといけないと考えられるのだが。

【回答8】RCM-1細胞の前培養に1日、薬剤を添加してからドームができるのに2日なので、トータルで3-4日あれば結果が出ます。したがって、薬剤開発にも利用できると考えられます。