

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 256 号	学位申請者	下川 充芳
審査委員	主査	古川 龍彦	学位
	副査	谷本 昭英	副査
	副査	夏越 祥次	副査
副査		橋口 照人	

主査および副査の 5 名は、平成 25 年 9 月 18 日、学位申請者 下川 充芳 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) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌は局所再発や転移が多いのか。転移の場所はどこが多いのか。

(回答) 局所再発が多く、リンパ節転移を起こした報告がある。

質問 2) 他の間葉系マーカー、MMP-2 や MMP-9、ファイブロネクチン、カベオリンなどの検討は行っていないか。

(回答) 今回の実験では検討していないが Snail によって上昇するとの報告がある。

質問 3) COX-2 のプロモーター解析で使用した HEK293T 細胞はどのような細胞なのか。

(回答) Human embryonic kidney (HEK) の細胞をアデノウイルスの E1 遺伝子によってトランスフォームした細胞株に SV40 ウイルスの large T 抗原を強制発現させた培養細胞であり遺伝子導入効率が高いため使用した。

質問 4) Snail によって COX-2 が低下するのは紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌に特異的なのか。

(回答) 今回の研究では他の癌細胞の検討までは行っていないため判断することはできないが、皮膚扁平上皮癌細胞で Snail によって安定して EMT を起こした細胞では COX-2 の発現が低下していることが確認された。

質問 5) Snail を核に留まらせる仕組みはどのようなものがあるか。

(回答) GSK3 β や protein kinase D1 などが Snail を分解したり核外へ排出させたりしている。癌細胞で Snail が上昇している状態ではこれらの働きが抑えられていると考えられる。

質問 6) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌は有棘細胞層から発生するのか。

(回答) 皮膚扁平上皮癌として発生し紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌へと転換を起こすと考えられる。両者の途中段階、移行段階の状態も存在すると考えられる。

質問 7) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌の分化の傾向は検討したか。間葉系への分化の際に、線維芽細胞の方向への分化が強かったり、血管新生が強く働いたりするのか。

(回答) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌の分化の傾向、性質に関する詳しい解析は行わなかった。

質問 8) EMT の状態で COX-2 が抑制されているが、COX-2 によって MET を起こすという報告はあるのか。

(回答) COX-2 によって MET を起こすという報告はなかった。

質問 9) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌はリンパ行性転移が多いのか。血行性転移が多いのか。

(回答) 症例数が少ないがリンパ行性転移が多いと考えられる。

質問 10) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌で Snail 以外の分子、Slug や Zeb1 などの関連を調べた報告はないのか。

(回答) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌で他の EMT に関わる分子を調べた報告はなかった。

質問 11) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌の EMT と cancer stem cell との関連性はあるのか。

(回答) Cancer stem cell の発生に Snail が重要だとの報告があるが、今回の実験では検討しなかった。

質問 12) 培養細胞の蛍光免疫染色を行った際に Triton X-100 で処理後、培地に反応させたのはなぜか。

(回答) 抗体の非特異的結合を抑える目的で用いた。ウシ血清アルブミンやゼラチンも使われるが、今回使用した培地には血清が含まれ、多様なタンパク質への非特異的結合を抑える目的で用いた。

最終試験の結果の要旨

質問 13) ウェスタンブロットの際に Vinculin をコントロールとして用いたのはなぜか。

(回答) Vinculin は Snail によって発現量が変化しないためコントロールとして用いた。

質問 14) E-cadherin のプロモーター領域にも E-box があるのか。

(回答) E-box があります。

質問 15) COX-2 や E-cadherin の転写を上げるモチーフとしてはどのようなものがあるのか。

(回答) 転写を上昇させるモチーフは把握しておりません。

質問 16) 腎細胞癌では上皮系のマーカーのケラチンと間葉系のマーカーである Vimentin が上昇しているが EMT といえるのか。

(回答) 上皮形態を保ち、上皮系マーカーが残っている状態では EMT と言い難いと考えますが、EMT が多段階のプロセスであるとするれば、Vimentin の上昇はその途中にあることを示しているのかもしれない。

質問 17) EMT の定義は何か。

(回答) 上皮系マーカーである E-cadherin、ZO-1 の低下と、間葉系マーカーである Vimentin、N-cadherin、HSP47 などの上昇と共に、紡錘形態への変化が起こることが条件と報告されている。

質問 18) 皮膚扁平上皮癌の COX-2 発現の上昇は転写が上昇しているのか。

(回答) 転写が上昇することで発現が増している。

質問 19) Snail 発現株のクローンを樹立した際に Snail の発現量の違いは COX-2 の発現に反映されていたか。

(回答) 遺伝子導入の効率が高く、EMT を起こした細胞でのみ変化が認められた。

質問 20) レポーターアッセイの際に pRL-CMV ベクターを使用したのはなぜか。

(回答) 実験ごとにベクター導入効率が変化するので、それを補正する目的で、Snail の有無で変化しない pRL-CMV を使用した。

質問 21) Fig. 3a で HaCaT 細胞の COX-2 の発現はなぜ A431、HSC5 細胞より低いのか。

(回答) HaCaT 細胞は non-tumorigenic な細胞で COX-2 の発現は低い。

質問 22) 癌組織の中では COX-2 の発現の異なる細胞が混在しているのか。

(回答) サイトカインの影響や細胞の密度など、環境による変化を受け、均一ではないと考える。

質問 23) 文献 27 との違いに関して、mutant estrogen receptor hormone-binding domain で Snail の働きが変わったのか。変わるのであれば文献 27 に記載された他分子の転写も下がらないのではないのか。

(回答) 挿入されたドメインにより変化したと考えている。他の分子の転写が下がらなかった理由は不明であるが、次の可能性が考えられる。Snail の機能は Snail が単独で働くというよりは、他の因子(共役因子)との作用により、転写の抑制や促進が起こると考えられる。因子のプロモーターへの結合は Snail への結合だけでなく、プロモーター部位の塩基配列も重要であり、塩基配列が標的遺伝子によって異なるため、異なる結果が出たのではないのか。

質問 24) レポーターアッセイの際に A431 細胞では行わなかったのか。

(回答) A431 細胞は、遺伝子導入効率が低く、評価するのに適切な結果を得られなかった。

質問 25) Fig. 4 のレポーターアッセイで発現量の差がなかったか。

(回答) Fig. 4 で COX-2 プロモーターの c (-1432/+59) と d (-327/+59) の発現量に差はなかったが、e (-134/+59) の発現量には低下が認められた。

質問 26) 紡錘形細胞型皮膚扁平上皮癌 6 例では COX-2 の発現は消失しているのか。

(回答) 消失ではなく減弱していると考ええる。

質問 27) Fig. 4 で Snail の発現で COX-2 プロモーターの活性が c (-1432/+59) よりも d (-327/+59) の方が下がっているのはなぜか。

(回答) 原因は不明だが、両者に差はないと考えた。しかしながら Snail 以外の、例えば共役因子の結合部位の有無が異なる値を生じさせた可能性は残る。

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。