

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 372 号		学位申請者	吉村 卓也
審査委員	主査	杉浦 剛	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	仙波 伊知郎	副査	後藤 哲哉
	副査	徳田 雅行	副査	野添 悦郎

主査および副査の5名は、平成28年3月10日、学位申請者 吉村 卓也 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) 共著者が多いが自身で行った実験ほどの程度あるか？

(回答) 全ての実験を申請者が行った。

質問2) 細胞株を2つ用いて、異なった結果になっているところがあるが、2つの細胞に違いはあるのか？

(回答) 2つの細胞株の一番大きな違いはT47Dには男性ホルモンの受容体が発現している点であるが、今回の実験で細胞間に差が出た原因に関しては検討していない。

質問3) E2を添加するとPEP19発現が増加しているが、乳癌の遊走、浸潤にはホルモンの影響が大きいのか？

(回答) ホルモンの影響が大きいことは以前から報告されている。PEP19をknockdownすればE2刺激をしても遊走、浸潤を抑制したという結果から、PEP19の増加がE2刺激による遊走、浸潤制御の一端を担っていると考えている。

質問4) 正常乳腺細胞でのPEP19の発現はどうなっているのか？

(回答) 過去の報告から正常乳腺組織でも量は少ないが発現していると考えられる。

質問5) 細胞質と核での発現が見られるがその意味は何か？

(回答) 今回はPEP19が細胞質、核の両方で発現している以上の検討は行っておらず、今後検討していく。

質問6) vinculinがBmi-1、PEP19をknockdownしたものでも4~5個発現しているが、この意味は何か？

(回答) 遊走浸潤が抑制された細胞では全く発現しないというものではない。knockdown前の細胞に比べて減少していることで遊走能、浸潤能が低下していると考えられた。

質問7) T47DではE-cadherinの発現に有意差がなかったことに関してはどう考えているか？

(回答) western blotのdensitometryでは差を検出できていないが、細胞の免疫染色では細胞膜での発現増加を認めており、細胞膜分画を用いたwestern blotを行うべきだったと考えている。

質問8) Cdc42、Rac1がPEP19のknockdownでは変化しているのか？

(回答) 今回の結果ではPEP19のknockdownではRho/Cdc42/Rac1の活性に変化はなかった。

質問9) 今後唾液腺癌での実験を検討しているようだが、乳癌のように唾液腺癌でも性差があるのか？

(回答) 組織型によっては性差があると言われているものもあるが、一般的に大きな差はないと言われている。しかし、過去に乳癌治療を唾液腺癌に応用する検討や、実際に臨床的に奏効した症例報告もある。

質問10) 乳癌は骨転移が最も多い癌であるが、骨転移とPEP19の関係に関しては報告があるか？

(回答) 現在のところない。骨とPEP19の関係では骨髄間葉系幹細胞の骨分化過程でのPEP19の発現増加が報告されている。

質問11) PEP19を用いた創薬という観点ではどういったものを考えているか？

(回答) 分子標的薬を考えているが、今後の検討課題である。

最終試験の結果の要旨

質問 12) knockdown 効率が非常に良いが効率をあげるのに苦労したか？

(回答) 前の研究で条件検討を行っており、MCF-7 に関しては使用試薬 (Lipofectamine RNAiMAX) のプロトコールが公表されているため、濃度検討などだけでそれほど苦労はしなかった。

質問 13) 正常組織で発現していて、癌で発現増加するのであれば普段は抑制される等の制御機構が存在するか？

(回答) 現在のところ、答えになるような報告はなく、今回の実験からも不明である。

質問 14) 乳癌以外の癌でも発現が増加しているか？

(回答) 報告はないが、唾液腺癌での発現増加は臨床検体を用いた免疫染色にて確認している。

質問 15) 治療薬に応用したとき Bmi-1 より PEP19 の方が有効であると考えるか？

(回答) Bmi-1 は上流であるので、予期しない副作用等を考えると PEP19 の方が治療標的としては利用しやすいと考える。

質問 16) 増殖能の変化が今回の結果に影響を与えていないか？

(回答) 各群の増殖曲線を引き、影響がでないと考えられるタイムコースで実験を行っている。

質問 17) PEP19 による抗アポトーシス作用はどのような経路が関係しているか？

(回答) CAMKK2、Akt を介した経路や caspase では 3/7、9 の変化が報告されている

質問 18) エストロゲン受容体はどんなもので、そこからどのように PEP19 につながっていくか？

(回答) エストロゲン受容体は核内受容体であり、リガンドが結合することによって転写因子として働くが、PEP19 の発現変化の制御機構は不明であり、今後検討していきたい。

質問 19) PEP19 が核から細胞質に移動していくことに意味があるか？

(回答) 今回の結果では PEP19 が細胞質と核の両方に発現していることがわかっただけで、核から細胞質に移動しているとは言えない。両方で発現している意味に関しては今後の検討が必要である。

質問 20) vinculin を見た実験ではどのくらい接着させた細胞で見ているか？

(回答) 3 日培養した細胞を染色して評価した。

質問 21) Bmi-1 の western blot ではなぜバンドが 2 本なのか？

(回答) 41、43kDa を検出する抗体であり、2 本とも Bmi-1 を検出しているが、2 本の違いは不明であった。

質問 22) wound healing assay でコートされていない dish で行っているのはなぜか？

(回答) type I collagen でコートされた dish でも行ったが細胞の動きが悪かったため。

質問 23) invasion assay では insert 下方をさらにマトリゲルでコートすべきで、これではケモタキシスではないか？

(回答) 一般的によく用いられる基底膜コートされた insert とプロトコールで行っている。基底膜マトリックスを破り 8 μ m の pore を通過して insert 下方に移動した細胞を浸潤した細胞と考える実験であり、さらにマトリゲルで insert の下方をコートする必要はないと考える。

質問 24) PEP19 が接着に関与するメカニズムはどう考えているか？

(回答) 今回検討した限りでは不明であったが、インテグリンに関連した検討を行う予定にしている。

質問 25) PEP19 の knockdown で接着能が低下するという結果を示したのはなぜか？

(回答) PEP19 と anoikis との関連を検討するために示した。

質問 26) 抗体薬として利用することを考えるなら細胞質、核にどうやって届けるか？

(回答) 今後の検討課題と考えている。

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しての学力・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。