

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 357 号	学位申請者	宮崎 優美
審査委員	主査	小賤 健一郎	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 秋葉 澄伯
	副査	上野 真一	副査 三井 薫

主査および副査の5名は、平成28年2月4日、学位申請者 宮崎 優美 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) 癌細胞が EMT を起こし、原発巣から血管内、原発巣への流れがあるとする場合、膵臓癌における CD133 陽性細胞は、分化型・未分化型・正常に近い細胞などどのような状態の細胞と考えるか。

(回答) CD133 陽性細胞は、治療抵抗性がある事が解っている。正常幹細胞では薬剤排出能を持つとされ CD133 陽性細胞もこの機能をもっているとすれば、幹細胞に近い細胞であると考えられる。

質問2) CD133 陽性細胞は全て EMT をおこすのか。

(回答) 全ての CD133 陽性細胞が EMT をおこすとは考えていない。

質問3) 動物実験において、肺・肝への転移が認められたが、転移先での EMT の解析は行ったか。

(回答) 今回の実験では、転移先における EMT の解析は行っていない。EMT 観察のための重要な検討課題とする。

質問4) DNA microarray において、間葉系マーカーとして Slug, N-cadherin, Fibronectin の上昇が認められたが、他の間葉系マーカーである ZEB1 や Snail は EMT への関連は無かったのか。

(回答) ZEB1 や Snail の DNA microarray による解析の結果、CD133 陽性細胞では発現が高いので、全く関与しないとは考えにくい。Slug, N-cadherin, Fibronectin の発現は顕著に高く、今回の実験で用いた細胞ではこれらの遺伝子が EMT に関与していると考えている。(Table S1)

質問5) N-cadherin の発現は CD133 陽性細胞で上昇を認めたが、E-cadherin の発現に差を認めなかった事はどう解釈しているか。

(回答) 他、N-cadherin, E-cadherin が共発現している細胞は遊走能・浸潤能が N-cadherin のみ発現している細胞と比較して増加すると報告がある。今回の実験では免疫染色にて N-cadherin, E-cadherin の共発現は確認していない。N-cadherin, E-cadherin がそれぞれ発現している細胞が混在していると考えられる。

質問6) Capan-1 と CapanM9 の CD133 の発現の差を western blot や mRNA レベルでの解析でも確認しているか。

(回答) western blot や mRNA レベルでも Capan-1 と比較し、CapanM9 の方で CD133 の発現上昇を既に報告している。

質問7) Src, ERK のリン酸化と CD133 の発現・結合についてどう考えているのか。

(回答) 免疫沈降の結果、pSrc と pERK と結合している事が示唆された。他の報告では、CD133 の発現は Src, ERK の活性化に依存している。

質問8) 他の CD133 陽性細胞が癌幹細胞とされる癌、例えば大腸癌などでも、今回の実験の結果の様な ERK, Src の関わるシグナルの活性化や EMT は共通に起こると考えているか。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) 大腸癌のおよそ半数で Src の活性化があると報告があるため、CD133 陽性細胞内の Src が活性化され今回の実験の様な結果になる可能性はあると考えている。

質問 9) Cadherin スイッチについて、EMT の一番の標的として考えているか。

(回答) EMT に関連する遺伝子は N-cadherin のみではなく、その他の遺伝子が活性化することは十分に考えられる。癌の置かれた環境によって EMT 誘導のメカニズムは異なると考えている。

質問 10) EGF による刺激は cell cycle も活性化するとされるが、EMT 誘導と同時に起こりえるのか。

(回答) 今回は、cell cycle に関して実験を行ってはいないが、cell cycle と EMT のシグナルが同時に活性化される事は可能ではないかと考えている。

質問 11) 治療への展望はどう考えているか。

(回答) 今回は、基礎的な研究を目的としているため、治療にどう生かすかは非常に難しいが、EGFR 阻害剤は現在使用されているため、今後 EMT 阻害剤の開発に期待したい。

質問 12) Capan1M9 の CD133 の発現は安定しているか。

(回答) マウスへの移植実験では同所性移植の結果、CD133 の発現は腫瘍細胞の多くで確認された。In vitro の実験では、長期間の培養で CD133 の発現は減少していく。

質問 13) Fig.4D で Src inhibitor による CD133 の発現の減少が非常に早い時間から起こっているがなぜか。

(回答) 大変興味あるメカニズムと考えているが、今回、具体的な検討は行ってはいない。今後の検討課題としたい。

質問 14) 阻害剤の実験の際、cell cycle はどの部分にあると考えているか。

(回答) cell cycle は様々な状態にあり、一様に同じ状態では無いと考えている。

質問 15) CD133 陽性細胞による bystander effect は存在すると考えているか。

(回答) 今回は、CD133 陽性細胞のみ解析を行ったため CD133 陰性細胞に対する、CD133 陽性細胞による bystander effect の存在は明らかになってはいない。癌細胞・癌幹細胞が周辺の細胞に対しニッチを形成させる様な働きをしていると示唆する報告はある。

質問 16) CD133 陽性細胞と Knockdown 細胞では形態的に変化があるか。

(回答) CD133 陽性 Capan1M9 細胞では間質様細胞の形態を示す割合が多かったが、CD133 抑制により島状コロニー(細胞間接着強)の上皮様形態を示した。形態学的にも CD133 と EMT の関連が示唆された。

質問 17) 癌腫や細胞株による CD133 の癌幹細胞マーカー特性の違いは、EMT で全て説明できるか。

(回答) 他の癌種においても、CD133 の発現が Stemness(造腫瘍能など)と EMT(転移、遊走能)と相関する報告がある。未だ一般化はできないが、CD133 が癌幹細胞マーカーである癌腫では CD133 と EMT との相関が推察される。

質問 18) apoptosis や増殖について何か実験は行ったか。

(回答) 今回の実験では検討を行っていない。通常培養条件下では、増殖曲線は Capan1M9, shCD133M9, shSlugM9 は同じであるため、apoptosis も 3 細胞間に差は無いのではないかと考えられる。

質問 19) 動物実験で、転移先での CD133 の発現は確認されたか。

(回答) 転移先での CD133 の発現は免疫染色で確認された。

質問 20) 癌幹細胞と正常幹細胞の違いは何か。

(回答) 癌幹細胞も正常幹細胞と同様の性質を持っている。大きな違いは、正常幹細胞から分化した細胞が、最終的には分裂できなくなるのに対し、癌幹細胞から分化した癌細胞は、引き続き分裂、増え続けるという点にある。

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。