

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 最上 多恵

横浜市立大学大学院医学研究科 生殖生育病態医学

## 審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	大野 茂男
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	青木 一郎
副査	横浜市立大学大学院医学研究科教授	窪田 吉信

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells

(Annexin A4 は、卵巣明細胞腺癌細胞株の増殖、抗癌剤抵抗性、運動能・浸潤能に関連している)

本研究では、卵巣明細胞腺癌で高頻度に高発現している annexin A4 の機能を、卵巣明細胞腺癌細胞株で発現抑制系を用いて検討した。さらに、異なる等電点をもつ annexin A4 の 2 つのサブタイプの発現を検討した。その結果、annexin A4 発現抑制は卵巣明細胞腺癌細胞株において増殖能、運動能・浸潤能を抑制し、抗癌剤感受性を改善した。表現型所見のうち顕著な変化が、酸性型 annexin A4 発現細胞株と塩基性型発現細胞株で異なったことから、サブタイプの構造的差異の可能性を  $\text{Ca}^{2+}$  ion 結合、アセチル化、リン酸化の翻訳後修飾の検討、機能的差異の検討を臨床データとの比較で行い、決定的な結論には至らなかったが、サブタイプが細胞株、臨床検体で様々な比率で発現していることを示した。

以上の要旨の説明が行われた後、以下のような質疑応答がなされた。

まず、窪田副査から、1) annexin A4 に関連した増殖能亢進、抗癌剤抵抗性の機序として現在最も想定しうるものは何か、2) annexin A4 高発現の機序として現在最も考えうるものは何か、3) 用いた細胞株は元来抗癌剤抵抗性か、の質問がなされた。これらに対し、1) 増殖能に関連する経路の中では、phospho-Akt, phospho-CDK1 の増加、抗癌剤抵抗性に関連するタンパクの中では、ATP7A の機能亢進の報告がある、2) 共同研究グループからの知見である WT p53 による annexin A4 の転写促進が挙げられる、3) IC50 値からも他多種の癌細胞株に比較して抵抗性であると言える、との回答がなされた。

次に、青木副査から、1) 今後の実験計画は何か、2) 増殖能亢進や抗癌剤抵抗性、浸潤能亢進にまつわる annexin A4 関連の機序は同一のものか異なるものか、3) 卵巣明細胞腺癌細胞株で annexin A4 の発現を抑制すると組織型はどう変化するのか、の質問がなされた。これらに対し、1) 酸性型・塩基性型の発現比率と、annexin A4 発現抑制による増殖能、抗癌剤感受性、運動能・浸潤能の変化の分かっている OVTOKO, OVISE について、annexin A4 発現の細胞内局在を未処理、ionomycin 処理による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ion 濃度上昇の双方で、

immuno-staining によって調べ、もし差を認めるなら、さらに酸性型・塩基性型の構造上の差異を知る目的で、FLAG-tagged annexin A4 の強制発現の実験を再試行する。もし差を認めないなら、別の道筋として、マイクロアレイを行い、annexin A4 発現抑制によって有意に発現が増加、低下するタンパクをOVTKO, OVISE で比較し、validation を行い、さらに発現抑制もしくは強制発現を行って、annexin A4 発現抑制によって変化した表現型が元に戻るか調べる、2) 我々の研究結果で細胞種によって有意に変化する表現型が異なったり、既存の報告から、別々の経路が主に関わっていると推測する、3) *in vitro* で顕微鏡下には annexin A4 発現抑制で特に形態変化を認めない、xenograft での検討は既存の報告も含めて行われていない、との回答がなされた。

最後に、大野主査から、1) xenograft による腫瘍形成能を検討することは行われたか、2) 酸性・塩基性型 annexin A4 に注目した細胞株、臨床検体それぞれの実験結果の異なったりした点は具体的に何か、3) 翻訳後修飾の検討で、特に酵素処理では positive control をどのように設定したのか、の質問がなされた。これらに対し、1) 本研究、既存の報告では行われていない、3) 同様の処理をした検体を電気泳動、汎リン酸化抗体で blotting を行い、未処理検体に比較して band の減弱・減少を確認した、との回答がなされた。2) については、表現型ごとに細胞株と臨床検体の結果比較の発表がなされた。

その他にもいくつかの質問がなされたが、いずれも適切な回答がなされた。

本研究は、annexin A4 の癌細胞における増殖能亢進、抗癌剤抵抗性、運動能・浸潤能亢進との関与を、初めて卵巣明細胞腺癌細胞株で示した。また、初めて2次元電気泳動による酸性型・塩基性型 annexin A4 の分離を臨床検体で行い、それぞれが様々な比率で発現していることを明らかにしたものであり、博士（医学）の学位に値すると判断された。