

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 550 号	学位申請者	比嘉 那優大	
審査委員	主査	谷本 昭英	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査	田川 義晃
	副査	谷口 昇	副査	奥野 浩行

主査および副査の5名は、令和2年2月17日、学位申請者 比嘉 那優大 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) FMNL1以外に FMNL2、FMNL3があるが、なぜ本研究は FMNL1 のみに注目したのか？本研究の膠芽腫臨床サンプルにおける FMNL2、FMNL3 はどうであったのか？

(回答) TCGA データベースでは FMNL2、FMNL3 は予後に差がなく FMNL1 のみが予後因子であった。そのため今回は FMNL2、FMNL3 に関しては検討を行っていない。

質問2) 今回用いた FMNL1 抗体はどのような定量性の評価を行ったのか？FMNL1 は核に陽性なのか？

(回答) 本研究の FMNL1 抗体は他の報告でも使われており信頼性がある。先行研究として IHC スコアリングと color deconvolution method では高い相関性があることがわかっており、壊死組織を含まない5視野での平均値で検討した。局在に関しては、既知の報告では細胞質に陽性であるが、我々のデータでは核と細胞質両方に陽性であった。今後は、核と細胞質を分離してウェスタンブロットを行い検証していきたい。

質問3) FMNL1 免疫染色を中央値で分ける科学的あるいは臨床的根拠はどのようなものであるか？

(回答) FMNL1 に関しては臨床検体を用いた検討の報告はない。より客観性を担保するために中央値で分けている。

質問4) FMNL1 の siRNA による mesenchymal markers への影響は一貫性のある結果が得られず、FMNL1 過剰発現実験では一貫性のある結果が得られている。この違いについて説明してください。

(回答) siRNA は一時的なノックダウンであるため一貫性のある結果が得られていないが、過剰発現株では恒常的に FMNL1 を過剰発現しているためシグナルが下流へ伝わりやすい可能性が考えられる。

質問5) FMNL1 が下流因子である DIAPH1 と GOLGA2 をどのように制御していると考えるか？ウェスタンブロットではなく qRT-PCR で定量したことはないか？

(回答) 今回は PCR での検討は行っていない。FMNL1 と DIAPH1 が共発現しているデータはあるが、IP では両蛋白の結合は認めなかった。詳しいメカニズムは今後の課題としたい。

質問6) 浸潤細胞数/遊走細胞数の比を取れば DIAPH1 の発現抑制によって値は上昇する。これはなぜか？

(回答) 指摘のとおり、浸潤細胞数/遊走細胞数の比をとると矛盾が生じる。この点に関しては今回の研究では明らかにできなかった点であり、今後の課題としたい。

質問7) FMNL1 発現を介した腫瘍悪性化機構の関連の可能性を論じて下さい。

(回答) FMNL1 はシナプス伸張に関連するという報告がある。FMNL1 は mesenchymal marker であると考えられ、proneural type から mesenchymal type に移行する key regulator であるかどうかを今後検討していきたい。

質問8) 膠芽腫の発生母地は？正常のグリア細胞で FMNL1 は発現しているか？

(回答) グリア細胞である。正常グリア細胞では FMNL1 は発現していない。

質問9) 膠芽腫になると FMNL1 が発現するメカニズムはわかっているか？

(回答) 本研究では明らかになっていない。既知の報告でも明らかになっていない。

FMNL1 は悪性腫瘍の侵襲性に関与しているという報告はあり、癌化に関与している可能性はあると思われる。

質問10) FMNL1 をノックダウンすると膠芽腫細胞と HeLa 細胞では P アクチンの発現が逆になるのはなぜか？

(回答) FMNL1 には 10 種類程度のバリエーションが存在し、今回の実験では FMNL1 のバリエーションも含めてノックダウンしている。HeLa 細胞の報告では FMNL1 α をノックダウンしており、バリエーションの違いが関与している可能性がある。

質問11) 4つのサブクラスの mesenchymal ではなく proneural, classical, neural についてはどうか？

また具体的に4つのサブクラスで5年生存率はどのくらい異なるのか？2倍以上異なるのか？

(回答) proneural type は若年、薬剤が効きやすい、IDH1 変異を多く認めるといったような特徴がある。Mesenchymal subtype は予後不良であるとするデータが多い。予後については正確なデータを持ち合わせていないが、2倍以上異なることはない。

質問12) 遺伝子プロファイルによる分子分類によって治療法の違いがあるのか？

(回答) 現段階ではテモゾロミドとベバシズマブ以外に治療選択肢がなく、新しい治療法の探索が必要であると考えられる。

質問13) Table1 でクリニカルスケールや腫瘍のグレードがないのはなぜか？

(回答) 他の癌腫では TNM 分類があるが、脳腫瘍に関しては TNM 分類はなく、WHO 分類のみである。

質問14) 手術の摘出度については具体的にどこまでとると良いのか？摘出度は術前後の MRI を比較しているのか？

最終試験の結果の要旨

(回答)手術での摘出度が高いほど予後良好というデータがあり、具体的には95%以上の摘出があると予後は良くなる。術前後のMRIで摘出度を判断している。

質問15) FMNL1をノックダウンするとmesenchymal markersの結果が一貫性がないことはどのように考えているか？

(回答) siRNAを用いたことが要因と考える。shRNAを用いて恒常的にノックダウンして検討する必要があると考える。

質問16) proneuralからmesenchymalに移行し、悪性度が上がっていくという理解でいいか？

(回答) そのとおりである。

質問17) FMNL1をノックダウンした時にmesenchymalからproneuralに戻ることはあるのか？

(回答) 今回は検討していないが、FMNL1をノックダウンした時にproneural markersが上昇すればより、proneural to mesenchymal transitionを制御している遺伝子である可能性は高まると考える。

質問18) 今回使用したU251MGとDBTRG-05MGはmesenchymal subtypeの性質を持つのか？

(回答) mesenchymalの性質を持つかどうかは分からない。

Subtypeを分類するには約800遺伝子を解析する必要がある。

質問19) アクチンリモデリングと遊走との関係は？

(回答) Gアクチンが重合することでFアクチンが形成される。アクチンフィラメントの一方でアクチン重合が起きFアクチンが形成され、もう片方で脱重合がおきる。このようにアクチンフィラメントが伸縮を繰り返すことで細胞運動に関与している。

FMNL1をノックダウンするとFアクチンの形成が阻害され、細胞の運動性が低下する。

質問20) FMNL1ノックダウン時に、DIAPH1とGOLGA2の発現に戻すとFMNL1をレスキューできるかどうか？

(回答) レスキュー実験は行っていない。今後の検討課題としたい。

質問21) GOLGA2と浸潤能との関係は？

(回答) 浸潤に関係するMMPは前駆体として分泌され、ゴルジ体で活性化となる。

FMNL1とゴルジ体の関連が報告されており、FMNL1をノックダウンすることでMMPの活性化が阻害され浸潤能に影響を及ぼすと考えられる。

質問22) FMNL1でのノックアウトマウスの報告はあるか？

(回答) ノックアウトマウスの報告があり、FMNL1は減数分裂に関与する報告がある。

質問23) FMNL1を制御している上流分子は何か？

(回答) FMNL1の上流にはRhoファミリーが存在すると報告されている。特にRhoAとRac1との関連の報告がある。

質問24) ゼラチン・サイモグラフィでMMP2に関してはどうだったのか？

(回答) MMP2に関しては変化は認められなかった。

質問25) DIAPH1とGOLGA2をノックダウンした時のMMP9の発現は見ているのか？

(回答) 本研究では検討していない。今後検討を行っていく。

質問26) 浸潤・遊走能アッセイの評価は複数人で行っているか？

(回答) 私一人で行っている。5視野を検討し、3回以上再現性が取れていることを確認している。

質問27) GOLGA2は浸潤能、遊走能ともに制御しているのでDIAPH1は必要ないのではないか？

(回答) GOLGA2は浸潤能、遊走能共に制御しているが、主に浸潤能を制御しており遊走能に与える影響は少ないと考えている。遊走能に関してはGOLGA2単独では弱いと考え、もう一つの下流分子であるDIAPH1も検討を行った。

質問28) FLAG-FMNL1とFMNL1が同じ分子量に見えるのはなぜか？FLAG抗体も使用して検討しているか？

(回答) FLAGは分子量が低く、FMNL1は分子量が大きいためほとんど差がないように見えている。FLAG抗体も使用してFLAG-FMNL1を検出している。

質問29) FMNL1を過剰発現させると遊走能が亢進し、ノックダウンすると浸潤・遊走能が共に低下している。

またFMNL1を過剰発現させるとDIAPH1のみ上昇し、FMNL1をノックダウンするとDIAPH1、GOLGA2共に発現が低下する。この矛盾はなぜか？

(回答) FMNL1をノックダウンする時には10種類程あるバリエーションもノックダウンしているが、過剰発現ではfull lengthのFMNL1のみを過剰発現させているので、バリエーションがこの矛盾に関与している可能性がある。

質問30) 浸潤・遊走能アッセイ時は、増殖活性に影響がないことが前提である。FMNL1は増殖能に関係しないのか？

(回答) FMNL1をノックダウンすると増殖能が低下する。しかし、浸潤・遊走能アッセイを行っているタイミングでは増殖能に差がないことを確認している。

質問31) 増殖能が低下している時には細胞は死んでいるのか？またその時は細胞は浮いているのか？

(回答) MTTアッセイで検討しているので、細胞は死んでいると思われる。その際は細胞は浮いている。

質問32) FMNL1過剰発現とノックダウン時に細胞種を変えているから矛盾が生じている可能性がある。

同一の細胞株で過剰発現、ノックダウンする方が良いと思われるが、どう考えるか？

(回答) 今回は検討していないが、U251MGでノックダウンだけでなく過剰発現して検討するのは興味深いと考える。

質問33) FMNL1をノックアウトしてノックインに戻すとどうなるか？

(回答) 最初はshRNAを使用してノックダウン細胞株を樹立しようとしたが、FMNL1が細胞生存にcriticalな影響を及ぼすのかshRNAを導入すると細胞株が樹立できなかったため今回はsiRNAを使用した。

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。