

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 708 号	学位申請者	小野 裕右
審査委員	主査	中田 匡宣	学位
	副査	南 弘之	副査
	副査	原 博満	副査
			博士 (歯学)
			西谷 佳浩
			犬童 寛子

主査および副査の5名は、令和5年6月16日、学位申請者 小野 裕右君に面接し、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) Figure5Bにおいて、5日間での評価を行なっているが、1日ごとの動的な評価は行われているのか?

(回答) 細胞播種後、1~5日目まで画像撮影を行なっているが、3日目までは播種後の形態を保ったまま細胞の増殖が認められ、その後方向性を持った浸潤が認められる。5日目は浸潤度の差が最も大きく、評価に最適時期と判断した。

質問2) 共培養においてIL-1 α がHFF-2細胞にどのような影響を与えていると考えられるのか?

(回答) 今回の結果では、増殖能に有意な差は与えないことがわかっている。また、論文のデータとしては出ていないが、HFF-2細胞からのIL-6およびIL-8の分泌を促進し、細胞浸潤に影響を与えているというデータもある。

質問3) この研究の結果から、どのような臨床応用が可能であるか?

(回答) 手術や生検の際に得られた検体からIL-1 α が認められれば、再発の可能性が高いと判断でき、術後療法の適応や、経過観察の期間の目安の判断材料となり得る。アンタゴニストで浸潤を抑制するという治療にも応用できる可能性がある。

質問4) エナメル上皮腫は良性であるが、悪性や転移性腫瘍との決定的な違いは?

(回答) 上皮間葉転換により、細胞接着が失われることで遠隔転移と言われていた悪性腫瘍と違い、本疾患は上皮の性質を保つことがわかっており、遠隔転移等は通常起こらない。

質問5) Boyden-chamber法の手法をさらに詳細に説明できるか?

(回答) Boyden-chamberは上下二層のチャンバーから構成され、上側chamberには多数の小孔(本研究では $\phi 8\mu\text{m}$)がある。小孔を通過し、底面のフィブロネクチン面に付着した細胞数を、任意の3視野で平均して運動能の指標とした。

質問6) Figure5Bにおいて、HFF-2細胞もAM-3細胞方向へ遊走している様に見えるが、その可能性はあるのか?

(回答) HFF-2細胞の遊走能は今回評価していないが、実験をしている中で明確な方向性を持った遊走は確認できていない。

質問7) 細胞遊走は細胞にどのような変化が起こることで運動するのか?

(回答) ミクロで見ると、細胞が遊走方向へフィロポディアなどの仮足を形成していることが知られているが、今回は細胞一つ一つの評価は行えていないため、同様の現象が起こっているかどうかは評価できない。

質問8) 補助療法で、海外ではBRAF阻害薬を使用したという報告があるが、AM-3細胞ではBRAFは変異型であるか?

(回答) 本疾患では全体の6~7割でBRAFの変異が認められるが、今回の細胞株ではBRAFの変異は確認していないので不明である。

質問9) AM-1、AM-3細胞はそれぞれ叢状型と濾胞型細胞株であるが、MMP-2,-9の分泌の違いは組織型の違いか?

(回答) 臨床的には濾胞型は叢状型より再発率が高いことが知られているが、MMP-2やMMP-9の発現や分泌の多さは臨床像と一致している。しかし、コラゲナーゼの分泌のみが組織型の違いといえるかは明らかではない。

最終試験の結果の要旨

(708)

質問 1 0) 今回実験で使用している IL-1 α の濃度は 5ng/mL であるが、この濃度はどの様に決定したのか。

(回答) 実際は予備実験の段階で濃度を振っているが、今回の濃度は反応が評価しやすい濃度を至適濃度としている。しかし、一般的に囊胞内溶液や細胞の分泌している濃度からすればかなり多い濃度と考えられる。

質問 1 1) Figure5B において、浸潤の方向性を決定しているメカニズムは何か？

(回答) HFF-2 細胞に IL-1 α を作用させると IL-6 や IL-8 を分泌することとはわかっている。今回の内容には含まれないが、予備的検討の結果から、少なくともこれらのサイトカインは関係する可能性があると考えている。

質問 1 2) 既報の研究では、AM-3 細胞は破骨細胞分化を起こしているが、IL-1 α が骨破壊に関与しているのか？

(回答) 関節リウマチでは、IL-1 α を含む多数の炎症性サイトカインが病態に関与しており、骨破壊を生じる可能性もあるため、エナメル上皮腫の IL-1 α は単独ではないにして、骨破壊に影響を与えている可能性があると考えられる。

質問 1 3) Y-27632 は ROCK (Rho キナーゼ) 阻害薬であるが、培地中にこの試薬を入れている理由は？

(回答) AM-3 細胞に GFP を導入した際に、細胞死の予防を目的として培地に加えられた。その後も細胞の表現型の変化を防ぐために入れ続けている。実験内ではこの試薬が結果を左右しない様に条件設定をしている。

質問 1 4) Boyden-chamber 法では試薬はどこに添加しているのか？ 下方チャンバー側に加えても作用するのか？

(回答) 試薬は全て下側チャンバー内に加えている。invasion assay でも、物質はコラーゲン膜を通過し細胞に作用していると考えられる。これは、Figure5B において、細胞を含んだコラーゲン層の外側の培養液に IL-1Ra(22-25kDa) や anti-IL-1 α (IgG) を加えても細胞浸潤に変化が認められることからコラーゲン内に浸透していると考えられる。

質問 1 5) Migration assay の single cell はどのような意味があるのか？

(回答) Figure5B は集団的細胞浸潤を評価している。それと比較し Boyden-chamber 法では、AM-3 細胞や Raw 細胞を懸濁し、一つ一つの細胞での遊走能や浸潤能を評価しているため、査読者から明確に分けて記載することを勧められた。

質問 1 6) 本文の Result3.2 の tumor microenvironment はこの結果からは言えないのではないか。

(回答) 細胞株を使用した結果なので、もう少し speculative な表現の方が適切だったかもしれない。

質問 1 7) AM-3 細胞による破骨細胞分化と IL-1 α の関係はあるのか。

(回答) 既報の研究では AM-3 細胞と Raw 細胞との共培養により破骨細胞分化が促進されているが、今回の研究ではこの破骨細胞分化に関連している因子の評価は行っていない。

質問 1 8) IL-1 α は pIL-1 α や、カルパインによりスプライシング後の mIL-1 α が、アラミンとして作用していることが知られているが AM-3 細胞はどの様に分泌しているか。

(回答) IL-1 β は細胞死関連の経路以外にも SNREB 複合体が関与する分泌が報告されている。IL-1 α は一部の角化上皮細胞で構成的に産生されていることが知られているが、AM-3 細胞からの分泌様式については調べていない。

質問 1 9) 今回の研究では MMP-2 は評価していないのか？

(回答) 実際は MMP-2 の遺伝子発現及びタンパク質分泌を確認できているが、IL-1 α 刺激への依存性がないので、本論文では論じていない。

質問 2 1) この研究成果を治療に活かす in vivo のモデルはあるのか？

(回答) 当科では、AM-1 や AM-3 細胞をヌードマウスの頭部に xenograft し、腫瘍の生着を確認している動物モデルがある。移植した細胞は、元の組織型である葉状型や濾胞型に類似の形態を示すので、これを用いて今後の展開も可能であるとえられる。

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。