

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 728 号	学位申請者	大川政士
審査委員	主査	大塚 隆生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	櫻田 英樹	副査 山下 勝
	副査	西尾 善彦	副査 西 順一郎

主査および副査の5名は、令和 6年 2月 14日、学位申請者 大川 政士 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) ウエスタンブロッティングで VEGF-A121 でバンドが2つあるのは何故か？

(回答) 糖鎖による修飾と考えている。

質問2) 心臓血管外科領域の疾患で VEGF-A と関連があるものがあるか？

(回答) 大動脈弁狭窄症と消化管出血が併存している Heyde 症候群がある。消化管の異常血管新生が出血の原因として考えられている。ペバシズマブ投与が異常血管新生に対して効果があると近年報告されており、Heyde 症候群と VEGF-A との関連も考えている。

質問3) 各 VEGF-A アイソフォームによる生理活性の違いはあるか？

(回答) VEGF-A165 は VEGFR2 の共受容体の NRP-1 とも親和性があるため生理活性が強いとされる。

質問4) 血小板以外の血球に関して解析を行ったか？

(回答) 白血球や赤血球の解析を数例に行い、VEGF-A121 が多い傾向を認めた。全血中の VEGF-A 濃度と比較すると多くの VEGF-A を含有しておらず、以降の解析は行っていない。

質問5) 血漿中の VEGF-A アイソフォーム濃度は pg/mL 濃度であるが、培養細胞に作用するために必要な VEGF-A 濃度はどの程度か？

(回答) 血管内皮細胞の培地に ng/mL 濃度の VEGF-A を添加するため、ng/mL 濃度が必要と考えられる。

質問6) 抗体の標識を変えることにより、1回の測定で VEGF-A121 と VEGF-A165 の両方を測定できるか？

(回答) 技術的には可能と考える。

質問7) 臨床では末梢静脈から抗 VEGF-A 抗体を投与するが、標的であるそれらの VEGF-A の由来はどこか？

(回答) 腫瘍などでは腫瘍由来との仮説もあるが、腫瘍静脈血と末梢静脈血中で VEGF-A 濃度に差がないとの報告がある。また、あらゆる細胞が VEGF-A を産生するため、腫瘍由来だけではないと考えている。

質問8) バイオマーカー候補としている血小板由来の可能性もあるか？

(回答) 血小板由来であれば、血小板は無核であり VEGF-A を産生できないため、骨髄中の巨核球に対して腫瘍などが VEGF-A 産生を制御している可能性がある。今後の研究テーマとしている。

質問9) 第2著者であるが、学位論文のどこにどの程度貢献したか？

(回答) 研究のアイデア化を行った。モノクローナル抗体、および ELISA 系の特異性についての評価を行った。健康人血液サンプルの収集、解析を行った。Figure の作成を行った。Method の一部、Discussion の一部の草案を執筆した。論文のレビュー及び校正を行い、第1著者と同等の貢献をした。

質問10) ELISA 測定系であるが、測定過程での VEGF-A の損失などはないか？

(回答) スパイク&リカバリーテストなどで検証し、問題となる程度の損失はないことを確認している。

質問 1 1) 疾患を有する患者で測定を行ったことはあるか?

(回答) 進行・再発大腸癌に対してペバシズマブ投与中の患者において経時的な測定を行った。投与後に血漿中の VEGF-A121 が著増していた。

質問 1 2) ペバシズマブ投与後に VEGF-A121 が増加する理由はなにか?

(回答) VEGF-A121 は拡散性を有するために、間質中の VEGF-A121 が循環血液中に移動するためと考えている。

質問 1 3) VEGF-A121 が血管内皮に結合できないために、血漿中に多く存在するとの考察であるが、他にサポートデータなどはあるか? 申請者らの考察なのか?

(回答) 今回の研究で観察された事象からの考察である。

質問 1 4) 末梢血の任意のタイミングで VEGF-A を測定することが疾患のバイオマーカーになり得るか?

(回答) ペバシズマブ投与前後では VEGF-A121 と VEGF-A165 で異なる変化が観察された。この変化が疾患のバイオマーカーになる可能性がある。

質問 1 5) これまでの報告では VEGF-A165 が生体内に多いとのことだが、血漿中で VEGF-A121 が多い理由は何か考えられるか?

(回答) これまでの報告の多くは、組織のタンパク解析、核酸の解析が主である。また、組織の多くはホルマリン固定などで脱水処理されているため VEGF-A121 が少なく測定されていた可能性もあると考えている。

質問 1 6) 既存の測定系と新規に開発した ELISA 系で、VEGF-A165 の測定値が異なるのはなぜか?

(回答) ELISA 系で抗体が異なるために抗原に対する親和性が異なるからと考えている。

質問 1 7) 既存の ELISA 系の抗体はポリクローナル抗体か?

(回答) ポリクローナル抗体である。

質問 1 8) ペバシズマブのエピトープ部位はどこか?

(回答) ペバシズマブは全てのアイソフォームに作用するために、全てのアイソフォームに保存されているエクソン 1-5 がコードする部位である。

質問 1 9) 抗体の作成にどのくらい期間を要したか?

(回答) 3 年要した。

質問 2 0) VEGF-A121 の分子量はどのくらいか?

(回答) 二量体で約 28 kDa である。

質問 2 1) ペバシズマブは直接的に腫瘍細胞に作用しているのか?

(回答) VEGFR は血管内皮にのみ発現している。血管内皮細胞に作用することにより間接的に作用している。

質問 2 2) VEGF-A121 と VEGF-A165 で腫瘍血管に対する作用は異なるのか?

(回答) VEGF-A121 は平滑筋細胞に裏打ちされていない疎な血管を新生するとされ、腫瘍血管新生においては VEGF-A121 が主に関与していると考えている。

質問 2 3) ペバシズマブ投与後の組織などの測定は行っていないのか?

(回答) ペバシズマブは進行・再発大腸癌に適応があり、ペバシズマブ投与中や投与直後に手術になる症例が少ないために測定は行っていない。

質問 2 4) VEGF-A121 と VEGF-A165 で機能的な差はあるか?

(回答) 機能的な差についてはわかっていない。

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。