

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 272 号	学位申請者	神野 真幸
審査委員	主査	小澤 政之	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	武田 泰生	副査 古川 龍彦
	副査	原口 みさ子	副査 河原 康一
<p>主査および副査の5名は、平成26年1月30日、学位申請者 神野 真幸 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。</p> <p>質問1) Table 2で免疫染色を行って Wnt-5a と WHO のグレードの相関を見ているが、WHO のグレードとは何を評価したものなのか？ (回答) グレードの根拠は病理所見で、核分裂像や壊死組織の多さに重きを置いて評価しており、浸潤能が高いことだけを基準としているわけではない。そのため、giant cell glioblastoma のような浸潤能の低い症例もグレードIVに分類されている。</p> <p>質問2) Wnt-5a の conditioned medium を実験で使用しているが、これは人間とマウスどちらの Wnt-5a 由来のものか。 (回答) マウス由来 Wnt-5a を含む conditioned medium を使用した。</p> <p>質問3) マウス由来の蛋白質を人間の細胞に加えたときに、まったく同様に作用することが確立されているか。 (回答) 諸家の報告から推察すると今回使用した Wnt-5a と Wnt-3a については作用に動物種の差は無いと考えられる。</p> <p>質問4) Figure 3において Wnt-5a をノックダウンした後に、mRNA が低下することは確認しているが、蛋白質レベルでも発現の低下を確認しているか。 (回答) 本実験において蛋白質レベルでの発現低下は確認をしていない。今後、確認する必要があると考える。</p> <p>質問5) Figure 11において MMP-2 の阻害剤により、Wnt-5a 蛋白質刺激で上昇した浸潤能がほぼ消失しているが、MMP-2 阻害剤をグリオーマの治療薬として使用できると考えているのか。 (回答) MMP-2 阻害剤によるグリオーマの浸潤は抑制でき、予後の改善にはつながると考えるが、実際の MMP-2 阻害剤治験では強い関節痛等が副作用として問題になったそうである。</p> <p>質問6) グリオーマにおいて β-catenin は細胞質や核へ移行していないため、Wnt-5a の細胞増殖への関与は可能性が低いと考えられるが、グリオーマにおいて細胞増殖に寄与するものはどのような分子が考えられるのか。 (回答) EGFR 増幅、p53 変異、PTEN 変異が報告されている。</p> <p>質問7) 今回用いた培養系の細胞では EGFR 増幅、p53 変異、PTEN 変異はあるのか。 (回答) 必ずこの3つの変異が入っているわけではないが、例えば U251 では P53 変異や EGFR 増強がある。U87 は P53 は野生型とされている。PTEN についてははっきりしない。</p> <p>質問8) Wnt-5a の発現制御の機構は明らかとなっているのか。 (回答) Wnt-5a 発現の上流について報告は少ないが、発生初期に Wnt ファミリー間で発現誘導のポジティブフィードバックを行うことは報告されている。</p> <p>質問9) 細胞種によって Wnt の発現の組み合わせはあるのか。 (回答) Wnt は 19 種類あり、上皮でも間葉でも発現しているため、多様な組み合わせが存在していると考えられる。</p> <p>質問10) Figure 4 と 5 の実験において同じコントロールの細胞で同じ 12 時間後であるにもかかわらず、欠損部の修復具合に差が出ているのは「ばらつき」が多いからか。 (回答) そうではない。Wnt-5a リガンドを可溶化するために使用した界面活性剤が細胞にとって毒性が強いために、蛋白質刺激によるコントロール実験群では RNAi ノックダウン群より運動性が落ちたと考えている。。</p> <p>質問11) Wnt-5a 蛋白質に界面活性剤を加える理由はなぜか。 (回答) この蛋白質は水溶性が低く吸着されやすいので、カラム精製の過程で界面活性剤の添加が必要だった。</p> <p>質問12) Migration や invasion assay において、Wnt-5a 蛋白質をどこに加えるのか。また、細胞の染色はどの部分で行っているのか。 (回答) Wnt-5a 蛋白質はトランスウェル上部のインサート内へ加える。染色ではインサート内面の細胞を綿棒で拭き取った後で、メンブレンフィルターの底面側の細胞のみを染めて観察していることになる。</p>			

最終試験の結果の要旨

- 質問 1 3) Figure 11 において MMP-2 阻害剤を加えることで、上昇した浸潤能がほぼ抑えられているが、MMP-2 を阻害することで Rac や JNK を介するような細胞運動に働く機構も抑えているのか。
 (回答) 確かにその可能性も完全には否定できないが、おそらく Invasion assay では MMP の基質であるマトリゲルでインサートの下部をコートしているため、MMP-2 阻害剤により運動能まで低下したわけではなく、ゲルを分解する事ができなかったことにより、結果として細孔の通過を果たせなかったのだと考えている。
- 質問 1 4) Wound healing assay や migration assay でも MMP-2 阻害剤を加えて、細胞の運動能の影響を検討したか。
 (回答) 今回の実験では検討していないが、MMP そのものが細胞の転写等に影響を及ぼすことも報告されているため、今後は MMP-2 の細胞運動能への影響も検討する必要があると考える。
- 質問 1 5) Wnt-5a の結合が報告されている受容体はどの Frizzled ファミリーか。また、実際にその Frizzled は発現が上昇しているのか。
 (回答) Wnt-5a は Frizzled-2、-5 と結合する事が報告されており、グリオーマにおいても Figure 1 で示した通り Frizzled-2 の発現が上昇している。
- 質問 1 6) Wnt とその受容体である Frizzled はどちらも発現の上昇が必要となってくるのか。
 (回答) 結合する組み合わせのリガンドと受容体どちらかの発現上昇が見られれば、シグナルは増強される可能性はある。
- 質問 1 7) Wnt-5a をノックダウンした際の MMP-2 の mRNA 発現低下に比べ、酵素活性の低下が著しいが、Wnt-5a は MMP-2 の mRNA 発現に関わるだけでなく、蛋白質翻訳や活性制御にも関わる分子の発現にも影響しているのか。
 (回答) 文献上、Wnt-5a が MMP-2 の活性制御蛋白質の産生に関わるという報告はない。今回のアッセイでは MMP-2 はゲル内でモノマーとなり、活性化状態になっていると考えられるので、生理的な活性の変化というよりは、蛋白質量の増減を評価していると考えられる。
- 質問 1 8) Wnt-5a が細胞運動を促進させる仕組みは判明しているか。
 (回答) 胃癌由来細胞株では低分子量 G 蛋白質 Rac の活性化を介した細胞運動の亢進が報告されている。
- 質問 1 9) Wnt-5a による MMP-2 と細胞運動を制御する機構が異なるのであれば、MMP-2 の阻害剤よりも、より上流である Wnt-5a 受容体への結合を阻害する等の薬のほうが migration や invasion を抑制させる可能性があると考えられるのか。
 (回答) Wnt-5a の受容体への結合は細胞運動と MMP-2 発現のさらに上流であると考えられるため、グリオーマの浸潤を抑制する可能性は十分にあると考えられる。
- 質問 2 0) Wnt-5a の生理的な機能はわかっているのか。
 (回答) 神経の発生で、軸索進展の制御に関与することが報告されている。ノックアウトマウスは胎生致死である。
- 質問 2 1) Figure 3 における β -catenin のウエスタンブロットは細胞全抽出液を使用しているのか。
 (回答) 細胞を超音波破碎し、遠心して膜画分を除いて、上清の可溶性画分のみを使用している。
- 質問 2 2) Wnt-5a の蛋白質は L 細胞に発現させたものをカラムで精製しているとのことだが、コントロールには何をを使用しているのか。
 (回答) バッファーをコントロールに使用している。
- 質問 2 3) グリオーマの治療としてのイメージはあるのか。
 (回答) グリオーマにおける Wnt-5a 発現や受容体への結合を阻害することは、細胞運動や MMP-2 発現の抑制を引き起こし、殺細胞的ではなく浸潤能を低下させ、腫瘍細胞を局所にとどめる効果を期待できると考えている。
- 質問 2 4) MMP-2 の阻害剤は選択的なものであるのか。
 (回答) データシート上選択的なものを吟味して購入し、文献を参考に使用濃度を決めた。ただし、実際に他の MMP に対する作用の測定、検討はしていない。
- 質問 2 5) 酵素電気泳動法の方法に関して 4°C、100,000×g で 1 時間遠心して、蛋白質の沈降を行っているとしているが、これは vesicle を沈降させる条件ではないか。
 (回答) MMP は vesicle 上に付随して分泌されることが報告されているため、Vesicle を沈降させる条件を採用した。
- 質問 2 6) PKC 阻害剤などで MMP 発現の上流を阻害して、グリオーマの運動や浸潤が抑えられれば、中間の機構についてもある程度わかるのではないか。
 (回答) 今回は Wnt-5a で細胞運動が上昇する事、MMP-2 の制御が Wnt-5a によって一部なされているのではないかとということまでしか検討していない。ご指摘の通り、PKC などのシグナルの関与について今後検討することは有意義だと考えられる。

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(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。