



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Wnt5aの発現と肝細胞癌の生物学的悪性度および切除例における予後の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	脇坂, 和貴
Description	配架番号 : 2569
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14103号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78117
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_Wakizaka_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 脇坂 和貴

	主査	教授	佐藤	典宏
審査担当者	副査	教授	平野	聡
	副査	教授	渡利	英道
	副査	教授	田中	伸哉

学 位 論 文 題 名

Wnt5a の発現と肝細胞癌の生物学的悪性度および切除例における予後の検討

(Studies on Wnt5a expression and biological malignancy of hepatocellular carcinoma)

申請者は肝細胞癌における Wnt5a の発現の意義について臨床検体を用いた検討を行い、Wnt5a の発現と分化度、脈管侵襲、予後に関連があることを明らかにした。その結果を *in vitro* の検討により、Wnt5a が細胞の悪性度に与える影響やその機序として EMT の関与について検討し、Wnt5a の発現のバイオマーカーとしての有用性や治療への応用について検討を行った。

審査は 2 回に分けて行われ、1 回目は主査の佐藤教授と副査の田中教授、2 回目は副査の平野教授と渡利教授により行われた。

審査にあたり、まず副査の田中教授から Canonical pathway と分化度の関連があるかについて質問があり、申請者は Canonical pathway と発癌の関連は報告があるが、分化度に関する報告はなく、本研究においても臨床検体の β カテニンの免疫染色は行っておらず、canonical pathway についての検討も必要であると回答した。また、Wnt5a が細胞の浸潤能を抑制するという結果であったが、non-canonical pathway の活性化は細胞の運動能を亢進させるとされており、この相違について質問があり、申請者は non-canonical pathway 自体がその経路や役割について解明されておらず、それに関わる RhoA などの分子の変化を検討する必要があると回答した。また、Wnt5a が細胞の浸潤を抑制するという結果であったが、臨床検体では Wnt5a の発現と被膜浸潤や静脈侵襲との関連について質問があり、被膜浸潤と静脈侵襲については検討を行っていないが、静脈侵襲を含めた脈管侵襲については Wnt5a との相関を認めたと回答した。また、細胞株の作成の方法に関してモノクローナルかポリクローナルか、ノックダウン株は 1 種類のみを検討したのか質問があり、細胞株はモノクローナルなものであり、ノックダウン株もいくつか作成し、最もノックダウン効率が良かったものを採用して検討を行ったと回答した。同一の細胞株でのノックダウン株、強制発現株は作成できなかったのかという質問があり、実験の計画の段階で、Wnt5a 高発現である Huh7 についてはノックダウンを行い、Wnt5a 低発現である HLF については強制発現を行って検討する方針としたと回答した。次に主査の佐藤教授から臨床検体を用いた検討において、全生存に有意差を認めたが、無再発生存に差を認めなかったという結果について、肝細胞癌においてこのようなパターンを示すマーカーや治療薬は存在するのかについて質問があり、申請者は文献検索をした範囲ではこういったケースは見られなかったと回答した。また、このよ

うなパターンを示したことについて考えられる理由は、他に再発を来す要因がある場合と Wnt5a の発現自体が予後に直接影響を与えている場合の二つの理由が考えられ、今回の検討では多中心性再発により前者の理由で無再発生存の差が打ち消されたのではないかと回答した。後者として考えられることは、Wnt5a 陰性の肝細胞癌では炎症性サイトカインが分泌され、カヘキシーが関連して予後に直接関与している可能性についても考えられると回答した。また、Wnt5a の発現と分化度に関してその両者の関係について質問があり、脱分化の結果 Wnt5a の発現が低下するのか、Wnt5a の発現の低下により脱分化が進むのかについては今回の検討では明らかにされておらず、両者に相関があることが示されたのみであると回答した。また、学位論文全体として Wnt5a と受容体、分化、増殖、浸潤、EMT の関与について一通りの検討が行われているが、より掘り下げた検討や焦点を絞った検討が行われていない点が指摘され、申請者は臨床検体を用いた検討から得られた結果から考えられることを *in vitro* において証明するという方法で研究をすすめたが、それぞれの実験結果で決め手となるようなデータが不足し、全体としては様々な視点から Wnt5a の悪性度への影響を検討する論文内容となったと回答した。副査の田中教授から Wnt5a の治療実験において他の細胞株における変化について質問があり、申請者は HLE、HepG2 においても検討を行ったところ、これらの細胞株では増殖能、浸潤能に変化を認めず、今回検討していない受容体の発現が関与している可能性も考えられると回答した。副査の渡利教授から免疫染色の検討について、細胞膜への発現について既存の報告があるか、また使用した抗体についての質問があり、申請者はこれまでの報告は細胞質の発現のみで、細胞膜への発現を示した検討は本研究が初めてであること、抗体は既存の報告で使用されたものと同様のものを使用していると回答した。また、Wnt5a の動態、細胞質内に存在する Wnt5a の活性に関する質問があり、Wnt5a は細胞外分泌タンパクであり、小胞体に蓄えられた Wnt5a が細胞外に分泌され、細胞膜の受容体に結合して non-canonical pathway を活性化させ、細胞質内の Wnt5a は活性を有しないと回答した。また、細胞質発現と細胞膜発現を組み合わせた予後の検討についての質問があり、4 群に分けた結果、共に陰性の群が最も予後不良であったが、その他の 3 群に差はなかったと回答した。次に ROR2 が免疫染色では細胞膜に染色されなかったことについて質問があり、使用した抗体は既存の報告にあるもので、その検討でも細胞膜への染色に関しての言及はなく、今回の検討では細胞質への染色性で検討を行ったと回答した。次に副査の平野教授から、ROR2 の免疫染色の方法について質問があり、申請者は条件検討を行ったがいずれの方法においても細胞膜の陽性像は得られなかったと回答した。また、EMT と MMP の関連性に関する質問があり、細胞の遊走が可能となる EMT と細胞外器質の分解する MMP が協調して癌細胞の浸潤が促進されると回答した。次に Wnt5a の分泌形式に関する質問があり、Wnt5a は細胞外分泌タンパクであり自己分泌もしくは傍分泌の形式で作用するが、血清中にも Wnt5a は検出可能であり、遠隔的に作用する可能性もあると回答した。

この論文は肝細胞癌における Wnt5a のバイオマーカーとしての有用性を示した点において高く評価され、さらに Wnt5a の腫瘍抑制作用に着目した新しい肝細胞癌の治療への発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。