

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 327 号	学位申請者	永田 政仁
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	谷本 昭英	副査 中川 昌之
	副査	岸田 昭世	副査 金藏 拓郎

主査および副査の5名は平成27年3月17日、学位申請者 永田 政仁 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) 今回の動物実験における骨肉腫の肺転移様式は血行性か。

(回答) 血行性である。

質問2) 今回の動物実験における肺転移の組織像の確認は行ったか。

(回答) 今回行ってない。

質問3) 臨床で三酸化ヒ素 (ATO) を投与する際の濃度はどれくらいか。

(回答) 急性前骨髄性白血病に対する寛解導入法では0.15mg/kgで最大投与回数は60回である。

質問4) 生体内でのヒ素の濃度分布についてはいかがか。

(回答) 今回のマウスに対するATO10mg/kgはヒトに換算すると小児のAPLに対する投与量の約2倍濃度になると報告されている。

質問5) ヒ素化合物の長期間投与による二次発癌の報告はあるか。

(回答) 亜ヒ酸ナトリウムがrepression typeのGLI3を抑制することで発癌するという報告がある。

質問6) ATOがHh関連遺伝子を抑制するメカニズムは。

(回答) GLIに直接結合し転写を阻害する報告とGLIの一次せん毛への移行を抑制する報告がされている。その後の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

質問7) GLI1/2/3は複合体を形成しているのか。

(回答) 複合体は形成しておらず、独立して存在している。

質問8) Fig.1の病理写真で、免染で染まっているのは核か、細胞質か。

(回答) どちらも染まっていると考えている。

質問9) GLIの核内移行率と予後の関係を示す報告はあるか。

(回答) そのような報告は渉猟できなかった。

質問10) 今回の実験系で、骨肉腫の転移を抑制したメカニズムや標的となった遺伝子はわかるか。

(回答) RPS3という遺伝子がマイクロアレイで同定されており、この遺伝子が移動能、浸潤能に関わっていることが分かっている。今回はGLI2を抑制することで、このRPS3が抑制された可能性がある。

質問11) RPS3はどんな蛋白か。

(回答) リボソームの構成蛋白であり、NF-κB経路にも関与している蛋白質である。近年、悪性腫瘍との関連性も報告されている。

質問12) 骨肉腫のgradeとGLI2の発現率との関連は。

(回答) 他家の報告で、骨肉腫におけるGLI2発現率と予後が相関するとされている。

質問13) ATOとvismodegib併用は肺以外の転移を抑制するか。

(回答) 今回は肺転移モデルしか実験しておらず、他の臓器については分からない。

質問14) GLIがプロテアソームでの分解を受ける際はユビキチン化されているのか。またその際に特定の部位で切断する酵素が知られているか。

(回答) 発表の説明に間違いがあり、Hedgehogリガンドが存在しない時、GLI1/2はプロテアソーム系で一部ではなく、完全な分解を受け、分解を受けないGLI3が転写を抑制する。そのため切離型GLIは存在しない。

質問15) ATOを治療で使用するとしたら全身投与か。

(回答) 全身投与である(小児のAPLでは経静脈投与)。

質問16) その際の副作用にはどのようなものがあるか。

(回答) 稀だが心筋の伝達障害(torsade de pointesタイプの心室性不整脈)をおこす可能性がある。

質問17) 今回のin vivo実験系では何らかの副作用がみられたか。

(回答) ATOでは特になかったが、ATOと高濃度のvismodegib(50mg/kg)併用では体重減少が認められた。

最終試験の結果の要旨

- 質問 18) MMP や collagenase などの分子の発現変化は検討したか。
 (回答) 今回は行っていない。当教室の先行研究では、骨肉腫において Notch pathway が活性化しており、その下流でマトリックスメタロプロテアーゼ 9 が亢進しているという報告を行っている。他家の報告でも GLI とマトリックスメタロプロテアーゼ 1 の上昇、E-カドヘリン低下などとの関連が指摘されている。
- 質問 19) *In vivo* 系と control 群間とで薬剤投与開始から剖検までの期間が異なるのはなぜか。
 (回答) 記載が不十分だが、統一して行った。
- 質問 20) *In vivo* 実験で薬剤投与を細胞移植後 1 週間で開始しているが、なぜ 1 週間待機する必要があるのか。
 (回答) 移植した腫瘍が生着し、指で触知できるまで 1 週間かかるため、1 週間後から投与し始めた。
- 質問 21) Fig.2 における GLI2 ShRNA 群 6 匹が、3 匹と 3 匹で結果が二分している理由は。
 (回答) 6 匹のマウスの条件はそろえてあるが、個体差がある可能性がある。
- 質問 22) Fig.4b で ATO と vismodegib が単剤で効かなかった理由は。
 (回答) 単剤投与では、効果を発揮しない濃度であったと考えている。
- 質問 23) Fig.4b で示される併用効果は相乗的なものか、それとも相加的なものか。
 (回答) *In vivo* における相加、相乗効果の解析は行っていない。*In vitro* においては、相加、相乗効果を解析するソフトを用いた結果、相乗効果であることが分かっている。
- 質問 24) Vismodegib 以外の Hedgehog pathway をターゲットにした薬剤や治療法があるか。
 (回答) 現在、Hedgehog pathway を標的として臨床使用されている薬剤は vismodegib のみである。臨床トライアルでは SMO, GLI inhibitor が何種類も行われている。ほとんどが SMO inhibitor である。
- 質問 25) ヒ素が原因でおきる癌が多々あるが、ATO は抗癌作用、発癌作用の両面性を持つのか。
 (回答) ATO を高濃度で用いれば、DNA の断片化をひきおこすとされている。それにより発癌性が生じる可能性がある。また、本研究のように低濃度で使用する場合は抗癌作用を持つのかかもしれない。
- 質問 26) 間葉系幹細胞 (MSC) を不死化させる方法としてテロメラーゼ リバース トランスクリプターゼを使用しているが、そのメカニズムは。
 (回答) テロメラーゼによるテロメアの伸長を介する不死化が複数の細胞で報告されている。
- 質問 27) Fig.1 の GLI2 のバンドが 2 つにみえるが、プロテアソーム系で C 末側が分解されたことを反映しているのか。
 (回答) メーカーの参考写真では 1 本バンドで出現している。原因は分からない。
- 質問 28) GLI2 ΔN の恒常活性のメカニズムは。
 (回答) GLI2 の N 末側の repression domain を欠失させることで恒常活性化する。
- 質問 29) Fig.3b のルシフェラーゼアッセイでは GLI2 の活性をみるはずだが、なぜか GLI1 の活性をみている。その理由は。
 (回答) ルシフェラーゼアッセイは GLI の活性をみており、GLI1 / 2 / 3 は特定していない。
- 質問 30) Fig.3 で MSC に GLI2 ΔN を overexpression しているが、増殖能に変化が生じるか。
 (回答) 当教室の先行研究で、有意に増殖能が亢進することが分かっている。
- 質問 31) *In vivo* 実験系で ATO を 10mg/kg で投与しているが、原発巣への効果はどうだったか。
 (回答) 当教室の先行研究で、ATO 10mg/kg で骨肉腫の増殖能を有意に抑制することが分かっている。
- 質問 32) Fig.4 の vismodegib 投与群では、肺転移面積が著しく高いものがあるが、これは何を意味するのか。
 (回答) 個体差、微小環境の違いがあるかもしれないが、明確な答えは分からない。
- 質問 33) Fig.1c のスクラッチの写真で、コントロールと GLI2 ΔN 強制発現群では差がないように見えるが、どうか。
 (回答) 浮遊している細胞が写っていると考えているが、Boyden chamber を用いた検証もするべきだった。
- 質問 34) 今回の研究で GLI1 については、どう考えているか。
 (回答) GLI1 については、免染で発現が見られなかったこと、real-time PCR で GLI1 をノックダウンしても Hedgehog target gene の抑制が見られなかったこと、GLI1 をノックダウンしても migration に影響しなかったことから骨肉腫の転移には関与していないと考えている。
- 質問 35) 骨肉腫においては GLI2 が特異的に発現上昇しているのか。
 (回答) 骨肉腫では GLI2 が発現上昇しているとする報告が多く、当研究室の研究結果でも同様に GLI2 が上昇していた。
- 質問 36) SUFU は GLI のユビキチンリガーゼなのか。
 (回答) ユビキチンリガーゼではない。

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。