

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 478 号	学位申請者	篠原 直弘
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 岸田 昭世
	副査	宮田 篤郎	副査 松原 修一郎

主査および副査の5名は、平成30年7月17日、学位申請者 篠原 直弘 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) 免疫染色の PEG10 抗体の positive control は何か？

(回答) この抗体の特異性に関しては、pEF-Peg10-RF1-V5 発現ベクターを COS-7 細胞に強制発現し、western blot でそのバンドが1本のみ認識される事、軟骨肉腫細胞株の内在性 PEG10 の当該分子量蛋白質のバンドを認識し、それは PEG10 の siRNA ノックダウンで消失する事も確認した。また、この抗体は FFPE 切片の免疫染色と、western blot の両者に適した抗体として実証済みの商品であり、正常マウス IgG を negative control に置いている事からも、その特異性はさらに担保されていると考えた。

質問2) アルシアンブルーは何を染色しているのか、臨床でアルシアンブルー染色を行なうことはあるのか？

(回答) 酸性粘液多糖類のカルボキシル基・硫酸基とイオン結合する。カルボキシル基は、pH=1.0 以下では色素と結合せず、硫酸基のみが結合する。軟骨組織は、硫酸基に富む基質を特徴とするので、本研究では pH=1.0 で染色している。臨床では印環細胞癌、中皮種、軟骨肉腫、滑膜肉腫などで特徴的に染色される。

質問3) ルシフェラーゼ・アッセイを行なっているが、実際に TGF- β や BMP シグナルの直接ターゲット遺伝子の発現上昇は確認しているのか？また、それらのプロモーター・レポーター・ルシフェラーゼ・アッセイはしなかったのか？

(回答) BMP の直接ターゲット遺伝子である ID1、TGF- β の直接ターゲット遺伝子である PAI1 がそれぞれの刺激で上昇するのを qRT-PCR で確認した。また ID1/PAI1 発現と BRE luc/9x CAGA luc 活性は、TGF- β ファミリー研究者の間ではほぼ同義であり、実際本研究でもこれらが同じ方向に矛盾なく運動していたので、あえて ID1/PAI1 のプロモーター・レポーターを解析する必要性はないと考えた。

質問4) Enchondroma と臨床診断されたものが chondrosarcoma となることはあるのか、またどの程度の頻度か？

(回答) *Mulat Atlay et al. Journal of Orthopaedic Science(2007)* では、単発の enchondroma 143 例中6例が二次性に軟骨肉腫に悪性化したと報告されている。

質問5) マイクロアレイで Probe signal 400 以上にはどのような意味があるのか？

(回答) Probe signal 50 以上が有意な発現とされるので軟骨肉腫で確実に多く発現する遺伝子を選択する為、閾値を上げた。

質問6) マイクロアレイで変化した群に傾向はあるのか？何故、その中で PEG10 を選んだのか？

(回答) PEG10 がマウス胎仔の軟骨原基に発現が報告されていたこと、各種がんとの関連が多数報告されていた事、なにより TGF- β /BMP ファミリーの I 型受容体への結合と阻害効果が報告されていた事から PEG10 を選択した。

質問7) BMP と TGF- β のどちらが PEG10 発現に主に関連しているのか？

(回答) BMP-6 と TGF- β 1 の同時刺激の場合、PEG10 発現が減少する為、TGF- β シグナルがより関連深いと考える。

最終試験の結果の要旨

質問 8) PEG10 は治療効果判定のマーカーには使えるのか?

(回答) 他の上皮がんでは PEG10 は悪性度に正に相関するとの報告もあり、逆の情報は我々の結果だけであり、他に肉腫における PEG10 発現の報告がないために情報が少なく、現状では治療の目安としては使用できない。

質問 9) マイクロアレイ解析で PEG10 以外に注目するものはあるか?

(回答) 未だ他の遺伝子の検証はおこなっていないが、TGF- β 刺激で発現が下がる遺伝子として報告がないものばかりで、大変興味深い。

質問 10) PEG10 の構造から類推される機能は何か (蛋白質としてどの様に機能しているか)?

(回答) PEG10 遺伝子は 2 つの重複したリーディング・フレーム RF1 と RF1/2 を持つ。レトロウイルス様の pseudoknot elements を有することで -1 フレームシフト を起こすと複合蛋白質 RF1/2 が翻訳される。RF1 は CCHC-type zinc finger motif を有するため、DNA 結合能を有する可能性が考えられる。また Coiled coil を有しており、オリゴマー形成すると考えられる。

質問 11) PEG10 はレセプターに結合するということが、その細胞内局在はどこか?

(回答) ほとんどが細胞質内、少量が核内に局在と報告されている。本研究の予備実験で、NE-PER 溶解液で軟骨肉腫細胞株を lysis して細胞質と核に分画して western blot を行ったところ同様であった。

質問 12) PEG10 発現が TGF- β 経路に影響を与えているが、そのことは SOX9 や Collagen type II 発現に何か影響しているか? また PEG10 そのものが SOX9 や Collagen type II の発現に何か影響しているか?

(回答) PEG10 発現と、SOX9 や COL2A1 発現との関係は明らかではない。ただし、軟骨細胞株 C28/I2 において PEG10 をノックダウンした際には、特に SOX9 や COL2A1 発現の変化は認めなかった。

質問 13) SW1353、Hs819.T は臨床的にはどの程度の grade 由来か?

(回答) SW1353 は 72 歳女性 白色人種 chondrosarcoma Grade II 由来である。Hs819.T は 60 歳男性 白色人種 chondrosarcoma 由来である。Grade は情報提供されていない。

質問 14) 軟骨細胞株では PEG10 発現が低い、軟骨肉腫では発現が上昇しているのはなぜか?

(回答) マウス胎仔の軟骨原基で発現している一方で、上皮がん各種において高発現が報告されている事から、正常軟骨から軟骨肉腫への腫瘍化過程における変化と捉えている。

質問 15) 軟骨細胞に PEG10 を強制発現したら軟骨肉腫様になるのか?

(回答) 最近論文化した(Yahiro Y, et al., *J Bone Miner Metab*, in press)の中で、PEG10 の強制発現は SW1353 細胞の増殖を促進し、浸潤能は抑制した。したがって、軟骨肉腫様になったという解釈も出来る。

質問 16) 今研究では軟骨肉腫、軟骨肉腫からの TGF- β や BMP 発現を前提としているが、実際そうなのか?

(回答) TGF- β や BMP が発現しているという報告もあれば、していないという報告もあり、一定のコンセンサスはない。しかし少なくとも我々は、軟骨肉腫臨床サンプルにおいて、TGF- β 1, TGF- β 2, BMP-6 の mRNA 発現を観察出来ているし、免疫染色で下流の SMAD1/5 と SMAD3 のリン酸化も捉えているので、発現していると考えられる。

質問 17) レセプターに結合するのに何故核内に存在するのか?

(回答) 上述の様に細胞質内に PEG10 は多く局在する。

質問 18) RF2 のプライマーを作れば mRNA レベルで RF2 発現が確認できるのでは?

(回答) RF1 コード領域末端のストップコドンが -1 フレームシフトする場合にさらに下流の RF2 が翻訳される。すなわち RF2 は蛋白 variant であり、RF1 も RF2 も同一の mRNA からの翻訳なので、RF2 特異的な mRNA variant などもないので、RF2 部分にプライマーを作成しても RF1 と RF2 の発現の鑑別はできない。

質問 19) PEG10 抗体の免疫エピトープはどこに設計されているか?

(回答) PEG10 の RF1 内である。

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。