

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 152 号	学位申請者	山崎 洋一
審査委員	主査	谷本 昭英	学位
	副査	原 博満	副査
	副査	橋口 照人	副査
			博士 (医学)
			井戸 章雄
			上野 真一

主査および副査の5名は、令和1年9月19日、学位申請者 山崎 洋一 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) Gremlin1 と VEGFR-2 の関わりはどのようにになっているか。

(回答) Gremlin1 は VEGFR-2 のリガンドとして、agonist としての作用を持つと考えられている。

質問2) Gremlin1 が核と細胞質で染色されたと報告しているが、核タンパクとして考えていいのか。

(回答) BMP7 の antagonist や VEGFR-2 の agonist として、細胞質や間質での発現の報告が多く、核タンパクとしては報告されていない。

質問3) Gremlin1 が核に陽性であった報告例はあるか。

(回答) これまでの Gremlin1 に関する報告では、核での発現を検討した報告例は認めなかった。

質問4) 胃癌細胞株における Gremlin1 の発現をウエスタンブロット法で検討しているが、Gremlin1 の発現と組織型や転移能に差がないのは何故か。

(回答) 今回の検討で使用した胃癌細胞株は、原発巣由来の印鑑細胞癌、肝転移巣由来の低分化腺癌と中分化腺癌、リンパ節転移巣由来の高分化腺癌であった。胃癌細胞株の組織型や細胞の由来(原発巣・転移巣)に関係せず、用いた胃癌細胞株のすべてで Gremlin1 の発現を認めた。

質問5) Gremlin1 がメチル化により不活化し、腫瘍の悪性度が増加したという報告はあるか。

(回答) 腎細胞癌ではメチル化群で腫瘍径が増大し、病期が進行しており、予後不良であったと報告されている。

質問6) Gremlin1 と同様に、癌種により異なる発現や作用を有すると報告されるタンパクはあるか。

(回答) 胃癌では BMP7 陽性例が予後不良因子とされているが、乳がんでは逆に予後良好因子と報告されている。

質問7) Gremlin1 は分泌タンパクか、分泌形式はどうか。

(回答) 分泌タンパクであり、自己分泌と傍分泌の両形式をとると考えられる。

質問8) Gremlin1 は全身の正常組織での発現が報告されているが、BMP7 の antagonist として細胞の成熟過程で発現が増すと考えていいか。

(回答) Gremlin1 のノックアウトマウスは胚性致死となるとされ、胚生期から発現・作用していると考えられる。

質問9) Gremlin1 は胃の正常組織でも発現していると報告されるが、今回の評価は癌部のみにおける比較か、もしくは正常組織での発現と癌部での発現を比較したものか。

(回答) 今回の検討では癌部のみで評価を行った。

質問10) 免疫組織化学染色での Gremlin1 の発現は、PCR やウエスタンブロット法などの他の手法で評価したものと同様の結果であるか。

(回答) 今回の検討では臨床検体は免疫組織化学染色のみで発現を評価した。癌種においては、免疫組織化学染色と mRNA を用いた Gremlin1 の発現比較では必ずしも一致しなかったと報告されている。

質問11) Gremlin1 の血清レベルでの発現と免疫組織化学染色での発現を比較した報告はあるか。

(回答) 子宮内膜症患者では健常者に比べ、血清における Gremlin1 の発現が上昇していたと報告されているが、血清と免疫組織化学染色での発現を比較した報告はみられなかった。

質問12) BMP7 の antagonist とされる Gremlin1 と BMP7 の発現は反比例しているのか。

(回答) 今回の検討では Gremlin1 高発現群に BMP7 陰性例が多く、Gremlin1 低発現群に BMP7 陽性例が多い傾向にあり、発現は反比例して認められた。

質問13) 胃癌の発癌に関して、正常粘膜での Gremlin1 の発現と、ピロリ菌が感染した胃粘膜での Gremlin1 の発現やピロリ菌除菌後の発現の変化を比較した報告はあるか。

(回答) 今回は検討していない。また過去の報告例でも見当たらなかった。胃癌の発癌に関わる興味深い内容であり今後の検討課題としたい。

質問 1 4) Gremlin1 は発癌の原因として、あるいは結果として発現しているのか。

(回答) 大腸癌細胞株を用いた検討では、Gremlin1 が E-cadherin の減弱と N-cadherin の増強に関わり EMT を誘導したと報告されており、発癌の原因として発現していると考ええる。

質問 1 5) BMP7 や Gremlin1 に着目した理由はなにか。

(回答) 当教室では以前より TGF- β や Smad の発現と腫瘍形成に関する報告を行っており、TGF- β スーパーファミリーの一つである BMP7 に着目し、BMP7 陽性が胃癌や食道癌における予後不良因子と報告した。Gremlin1 が BMP7 の antagonist としての作用を有し、胃癌を除く複数の組織で腫瘍形成に関連すると報告されており、今回胃癌での Gremlin1 の発現に着目した。

質問 1 6) 胃癌における Gremlin1 の発現の検討は Gremlin1 の機能から考えて合理的か。

(回答) Gremlin1 の低発現群において、腫瘍径が大きい、深達度が深い、リンパ節転移陽性、リンパ管・脈管侵襲陽性症例が有意に多かった。また臨床病理学的因子との比較において Gremlin1 の発現は BMP7 の発現と相反していた。Gremlin1 が BMP7 の antagonist として、BMP 経路を介して腫瘍形成を抑制している可能性が示唆され、合理的であると考ええる。

質問 1 7) Gremlin1 と BMP7 の発現は同一のサンプルで比較したものか。

(回答) 同一のサンプルを用いた二重染色による比較ではなく、それぞれ個別に評価を行った。

質問 1 8) 胃癌の腫瘍形成において、Gremlin1 が BMP7 の antagonist として作用し腫瘍形成を抑制しているとの仮説だが、仮説を証明するためにどうすればよいか。

(回答) BMP 経路の下流シグナルである、Smad1,5,8 のリン酸化と Gremlin1 の発現を比較することで、BMP7 の antagonist としての作用を証明する一助となると考える。

質問 1 9) 胃癌細胞株でのウエスタンブロット法で MKN45, MKN74, KATOIII, NUGC4 では陽性の Band が 2 本みえるがどうしてか。

(回答) メンブレンの再利用による影響や、転写時にムラが生じていた可能性が考えられる。

質問 2 0) Gremlin1 の正常組織での発現量は、癌部と比べ違いがあるのか。癌化すると発現量が増加するのか。

(回答) 今回は検討していない。興味深い内容であり今後の検討課題としたい。

質問 2 1) 網羅的に予後マーカーを検索する研究はされているか。

(回答) 臨床検体から大量の遺伝子発現解析が可能な DNA マイクロアレイを用いた研究などが報告されている。

質問 2 2) Gremlin1 は正常粘膜でも発現しており、正常粘膜と癌部での発現を比較したほうが良いのではないか。

(回答) 今回の検討では癌部でのみ評価を行ったが、興味深い内容であり正常粘膜と癌部での比較は今後の検討課題としたい。

質問 2 3) 正常粘膜での Gremlin1 の発現を比較すると結果は異なると思うか。

(回答) 正常粘膜と癌部での Gremlin1 の発現に相関がないとの報告もあり、異なる結果となった可能性もある。

質問 2 4) Gremlin1 に関する報告では mutation が少なく、Gremlin1 のメチル化が発現調整に関与しているようだが、どのように考えているか。

(回答) 腎細胞癌においては Gremlin1 がメチル化された症例群が予後不良であったと報告されている。胃癌においても同様に Gremlin1 がメチル化し発現が抑制された症例群が、免疫組織化学染色での結果と同様に予後不良因子と相関すると考える。

質問 2 5) Gremlin1 は発癌より浸潤にかかわっているのではないか。

(回答) Gremlin1 の低発現群においてリンパ節転移陽性例やリンパ管侵襲・静脈侵襲陽性例が有意に多く、癌の浸潤に関与していると考ええる。

質問 2 6) 免疫組織化学染色では染色濃度で評価しているが、一部のみ染まっていた組織での評価はどう行ったのか。

(回答) 癌部で全体的に染色を認め、癌部での強拡大 10 視野の染色濃度の平均値を用いて評価を行った。

質問 2 7) 免疫組織化学染色は一般的に染色面積か染色細胞の数で評価を行うが、濃度を用いたのはなぜか。

(回答) Gremlin1 の評価法が一定しておらず、胃癌組織では癌部が全体的に染色されていたことから、今回の検討では染色濃度を用いて評価を行った。

質問 2 8) Gremlin1 と BMP7 の発現が相反した結果だが、転写レベルで発現を検討した報告はあるか。

(回答) 転写レベルで Gremlin1 と BMP7 の発現を比較した報告はみられなかった。

質問 2 9) Gremlin1 の名前の由来はなにか。

(回答) 明らかでないが、Gremlin という単語が“機械に悪戯をする妖精”という意味を有し、また不思議な妖怪を題材とした“Gremlin”という映画が存在し、これらと何かしら関係している可能性も考えられる。

質問 3 0) 発表スライドで BMP1 が表記されているが、BMP1 は欠番か？

ご指摘の通り BMP1 は存在しており、TGF- β のスーパーファミリーには属さずタンパク分解酵素としての働きを有するとされる。発表スライドでは TGF- β スーパーファミリーに属する BMPs のみ記載を行った。

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。