

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 556 号		学位申請者	徳本 寛人
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	古川 龍彦
	副査	中川 昌之	副査	宮田 篤郎

主査および副査の5名は、令和2年1月17日、学位申請者 徳本 寛人 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) SR48692 による NTSR の阻害のメカニズムは知られているか。

(回答)SR48692 は内因性のアゴニスト活性を持たず NTSR の ligand である NTS と競合して受容体に結合することで阻害する。低濃度では high-affinity binding site に結合し高濃度では low-affinity binding site に結合した NTS を解離させる効果をもつ。

質問2) 臨床検体の NTSR1 の免疫染色について、染色部位は細胞のどこであったか。発現に差があるように見えるが発現している細胞の腫瘍内分布に差がみられるか。

(回答)NTSR1 は細胞質に局在しており、過去の報告とも一致する。発現細胞分布の偏在は認められなかった。

質問3)NTSR1 の発現と UPS 細胞の幹細胞性に関連がみられるか。

(回答)本研究において、NTSR1 の発現と幹細胞性に関連について検討は行っていないが、渉猟しえた範囲で NTSR1 が細胞分化に何らかの影響を与えているという報告はない。

質問4)NTSR1 の下流での Erk のリン酸化の機構について説明せよ。

(回答)NTS は G タンパク質共役受容体である NTSR1 に結合することにより EGFR をトランス活性化し、続いて protein kinase C を活性化させることで ERK pathway を活性化させると報告されている。

質問5) 軟部悪性腫瘍の分類は多いと思うが、UPS の現在の位置づけはどうなっているか。

(回答)WHO classification では UPS はいわゆる線維組織系腫瘍に分類される。UPS は 1961 年に悪性線維性組織球腫と報告され、現在までその由来となる細胞も特定されておらず、分類についてはっきりと体系化されていないのが現状である。

質問6)UPS の診断面から遺伝子的な解析で、この遺伝子があれば大体診断がつくといったようなものはあるのか。

(回答)UPS の遺伝学的な知見は蓄積されてきているが、現段階で診断につながるような遺伝子変異は同定されていない。

質問7) discussion で乳癌や大腸がん等の上皮性由来の腫瘍に NTSR1 が発現しているとあったが、UPS は上皮性の混在もあるかもしれない。間葉系の細胞が多いと考えるが、上皮性/非上皮性の発現についてはどのように考えるか。

(回答)Glioma において NTS と NTSR1 の発現は病理学的悪性度と相関し、in vitro 及び in vivo で腫瘍増殖能を増加させると報告されている。Glioma に見られるように、非上皮性腫瘍においても NTSR1 の発現が上昇していることに矛盾はないと考える。

質問8) 免疫染色で NTSR1 の発現に差があるが、この発現の差によって阻害剤の効果は変わるのか。

(回答)免疫染色を行ったものと同じサンプルから primary culture を採取し、in vitro 及び in vivo の系で assay を行うことで NTSR1 陽性率と阻害剤効果の相関を調べることができる可能性があるが、本検討では行っていない。

質問9) 今回 Doxorubicin と Ifosfamide と SR48692 の3剤併用の実験は行ったのか。

(回答)in vitro の相乗効果の判定に Chou らの報告した Median-Effect plot (PMID:16968952) を使用しており、これは2剤での相乗効果を combination index という指標を用いて検討する方法である。したがって本検討では2剤併用実験のみ行った。

質問10) 放射線治療の際、SR48692 を投与することで放射線感受性が上がるといったことは考えられるか。

(回答)Nicholas らは前立腺癌細胞株及び非腫瘍原性前立腺上皮細胞株を SR48692 処理後に放射線照射し、その生存率を

## 最終試験の結果の要旨

比較したところ前者では SR 処理により細胞生存能が大幅に低下したにも関わらず、後者では有意な差は認められなかったと報告している。UPS においても同薬剤が UPS 放射線感受性を増強させるのであれば、治療に際し有益な薬剤となる可能性がある。

質問11) SR48692 が臨床試験でパーキンソン病などの良性疾患に使われているが、癌に対して使う場合と機序は一緒なのか。  
(回答) NTS は神経伝達物質として働き、中枢神経系においては黒質及び辺縁系で多く発現している。SR48692 はドパミン D2 受容体刺激作用、及びグルタミン酸輸送阻害により神経保護作用を持つとされ、詳細は不明な点も多いが悪性腫瘍における作用メカニズムとは異なる可能性がある。

質問12) HDAC インヒビターで処理したマイクロアレイ top 30 の中で NTSR1 を選んだ理由は何か。

(回答) Microarray は 1 種類の細胞株 (GBS-1) のみで行ったため、top 30 中の遺伝子について他の細胞株においても同様に HDAC 阻害剤処理で発現が低下するかどうかを qPCR で確認し、一貫して低下するものが NTSR1 であった。

質問13) LBH589 による治療が有効と以前発表されているが今回 SR48692 も有効と発表しているが、お互い作用点は全く違うが有効ということなのか。二つの薬はどちらが有望なのか。

(回答) HDAC 阻害剤は高い抗腫瘍効果を持つ薬剤であるが、多くの遺伝子発現を変動させるためその副作用が懸念される。HDAC 阻害剤が発現変動させる遺伝子を解析し、その標的を特異的に阻害することで抗腫瘍効果を担保しながら副作用を減少させることが望ましいと考え LBH589 標的遺伝子の一つである NTSR1 を特異的に阻害する SR48692 の検討を行った。

質問14) 今回 NTSR1 に注目しているが、NTSR2 と NTSR3 は肉腫の増殖に関係ないのか。

(回答) Luke らは胞巣状軟部肉腫患者から得られた cDNA と Clontech 社の universal reference RNA を microarray で比較し、腫瘍組織では NTSR2 の高発現が確認されている。その他渉猟しえた限り NTSR2 または 3 と肉腫との関連を示す報告はない。

質問15) Hskmc を control として使用しているが、これは適切か、UPS は筋芽細胞から発生すると考えてよいのか。

(回答) Hskmc はヒト骨格筋細胞であり、UPS は筋内から発生することからコントロールとして使用したが、起源が不明である以上他の代表的な腫瘍細胞 (HeLa 細胞等) や、より未分化な細胞等を含めて比較するべきであった。

質問16) NTSR1 が浸潤能を抑制するメカニズムはわかっているのか。

(回答) Ouyang らは glioma において NTSR1 は Jun のプロモーター領域への結合による miR-494 の upregulation を引き起こし、そのターゲットである SOCS6 の downregulation をもたらすことを報告している。SOCS6 は glioma の浸潤能を抑制し、NTSR1 の knockdown で SOCS6 の発現は増加し浸潤能は低下するが、miR-494 の過剰発現で回復することが示された。Jun と microRNA を介した SOCS6 の制御は NTSR1 を介した浸潤能制御のメカニズムの一つと考えられる。

質問17) SR48692 が Doxorubicin, Ifosfamide と相乗効果を示す機序は何か。

(回答) 今回、相乗効果を示すメカニズムを検討することはできなかった。

質問18) UPS においてリガンドである NTS は腫瘍そのものが作っているのか、局所で作られているのか。或いは NTS に関係なく NTSR1 の恒常的活性化により腫瘍増殖が促進している可能性はないのか。

(回答) 本検討において、NTS 自体の発現、NTSR1 の活性については評価していないため不明であるが、上記の如く glioma において悪性度と NTS/NTSR1 の発現が相関するという報告があり、腫瘍そのものが産生している可能性がある。

質問19) 今回使用した細胞に NTS を加えて増殖がどうなるかは実験したか。

(回答) 本検討において NTS 刺激後の細胞増殖能の変化については検討していない。

質問20) 臨床サンプルで NTS の発現はみたか。

(回答) 今回は NTS の選択的受容体である NTSR1 の発現のみを免疫染色で確認しており、NTS の発現は見えていない。

質問21) WST assay と proliferation assay の本質的な違いは何か。

(回答) proliferation assay の一つとして WST assay があると理解している。細胞の生存を酵素活性で評価するもので簡便で再現性が高く、細胞数と高い相関がある。

質問22) WST assay と proliferation assay の data が異なることはあるのか。

(回答) 特殊な状況下で (刺激する薬剤が ROS を産生するなど) WST assay と細胞数が相関しないことがあるが、本検討においては assay 時に顕微鏡下で肉眼的に矛盾のないことを確認している。

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。