

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 668 号		学位申請者	肥後 直倫
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学)
	副査	榎田 英樹	副査	郡山 千早
	副査	上野 真一	副査	東 美智代

主査および副査の5名は、令和4年8月8日、学位申請者 肥後 直倫 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) 免疫染色の評価について陽性と判断したカットオフ値の判断基準はどのようにして決めたのか。

(回答) 当教室での以前に行われた免疫染色の評価法を参考とした。

質問2) SOX9 陽性症例のうち moderate と strong で分けた検討は行ったか。

(回答) 分けた検討を行うと十分な症例数に達しないので、分けた検討は行わなかった。

質問3) 多変量解析を行っているが、SOX9 以外の因子はいずれも予後に関わってくる因子であり、多重共線性の問題が出てくると考えるが考慮しているか。肝細胞癌や大腸癌などで検討した文献では独立した予後因子となっているが、こういった予後因子をすべて入れて検討していたのか。

(回答) 多重共線性については考慮していなかった。文献では単変量で有意であった因子について多変量解析が行われていた。

質問4) 今後の見通しとして将来のバイオマーカーのみならず治療の指標として可能性を示唆していたが、生検検体での段階で判断できるものか。

(回答) 今回、生検検体での検討は行っておらず、今後の検討課題として生検検体と切除標本とを照らし合わせての解析を検討する。

質問5) 正常組織で発現している部位はあるのか。

(回答) 非癌部での食道組織でも一部染まってくる部分もあった。軟骨の形成の際に働く因子でもあり、増殖中の軟骨細胞にも見られる。

質問6) 免疫組織学的染色の評価は核での評価を行っているのか、それとも全体を評価しているのか。

(回答) 核の染色で評価をしている。他の文献においても SOX9 は核で染色されていた。

質問7) サンプルによっては全体は濃染しているけれども核内はそれほど染まっていないものなどはあったか。

(回答) 細胞質も染まるようなものであっても核がより濃染していた。

質問8) SOX9 は転写制御因子とのことだが、SOX9 自体を制御している制御機構は分かっているのか。

(回答) SOX9 は WNT シグナルにより発現が誘導される標的分子となっている。

質問9) 食道癌の治療について術前化学療法を行ったりすることはあるのか。今回の検討では術前治療を行ったものは含まれていないが、術前化学療法によって SOX9 の染色に影響する可能性はあるか。

(回答) 近年は進行食道癌に対しては術前化学療法を行うことが多くなっている。化学療法によって SOX9 の発現に影響を受けるかは明らかにはなっていないが、影響を受ける可能性は考えられたため術前治療を行っているものは今回の検討に含んでいない。

質問10) TCGA (The Cancer Genome Atlas)での食道癌のデータで SOX9 についても今回の研究と同じようなことが言われているのか。

(回答) TCGA では食道扁平上皮癌において SOX9 の遺伝子変異は挙がっていない。

質問11) THE HUMAN PROTEIN ATLAS での食道癌や他の癌腫での発現がどの程度なのか。

(回答) THE HUMAN PROTEIN ATLAS では食道癌については挙げられていなかったが頭頸部癌では約 62% の高発現となっていた。その他では、胃癌で約 65%、大腸癌で約 80%、肝臓癌で約 21%、膵臓癌で約 77% などとなっていた。

質問12) SOX9 は癌遺伝子として働くのか、それとも癌抑制遺伝子として働くのか。

(回答) 癌遺伝子として働くと考えている。

質問13) SOX9 の染色は遺伝子変異を起こした SOX9 も染まっているのか。

(回答) 変異しているものや機能していないものなどが区別されて染まっているかについては検討していなかったが、調べた範囲では免疫染色で遺伝子変異を区別しているといった報告はなかった。

最終試験の結果の要旨

質問 1 4) JCGA (Japanese version of the Cancer Genome Atlas)では、食道癌で SOX9 に変異があるものが 2%程度で、コピー数変化があるものが 6%程度だが、コピー数変化があるものは減少していた。一方で SOX9 発現で悪性度が高くなると報告のある胆管癌ではコピー数変化があるものは増加していた。これをどのように考えているか。

(回答) SOX9 発現により悪性度や予後不良と関連していると報告のある胃癌や大腸癌については JCGA のデータではコピー数変化は増加と減少の両方が見られており、頻度としては減少が多くなっている。また、肝細胞癌でもコピー数変化は増加・減少ともにあるが、頻度は増加が高くなっている。こういったことを踏まえると SOX9 においては、コピー数の増加・減少だけでは一概には悪性度や予後については説明が難しいのではないかと考える。

質問 1 5) 非癌部でも染まっているところがあるとのことであったが、全体的に染まっていたのか。

(回答) 非癌部で染まっている場合には一部のみが染まっていた。

質問 1 6) 免疫染色の評価は、染色の強度で行ったのか。

(回答) 核の染まった割合で評価している。

質問 1 7) 腫瘍内での染色性はどうか。均一であったのか、局在性であったのか。

(回答) strong と評価したものは核が腫瘍全体的に染まっており、moderate で割合が比較的低いものでは散在性に染まっていた。

質問 1 8) 腫瘍内での染色に差異はあったか。例えば、浸潤部でより染まるあるいは脈管侵襲部で染まるなど。

(回答) 腫瘍が大きいものではより染まっていた印象はある。腫瘍の浸潤部やリンパ管部分などに着目しての評価はしていなかった。

質問 1 9) SOX9 は WNT/ β カテニンと関係しているとのことであったが、 β カテニンの染色や評価は行ったか。

(回答) 今回の研究では β カテニンについては検討していなかった。

質問 2 0) 今回、術前治療はしていないものの検討であったが、術後化学療法を行っているものなどはあったか。

(回答) 今回の検討では術後化学療法を行ったかどうかの検討はしていなかった。

質問 2 1) 食道癌は喫煙や飲酒などがリスクファクターであるが、SOX9 との関連について検討したか。

(回答) 今回の検討では、SOX9 と喫煙や飲酒との関連については検討していなかった。

質問 2 2) 今回使用した抗体はモノクローナルとポリクローナルのどちらであったか。

(回答) ポリクローナル抗体であった。

質問 2 3) negative control としては非特異的 IgG を用いるのが一般的と考えるが、PBS を使用しているのはなぜか。

(回答) negative control を用いる理由は偽陽性の証明であり、特に問題となるのが、非特異的な染色結果が得られた場合である。非特異的反応の有無を確認するための negative control としては① 一次抗体の代わりに同種動物免疫グロブリン濃度の他抗体を用いる、② 一次抗体の代わりに同じ免疫グロブリン濃度の同種動物正常血清を用いる、③ 一次抗体の代わりに PBS を用いる、といった方法があり、今回は③の方法を用いた。

質問 2 4) 今回選択した症例は術前化学療法を選択していないが、それはなぜか。

(回答) 術前化学療法が SOX9 の発現に影響する可能性を考えたことから、症例として術前化学療法を行っていない症例を選択した。また、選択した症例を治療した年代では術前化学療法は標準治療ではなかったためである。

質問 2 5) SOX9 は正常細胞には発現しないのか。

(回答) SOX9 は軟骨の形成の際に働く因子でもあり、増殖中の軟骨細胞にも見られる。

質問 2 6) 細胞質も染まってきているものがあるがどう考えているか。

(回答) SOX9 は主として核に局在しているが、口腔扁平上皮癌における SOX9 の報告において SOX9 の細胞質陽性に着目しているものがある。同文献において浸潤癌胞巣では免疫染色で SOX9 核陽性に加えて細胞質陽性を示す症例が多く見られており、細胞株を用いた検討も行われ、SOX9 の細胞質発現はその細胞の SOX9 発現量の著しい増加により生じている可能性が示唆されていた。本研究においても強発現しているもので細胞質も染色されている傾向があり、SOX9 発現量の著しい増加により細胞質発現が生じている可能性はあると考えている。

質問 2 7) 細胞株による研究での SOX9 の報告はあるか。

(回答) 肝内胆管癌の細胞株を用いた遺伝子 transfection による報告があり、SOX9 の過剰発現により EMT と浸潤の促進および E-cadherin の発現減少が見られたと報告されている。

質問 2 8) 食道癌の部位別 (上部・中部・下部) での検討は行ったか。

(回答) 今回、部位ごとの検討は行っていなかった。

質問 2 9) SOX9 について肺癌でも報告があるが、どの組織型で発現が報告されていたのか。

(回答) 非小細胞肺癌において SOX9 の発現上昇が予後不良と関連しているとの報告であった。

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。