

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 美濃部 ころ

本研究は未分化で悪性度の高い腫瘍である Ewing 肉腫の早期診断、簡便かつ非侵襲的な鑑別診断を目的とした、腫瘍マーカーの候補となるような遺伝子を探索するため、改良型シグナルシークエンストラップ(SST)法を用いてスクリーニング解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SST 法によるスクリーニング解析では、80 種類の膜蛋白質および分泌蛋白質を同定した。腫瘍細胞株や諸臓器での遺伝子発現の比較検討から、Ewing 肉腫細胞において有意に高く発現し、これまで Ewing 肉腫との関連性が示されていなかった分泌型蛋白質 ADAMTS4 を見出した。

2. Ewing 肉腫発症の原因と考えられている融合遺伝子の発現の有無を、解析に用いた Ewing 肉腫細胞株 SJES-2, 3, 5, 6, 7, 8 で検討したところ、すべての細胞株において *EWS-FLI1* を発現していることが明らかになった。また siRNA による *EWS-FLI1* 遺伝子の発現抑制によって、*ADAMTS4* mRNA 発現が抑制されたことから、*ADAMTS4* は *EWS-FLI1* の下流に位置する可能性が示唆された。

3. Ewing 肉腫患者腫瘍組織の免疫染色では、*ADAMTS4* の発現が認められた。Ewing 肉腫細胞株を用いた免疫蛍光染色においても、主に細胞質に *ADAMTS4* が検出された。

4. Ewing 肉腫細胞抽出物と細胞株培養上清の両方において分子量約 100kDa の *ADAMTS4* 蛋白質が検出されることを免疫沈降法により示した。これにより *ADAMTS4* 蛋白質は細胞内から細胞外に分泌されていることが示された。

5. 骨軟部腫瘍患者組織由来の RT-PCR では、Ewing 肉腫患者において 7 例全例で比較的高レベルの *ADAMTS4* 発現が認められたが、患者血清 6 例では *ADAMTS4* の分泌は検出限界以下であった。一方骨肉腫患者の RT-PCR では 13 例中 2 例において *ADAMTS4* が陽性であり、患者血清でも 3 例中 2 例で *ADAMTS4* が検出された。このことから、*ADAMTS4* は骨肉腫の腫瘍マーカーとなりうる可能性が示された。

以上、本論文は診断に有効な腫瘍マーカーの探索を目的とし、Ewing 肉腫細胞株から SST 法を用いた膜蛋白質、分泌蛋白質のスクリーニング解析において、これまで Ewing 肉腫とは関連性が報告されていなかった分泌蛋白質 ADAMTS4 の存在を明らかにした。さらに ADAMTS4 が骨肉腫患者の新規血清マーカーとして有用である可能性を示した。本研究は悪性度が高い Ewing 肉腫ならびに骨肉腫における、新しい血清診断法、特に病勢判定法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。