



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Validation of histological diagnostic methods for detecting endothelin B receptor expression [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	福田, 直也
Description	配架番号 : 2066
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11194号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55521
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Fukuda_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 福田 直也

主査 教授 秋 田 弘 俊
審査担当者 副査 教授 松 野 吉 宏
副査 教授 平 野 聡

学 位 論 文 題 名

Validation of histological diagnostic methods for detecting endothelin B receptor expression

(Endothelin B receptor の発現を評価する適切な組織学的診断手法の確立)

浸潤性膵管癌（以下、膵癌）は極めて予後不良な癌のひとつである。われわれは過去に、膵癌において腫瘍浸潤 T リンパ球の存在は有意な予後良好因子であることを示した。最近、腫瘍血管内皮における Endothelin B receptor（以下、ETBR）の過剰発現が抗腫瘍免疫を抑制し、予後不良因子となると報告された。しかしながら、これまでの報告は、客観的な対照に基づいた至適条件で施行されたものではなく、ETBR 発現の意義やその予後に関する影響に関しては不明確であった。今回、ETBR 発現の検出に必要な免疫組織染色の至適条件を確立し、膵癌患者における ETBR 発現を客観的に評価することを目的として、本研究を行った。

まず、ETBR 発現系の構築として、ETBR cDNA をサブクローニングし、Transfectant cell を作成した。その後、4 種類の抗 ETBR 抗体を用いて、Transfectant cell とヒト正常組織における ETBR タンパク検出能を評価するため、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、および免疫組織染色を行った。次に、ETBR mRNA 発現の検討として、同様のサンプルで半定量的 RT-PCR を施行した。最後に、ヒト膵癌組織における ETBR 発現の検討として、膵癌細胞株についてウェスタンブロッティングと免疫組織染色を、ヒト膵癌組織切片について免疫組織染色を行った。

ETBR 遺伝子発現系を構築した結果、陽性対照となる ETBR 発現細胞を作成しえた。ウェスタンブロッティングでは陽性対照には ETBR 分子量の理論値とは異なるサイズに複数のバンドが出現した。これらは 4 種類の抗体に共通して認められ、バンドの濃さは抗体ごとに異なった。ヒト正常組織では、いずれの臓器でも陽性対照とは異なるバンドパターンが抗体ごとに異なって出現した。フローサイトメトリーでは 4 種類の抗体全てにおいて ETBR タンパクの発現を検出した。ETBR 陽性細胞の割合は抗体ごとに異なった。免疫組織染色では陽性対照で 4 種類の抗体全てで細胞膜表面に染色を認めた。ヒト正常組織においては副腎にのみ明瞭な染色が認められ、その染色は抗体ごとに染色部位や染色の濃さが異なった。mRNA 発現の検討では、ヒト正常組織の中では副腎のみに比較的弱い ETBR mRNA の発現が認められた。ヒト膵癌組織切片の免疫組織染色では、膵癌細胞と血管内皮細胞のいずれにも

ETBR 過剰発現は認められなかった。膵島などの他の組織には染色を認める部位も存在した。

本研究では客観性の高い陽性および陰性対照を確立することができた。ウェスタンブロッティングにおいて ETBR 分子量と異なる複数のバンドが出現した理由は ETBR の重合や他の膜タンパクとの結合、splicing variant や糖鎖修飾の存在が考えられる。ヒト正常組織のウェスタンブロッティングでのバンドは ETBR の理論値とも陽性対照のパターンとも異なっており、mRNA の検討結果も合わせると大部分が非特異的反応と考えられる。ETBR タンパクと ETBR mRNA の検討から、ヒト正常組織における免疫組織染色での染色パターンは副腎を除き、大部分が非特異的反応と考えられる。副腎は適切な条件下であれば免疫組織染色の陽性組織対照のひとつとなり得る。本検討から、ヒト膵癌組織においては ETBR の生物学的機能性は低いとも考えられた。

以上より、膵癌において Endothelin B receptor の発現を評価する適切な組織学的診断手法を確立した。免疫組織染色は客観性の高い陽性・陰性組織対照を用いなければ、非特異的染色を標的分子の染色と誤認するリスクを伴った診断手法であることを常に留意すべきであると考えられた。

口頭発表に続き副査 松野教授より、本検討で膵癌組織における ETBR 発現を検討した免疫組織染色法の「適格性」についての質問があった。発表者は、本検討における免疫染色は客観性を有する陽性対照を用いて行っているため、適切な免疫組織染色のひとつであったと考えるが、より生体内での発現および生物学的機能を反映させた「最適な」条件に向けての検討の余地がある、と回答した。続いて副査 平野教授より①ETBR 染色結果の解釈、②ETBR 過剰発現による腫瘍浸潤リンパ球減少のメカニズムについての質問があった。最後に主査 秋田教授より①背景に出てきた卵巣癌での ETBR 発現と予後との検討における具体的な方法、②他の癌腫での同様の報告の有無、③卵巣癌の報告での免疫組織染色の方法、③発表者は膵癌組織の mRNA レベルでの ETBR 発現の検討を行ったか否か、について質問があった。いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解した上で、自らの研究内容と文献的考察を交えてほぼ的確に回答し、当該領域に関する深い見識と研究遂行能力を有することを示した。

審査員一同はこれらを総合的に評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。