

学位論文審査結果の要旨

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 臨床医学系講座 運動器外科学・腫瘍集学治療学分野	氏 名	なかむら こういち 中村 公一
審 査 委 員	主 査 渡邊 昌俊 副 査 平山 雅浩 副 査 藤原 弘		
<p>(学位論文審査結果の要旨)</p> <p>GPR64, Screened from Ewing Sarcoma Cells, Is a Potential Target for Antibody-Based Therapy for Various Sarcomas</p> <p>【主論文審査結果の要旨】</p> <p>著者らは論文において下記の内容を述べている。</p> <p>【目的】</p> <p>Ewing 肉腫は、小児から若年成人世代の骨や軟部組織で主に発生する肉腫である。手術、化学、放射線などの集学的治療が行われるが、初診時転移を有する患者の5年生存率は30%未満と予後不良であり、約25%の患者は化学療法が無効とされる。近年、上皮癌や血液癌では、キメラ抗原受容体T細胞療法や抗体薬物複合体など細胞表面抗原を標的とする免疫療法が登場しており、肉腫での導入も期待される。肉腫は希少癌であり遺伝子変異が少ないことから治療標的の探索は容易ではない。そこで、我々は精巣上体(管腔側)に発現する抗原が、血液精巣上体関門により、免疫系から隔離されると考え、標的候補に含めた。本研究の目的は Ewing 肉腫細胞株のトランスクリプトーム解析を通して、肉腫の抗体医薬の治療標的を探索し、その有用性を検討することである。</p> <p>【方法】</p> <p>Ewing 肉腫細胞株(HTB166)と健常者白血球のトランスクリプトーム解析を行い、HTB166での発現が高く、白血球での発現が低い転写産物をスクリーニングした。次に標的蛋白の発現臓器、細胞内での局在、抗体が結合可能な部位を探索した。14種類の肉腫細胞株と32人の患者由来組織でのRNA発現は Polymerase chain reaction(PCR)で評価し、蛋白発現は Western blotting(WB)で評価した。患者組織(13組織型、全112例)での蛋白発現は免疫組織化学的手法で評価した。Ewing 肉腫細胞株(A673)、線維肉腫細胞株(HT1080)、骨肉腫細胞株(143B)をマウス背部皮下に移植(各</p>			

6匹)し、直径 8-15 mmまで生育させた。Alexa Fluor700(AF700)標識標的の特異的抗体投与群(実験群)と AF700 標識非特異的 IgG 抗体投与群(対照群)の 2 群に分け、抗体を尾静脈投与した。背部腫瘍への蛍光集積は IVIS を用いて *in vivo* で経時的に測定し、臓器への集積は *ex vivo* で測定した。臓器別標的蛋白発現は免疫組織化学的手法で評価した。

【結果】

スクリーニングの結果、G-protein coupled receptor 64(GPR64)を候補とした。GPR64 は巨大な細胞外ドメインと 7 回膜貫通型構造を有し、正常臓器では精巣上体でのみ発現が知られる。本研究では GPR64 の細胞外ドメインを免疫原とする抗体を購入した。PCR では Ewing 肉腫、骨肉腫、滑膜肉腫、線維肉腫、悪性末梢神経鞘腫において GPR64 mRNA 発現を認めた。WB では A673、HT1080、143B において GPR64 発現を認めた。GPR64 蛋白発現率は Ewing 肉腫 100%(11/11)、骨肉腫 76.9%(10/13)、軟骨肉腫 90.9%(10/11)、脊索腫 93.3%(14/15)、粘液線維肉腫 50%(6/12)、脱分化型脂肪肉腫 53.8%(7/13)、線維肉腫 50%(2/4)、未分化多形肉腫 46.1%(6/13)、平滑筋肉腫 33.3%(3/9)、多形型脂肪肉腫 100%(1/1)、滑膜肉腫 0%(0/4)、悪性末梢神経鞘腫 0%(0/3)、粘液型脂肪肉腫 0/3(0%)であった。

In vivo では A673、HT1080 で 24 時間以降、実験群は対照群より蛍光は有意に集積し、*ex vivo* では A673、HT1080、143B で実験群は対照群よりも有意に集積した。一方、正常臓器では集積に差を認めなかった。免疫組織化学的評価では GPR64 は A673、HT1080、143B、精巣上体(管腔側)でのみ発現を認めた。

【結論】

GPR64 は悪性骨腫瘍を中心に様々な組織型で発現していた。また、本研究で使用した抗 GPR64 抗体は腫瘍特異的に高集積し、精巣上体など正常臓器へは特異的に集積せず、同蛋白に対する抗体医薬品としての可能性を認めた。

この論文は、GPR64 は GPR64 発現肉腫に対して抗体医薬の治療標的となる可能性を示した論文であり、学術上極めて有益であり、学位論文として価値あるものと認めた。

Cancers 14(3):814

Published: February 5, 2022

doi: 10.3390/cancers14030814

Koichi Nakamura, Kunihiro Asanuma, Takayuki Okamoto, Keisuke Yoshida, Yumi Matsuyama, Kouji Kita, Tomohito Hagi, Tomoki Nakamura and Akihiro Sudo