

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 720 号	学位申請者	鶴田 雅史
審査委員	主査	橋口 照人	学位 (博士 (医学・歯学・学術))
	副査	大塚 隆生	副査 井上 博雅
	副査	家入 里志	副査 西尾 善彦
<p>主査および副査の5名は、令和5年12月15日、学位申請者 鶴田 雅史 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回答を得ることができた。</p> <p>質問1) TCGA のデータベースでは正常組織と腎癌組織で RAB27B の発現に差が無いが、一方でウエスタンブロットでみると HK2 と比較し腎癌細胞株で RAB27B の発現が亢進している。どのように考えれば良いか。 (回答) 臨床検体と細胞株との差異を反映しているものと考えられる。また、mRNA から蛋白に翻訳される過程で何らかの修飾が加わっている可能性も考えられる。</p> <p>質問2) スニチニブの標的である VEGFR や PDGFR の発現は耐性株で変化しているのか。 (回答) VEGFR 経路の蛋白を 786-o, A498, 各耐性株で評価したが、有意な差はみられなかった。PDGFR に関しては検出出来ていないが、スニチニブはマルチキナーゼ阻害剤であり、VEGFR 以外の経路が耐性機序に関与している可能性はあるものと考えられる。</p> <p>質問3) エクソソームの定量化に用いたキットの正確性に問題はないか。 (回答) CD63 の ELISA キットは一般的には用いられてはいない。エクソソームの定量は CD63 の多量をウエスタンブロットで評価することが一般的だが、複数の抗体を使用したものの良好なバンドが得られなかったため、止むを得ず ELISA キットを使用した。</p> <p>質問4) RAB27B のノックダウンでエクソソームの分泌が抑制されなかった機序に RAB27A が関与している可能性はないか。 (回答) RAB27B は multivesicular body (MVB) の細胞膜への輸送に作用し、RAB27A は MVB の細胞膜との融合に作用することが報告されている。RAB27A の発現に関しては検出出来ていない。細胞の生存に不利な環境になるとエクソソームの分泌が亢進することが報告されており、これによりエクソソームの分泌量が低下しなかった可能性があると考えられている。</p> <p>質問5) 腎癌細胞株のエクソソームに内包される RNA の種類は分かっているのか。 (回答) 腎癌細胞株由来のエクソソーム内の miRNA を解析した報告がある (Cancer research. 2011; 71(15):5346-56)。今後、親株と耐性株とでエクソソーム内の miRNA の比較を試みる必要があると考えている。</p> <p>質問6) RAB27B の阻害剤は存在するか。 (回答) 現在、開発されていない。</p> <p>質問7) RAB27B をノックダウンすることでスニチニブに対する耐性は変化するのか。 (回答) 今回の研究ではスニチニブ耐性の変化は検出出来ておらず、今後の課題としたい。</p> <p>質問8) 腎癌細胞株でエクソソームの分泌が増えているか検証したのか。 (回答) 実験での検証は行っていないが、卵巣癌患者の血中には臓癌由来のエクソソームが増加していることが報告されている (Gynecol Oncol. 2008 Jul; 110(1):13-21)。今後、HK2 と腎癌細胞株とで比較検証したい。</p> <p>質問9) RAB27B の癌促進作用はある程度普遍的なものか。 (回答) 具体的な作用機序は示されていないものもあるが、多数の癌腫で癌促進作用が報告されている。</p> <p>質問10) RCC の好発年齢は? 学童での RCC を稀に経験するが、RAB27B の発現に年齢による差異はあるか。 (回答) 好発年齢は 50-60 代。RAB27B の年齢による発現の差異は知られていない。</p> <p>質問11) RAB27B の癌促進作用は癌の転移あるいは浸潤どちらの方に強く作用しているか。 (回答) 転移・浸潤いずれの報告もあるが、転移に関する報告の方が多い印象である。</p> <p>質問12) 小児の Wilms 腫瘍等、淡明細胞型腎細胞癌・乳頭状腎細胞癌以外の組織型での RAB27B の発現はどうか。</p>			

最終試験の結果の要旨

(回答) OncoLnc で生存解析可能な組織型が淡明細胞型・乳頭状のみであったため、他の組織型での RAB27B の発現解析は行っていない。Wilms 腫瘍と RAB27B との関連は報告がなかった。

質問 1 3) なぜエクソソームに内包して運ばないといけないのか。(癌を促進する因子を) 自分の細胞内で作用させればよいのでは?

(回答) 核酸は血中の RNase により速やかに分解されてしまうが、エクソソームに内包することで分解を回避することが出来る。そのような特性を利用し、腫瘍細胞が分泌するエクソソームが転移先の環境を変化させ遠隔転移を促進する作用が報告されている。また、腫瘍細胞がエクソソームによって腫瘍微小環境を変化させることや、薬剤耐性となった細胞がエクソソームを介した核酸の輸送で周囲の薬剤感受性細胞に耐性を獲得させることも報告されており、細胞内レベルだけでなくエクソソームを介した多様なアプローチを駆使することで、癌細胞にとって有利な環境を構築しているものと思われる。

質問 1 4) RAB27B の細胞内での局在はどこか。スニチニブとの関係において RAB27B の機能はどのようなものか。

(回答) 局在は細胞質である。本研究では RAB27B のノックダウンにより VEGF 経路・MAPK 経路が抑制されることが示されており、同様に RAB27B と VEGF 経路・MAPK 経路との関連を示した報告がある (Geno. 2019; 709:48-55, Gastroenterology. 2019; 156(3):722-34)。しかし、経路内のどの分子にどのように作用するかは明らかでなく、今後の検証課題であると考ええる。

質問 1 5) si-RAB27B の機能解析で遊走能・浸潤能等をみているが、細胞死も絡んでいるものと考えられる。アポトーシスアッセイは実施したか。

(回答) アポトーシスアッセイは実施していない。パスウェイ解析で P 値の最も低かったものがセルサイクルであったため、今後、アポトーシスアッセイやセルサイクルアッセイを実施する必要があると考えている。

質問 1 6) 消化器外科領域でも NET 等にエベロリムスやスニチニブを使用するが、腎癌において使用頻度はどちらが高いか。エベロリムスに関する報告はあるか。

(回答) スニチニブは長期間進行腎癌の一次治療として使用されていたが、エベロリムスは二次治療以降の位置づけとなっており、スニチニブの方が使用頻度は高い。近年、非小細胞肺癌においてエベロリムスが RAB27A・RAB27B 依存的に腫瘍抑制性 miRNA である miR-7-5p を内包したエクソソームの分泌を促すことが報告されている (Cell Death Dis. 2022 Feb 8;13(2):129)。今後、エベロリムスも視野に入れ研究を進めたい。

質問 1 7) 論文タイトルに "exosome independent function" とあるにも関わらず、エクソソームに関連する Figure (S3 Fig.) を body figure にしなかった理由はなにか。

(回答) 当初 RAB27B のノックダウンによりエクソソームの分泌が低下することを期待して実験を開始したが、予想に反して分泌量に変化を認めず、またエクソソームの作用に関して有意な変化を見出せなかった。上述の通りエクソソームの定量に用いた CD63 の ELISA キットが広く用いられている手法ではないこと、negative data となったことから Supplementary Figure とした。

質問 1 8) RAB27B をノックダウンすることで複数の細胞株で増殖能・遊走能・浸潤能が抑制されているが、これが新規の知見と言える根拠はなにか。

(回答) 複数の癌種で RAB27B の癌促進作用が報告されているが、これまで腎癌に関しての報告はなかった。また、スニチニブ耐性株でも癌促進作用が示されたことに意義があるものと考えている。

質問 1 9) 実験手技的な細胞毒性や si-RAB27B の細胞毒性をどう否定するか。

(回答) 実験手技的な観点からは、リポフェクション法以外での核酸導入実験が選択肢として挙げられる。Off target 効果を否定するために、2 種類の si-RAB27B を用いて実験を行った。si-RNA の毒性は mock・si-control との比較で否定し得るが、si-RAB27B の毒性を完全に否定するためには、RAB27B の過剰発現実験を行う必要がある。

質問 2 0) 腫瘍抑制性 miRNA をエクソソームによって廃棄することで転移の活性を上げていくというメカニズムは一般的なもののか。

(回答) 考察で示した文献以外にもいくつか報告はあるものの (Oncotarget. 2015 Sep 8;6(26):21918-33, Oncotarget. 2017 Mar 21;8(12):20145-20164)、エクソソームの内包物が癌促進的に作用する報告が圧倒的に多い。

質問 2 1) エクソソームの単離に際し、どの位の細胞を培養したのか。

(回答) 超速心のローターは一度に 40mL×6 本処理出来る。15cm dish 1 枚から約 20mL の上清が得られるため、12 枚分核酸導入して培養した。RNA の抽出や CD63 のウェスタンブロットに使用するため、行程を繰り返した。

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。