

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 724 号	学位申請者	福元 渉
審査委員	主査	大塚 隆生	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 井上 博雅
	副査	西尾 善彦	副査 家人 亘志

主査および副査の5名は、令和5年12月20日、学位申請者 福元 渉 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。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) 7つの候補遺伝子から SCG2 を選択した理由はなぜか。他の6つの遺伝子はどうか。

(回答) SCG 以外の遺伝子の HR、LOC100506191、PSND6-AS2、RVR3、TMOD2 は3つの細胞株で共通して発現が上昇していたが、TCGA database の解析では高発現群で全生存期間が有意に低下していなかった。EMPR1B に関しては高発現群で OS の有意な低下を認めたが、正常細胞に比べて癌細胞では発現の低下を認めた。上記の理由より、7つの遺伝子の中で SCG2 が最も RCC において腫瘍促進効果があり、スニチニブ耐性に影響があることが予想されたため、SCG2 を候補遺伝子として選択した。

質問 2) tubeformation assay で癌細胞の増殖として無血清を使用した理由はなにか。

(回答) 血清中には細胞成長因子やサイトカインなどが含まれており、これらの因子が tubeformation assay の結果に影響を与える可能性があるため、外部因子の影響を取り除くために無血清増殖地を使用した。

質問 3) sh-RNA を使用してのノックダウンは lentivirus を使用したものとは比べてどうか。

(回答) sh-RNA 配列がレンチウイルスベクター複製用プラスミドにサブクローニングされており、プラスミドを Lipofectamin2000 を使用してレンチウイルスパッケージング用細胞株 (HEK 293T) にトランスフェクションすることで、sh-RNA 発現レンチウイルスベクターを作製した。産生されたウイルスを SUR-Caki1/ACHN に感染させ puromycin で感染細胞を選別したところ、十分なノックダウン効果が得られた。

質問 4) SCG2 をノックダウンし、遊走能、浸潤能が抑制されたとのことであったが、EMT は調べたか。

(回答) 今回の実験では EMT に関しては検証を行っていない。今後の研究課題とさせていただきます。

質問 5) 免疫沈降の実験で SCG2 と HIF1 α の interaction を提示しているが、どのように作用しているのか。

(回答) SCG2 と HIF1 α の作用に関しては、現時点では報告はなく、今回の実験では検証していないため、今後の課題とさせていただきます。

質問 6) SCG2 は癌腫によって低発現か高発現となったりしているが、血行性転移・リンパ行性転移が関係しているのか。

(回答) 癌腫において SCG2 は VEGF-A を介しての血管新生作用による腫瘍増殖作用が言及されており、大腸癌では血管新生、免疫関連経路の調節作用が言及され、前立腺癌ではホルモン関連遺伝子としての SCG2 の作用が言及されている。癌腫によっては血行性転移が関与するが、SCG2 の血管新生作用以外の働きも作用している可能性が考えられる。また、癌腫によって低発現、高発現になる理由としては、SCG2 の制御 (プロモーター領域のメチル化、変異) などの影響が発現の差に関与していることが考えられる。しかし、あくまでもスペキュレーションの範囲であり今後のメカニズムの解明に期待したい。

質問 7) SCG2 は RCC において癌の stage に関わらず発現が高値であるのか、進行度が進むにつれて発現が上昇するのか。

(回答) TCGA database を使用した解析では clinical I stage で I、II 群と比較して III、IV 群では発現が高値であるため、進行度が進むにつれて SCG2 の発現は高値になると考えられる。

質問 8) SCG2 と VEGF の関連を述べていますが、治療を実際に考えたときには SCG2、HIF1 α をターゲットにしたほうがいいのか、もしくは VEGF のようなより下流をターゲットにしたほうがいいのか。

(回答) 一般的には、pathway の上流での阻害がより広範な制御が可能と考えられる。しかし、正常細胞にも各々の遺伝子は発現している為、正常細胞への影響や副作用とのバランスも考慮する必要があると考えられる。

質問 9) 今回の細胞株のレベルで VEGF の阻害剤を使用している実験はしていないか。

(回答) その他の TKI として Axitinib を併用して過剰発現実験を行った。SCG2 を過剰発現させることでは Axitinib の遊走能、浸潤能、血管新生能の抑制効果が減弱することがわかった。

最終試験の結果の要旨

質問 10) SCG2 のレギュレーション機構に関して、SCG2 の上流はプロモーターが作用しているのか。

(回答) RCC における SCG2 のレギュレーション機構は不明な点が多いが、神経芽細胞では SCG2 プロモーター活性は、サイクリック AMP 応答要素結合タンパク質 (CREB) 発現のレベルに依存することが報告されている。また、SCG2 mRNA レベルは、神経伝達物質であるグルタミン酸、ドーパミン、ノルアドレナリンによって上昇し、GABA によって低下することが報告されている。

質問 11) Pull-down assay で SCG2 が HIF1 α と物理的に結合していることが示されたわけだが、結合することでユビキチン化が阻害されるなど、結合することでなにが起こっているのか。SCG2 と HIF1 α の結合の仕方はわかっているのか。リン酸化、ドメイン等が関与しているか。

(回答) SCG2 と HIF の結合の仕方に関しては、現時点では報告なく、今回の実験では検証しておらず、今後の研究課題とさせていただきたい。

質問 12) スニチニブが VEGF-C の mRNA を安定させる機序はなにか。

(回答) スニチニブが VEGF-C の 5' UTR レポーター遺伝子の活性を刺激することで、VEGF-C mRNA の半減期が延長され、安定化される。

質問 13) SCG2 が癌の種類に依存して、増殖促進、増殖抑制にはたらくと述べているが、逆の働きをする機序は。

(回答) 癌種によっては SCG2 の血管新生作用以外の働きが作用している可能性が考えられる。また、SCG2 の制御 (プロモーター領域のメチル化、変異) などの影響が発現の途に関与していることが考えられる。さらに、エピジェネティックな要因を含めた他の遺伝子の影響や癌種の特性の違いなどが考えられる。しかし、あくまでもスベキュレーションの範囲であり今後のメカニズムの解明に期待したい。

質問 14) スニチニブ耐性腎細胞癌において、VEGF-A のオートクライン作用が阻害される機序はなにか。

(回答) VEGF の増加は、自己分泌メカニズムを介して細胞自律的な腫瘍細胞増殖を誘導し、VEGF 受容体遺伝子ファミリーメンバーの Flt1 を活性化し VEGF 分泌を起こす。細胞内および細胞膜の両方で発現している Flt1 は、マルチターゲットレセプター阻害剤であるスニチニブによるより広い範囲の阻害により、自己分泌メカニズムが阻害される。

質問 15) SCG2 の 3 つの生理活性ペプチドにおいて SN 以外の EM66 およびマンセリンはどのような生理活性を持っているか。

(回答) EM66 は、内分泌細胞および神経内分泌細胞の分泌顆粒、ならびに視床下部ニューロンに広く分布している。EM66 の働きの一つとして、外側視床下部領域の免疫反応性ニューロン集団の活性を阻害し、食欲不振活性を発揮する可能性が示唆されている。マンセリンはストレス応答に関与していると仮定されている。しかし、いずれも生理学的機能はまだ決定されていない。

質問 16) SCG2 は低酸素環境下で発現が増強するのか。

(回答) ヒト神経芽細胞腫由来の細胞が、低酸素状態となると SCG2 の発現がアップレギュレーションしたという報告がある。SCG2 の発現の増加は、固形腫瘍における低酸素による血管新生の誘導に関与している可能性があると考えられている。これらのことから SCG2 は低酸素環境下で発現が上昇すると考えられる。

質問 17) 無血清の細胞培養に関して、単なる低酸素だけでは HIF1 α は誘導されない。血清飢餓状態を作ることで HIF1 α が誘導されるので無血清培養での実験が好ましい。

(回答) ご指摘ありがとうございます。

質問 18) RCC は多血腫瘍なのに低酸素が誘導される環境は臨床的にはどう考えるか。

(回答) 腫瘍の中心は低酸素状態であることが予想され、実際に大きな腫瘍では内部がネクローシスになっていることを経験する。

質問 19) RCC は T4 因子だけで stage 4 となり、遠隔転移があるものと同じ扱いになるが、T4 となると T3 以下の RCC と比べてなにかしらのスイッチが入って悪性度が高くなるのか。

(回答) RCC における T4 は隣接臓器への直接浸潤である。RCC は肝臓、脾臓、膵臓、膀胱、横隔膜、十二指腸によって圧迫され、腫瘍はカプセル化されていることが多いため、隣接臓器への直接浸潤することはめずらしい。カプセル化を破ってまで浸潤するという事は進行した RCC であることで、遠隔転移した腎癌と同じ staging になると考えられる。

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。