

氏名	神鳥 周也		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9209 号		
学位授与年月	平成 31年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Phospholipase D2 promotes disease progression of renal cell carcinoma through the induction of angiogenin (淡明型腎細胞癌の進展におけるホスホリパーゼD2の生物学的意義の検討)		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	山縣邦弘
副査	筑波大学教授	博士（医学）	小田竜也
副査	筑波大学准教授	博士（薬学）	鈴木裕之
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	水口剛雄

論文の内容の要旨

神鳥 周也氏の博士學位論文は、淡明型腎細胞癌におけるホスホリパーゼ D、中でも PLD2 の役割を腎癌手術摘出標本を用いて免疫組織化学、分子生物学的に探索を行い、中でも淡明型腎細胞癌において関与の大きい PLD2 制御について検討したものである。

その要旨は以下のとおりである。

【目的】

淡明型腎細胞癌（ccRCC）は、その細胞内に脂質を多く含み、ヘマトキシリン・エオジン染色で淡明であることが特徴である。著者は、ccRCC におけるホスホリパーゼ D（PLD）、中でも PLD2 の役割、さらに PLD2 制御に伴う新規治療法開発の可能性について検討した。

【方法】

1) ccRCC 患者手術標本における PLD1 及び PLD2 発現の検討

対象は ccRCC 患者 67 例である。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織を用いて染色を実施、このうち 52 例は凍結組織から RNA の抽出も行っている。抽出した RNA から cDNA を作成し、PCR アレイを実施した。使用した PCR アレイは、RT2 Profiler PCR Arrays (SA Biosciences 社) である。また PLD1、PLD2 の mRNA 発現は qRT-PCR、タンパク発現は免疫化学染色により検討している。

2) ヒト腎癌細胞株での検討

VHL 変異を有するヒト腎癌細胞株である SKRC52、SKRC59 を使用している。ON-TARGETplus human PLD1, PLD2, non-targeting pool siRNA (Dharmacon 社) を用い、PLD1、PLD2 遺伝子の発現抑制の有無を検討した。また、遺伝子発現抑制株の樹立のためにレンチウイルスベクターシステムを使用している。細胞株のタンパク発現はウエスタンブロット、mRNA 発現は qRT-PCR により検討した。in vitro における細胞増殖、浸潤の評価には皮下移植モデルには MTT アッセイ、腎被膜下移植モデルにはマトリゲルインベーションアッセイを行っている。

3) 統計解析

JMP 10 software (SAS Institute 社) を使用している。生存期間解析は Kaplan-Meier 法を用い、Log-rank 法にて 2 群間の差を検定している。予後因子の同定には Cox' s proportional hazard regression model を用いている。

【結果】

著者はまず、ccRCC 患者の腫瘍組織における PLD1 及び PLD2 発現は亢進し、高発現症例では進行がんや高悪性度腫瘍が有意に多かったとしている。また PLD2 発現と予後との関連を検討したところ、PLD2 高発現症例では生存期間が短く、多変量解析において PLD2 高発現は独立した予後不良因子であることが明らかとなった、としている。

次に、著者は腎癌細胞株に対して siRNA による PLD1、PLD2 の遺伝子発現抑制を行った結果、特に PLD2 の遺伝子発現抑制では in vitro における細胞増殖・浸潤への抑制効果が高かったとしている。PLD 阻害薬を使用すると、PLD 阻害薬 (PLD1 と PLD 2 の双方を阻害) に比べ、PLD2 特異的阻害薬の細胞浸潤抑制効果がより強かったと述べている。

著者はこの結果から、ccRCC の進展には PLD2 が重要であると考え、shRNA ベクターを用いて PLD2 遺伝子発現抑制株を樹立し、PLD2 の in vivo における腫瘍増殖や浸潤へ及ぼす影響を検討したところ、PLD2 遺伝子発現抑制腎癌細胞株皮下移植モデルにおける腫瘍増殖の抑制が確認され、腎被膜下移植モデルでは腎実質への浸潤性増殖が抑制された、としている。そして、このような腎癌細胞株について PLD2 が制御する浸潤・転移に関連する遺伝子の同定のために PCR アレイによる遺伝子発現解析を行った結果、angiogenin (ANG) が正に制御されている遺伝子として同定された。中和抗体による ANG のタンパク阻害により腎癌細胞株の浸潤が抑制され、PA を添加したところ ANG の mRNA 発現が亢進することを見出している。著者は以上の結果から、ccRCC では PLD2 により産生された PA が ANG を制御し、細胞浸潤を促進することが示唆されたとしている。

【考察】

ANG は大腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離された血管新生因子であり、がんの増殖、浸潤や転移を促進する。ccRCC 患者では腫瘍組織のみならず血清中 ANG 濃度が高いことが報告されているが、その制御メカニズムや潜在的な役割については不明であった。著者の本研究で、初めて PLD2 が産生する PA が ANG の発現制御を介して、がんの浸潤を促進することが明らかにされた。転移性腎癌に対する標準治療である分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬は未だ完全寛解に至る症例は少なく、更なる治療成績の向上が強く望まれている。この研究の成果から PLD2 が転移性腎癌に対する治療標的となることが示唆されるが、PLD 阻害薬におけるオフターゲット効果やアイソザイム選択性など、今後の課題である。将来的には臨床応用可能な PLD2 選択的阻害薬の開発が望まれる。

【結論】

本研究で著者は、ccRCCにおいてPLD2発現の亢進は腫瘍増殖や浸潤を促進し、患者の生命予後が不良であることを示した。また、PLD2-PA-ANGシグナルを介してccRCCの浸潤を促進することを初めて明らかにした。本研究の成果から、PLD2-PA-ANGシグナルが転移性腎癌に対する新規治療標的となることが示唆されている。

審査の結果の要旨

【批評】

本研究では腎癌の中で最も多い淡明型腎細胞癌組織においてPLD2発現が亢進すると、腫瘍増殖や癌の浸潤などの悪性度が高まることを示し、この機序としてPLD2-PA-ANGシグナルを介することを初めて証明した貴重な研究である。本研究の成果は、淡明型腎細胞癌の腫瘍進展様式を解明したことにとどまらず、新たな治療標的を示す臨床的にも有益な研究であることを示している。

平成31年2月19日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。