

# 論文内容要旨

## 論文題目

淡明細胞型腎細胞癌における代謝産物に基づいた分類の作成と治療標的代謝産物の探索

責任講座：腎泌尿器外科学講座

氏名：小澤迪喜

## 【内容要旨】(1,200字以内)

### 【背景】

淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) 細胞では、hypoxia-inducible factor (HIF) の蓄積と恒常的な活性化が生じる。また、Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が活性化している。HIF と mTOR は解糖系やアミノ酸代謝などの細胞内代謝などと密接に関係しており、ccRCC では細胞内代謝異常が存在すると推測される。

### 【目的】

ccRCC の臨床検体を用いてメタボローム解析を行い、転移症例に特徴的な代謝産物を見つけること。代謝物の観点から ccRCC を分類すること。ccRCC 細胞において mTOR が代謝産物に及ぼす影響を調べる。最後に治療標的となりうる代謝物を探索すること。

### 【方法】

外科的手術を受けた ccRCC52 症例の腫瘍部/正常部ペア検体を用いてメタボローム解析を行い、腫瘍/正常、グレード、転移の有無、それぞれについて比較した。次に、すべての検体で検出された 81 種の代謝産物を用いてクラスター解析を行った。クラスター解析の結果、理論上 mTOR の影響を受けると考えられるアミノ酸含有量に特徴的な所見があったため、腎癌細胞株に mTOR 阻害剤を添加し、メタボローム解析を行った。最後に、有転移症例で腫瘍部での含有量が増加していなかった代謝産物、 $\beta$ -アラニンについて、細胞シグナル伝達への影響を Western Blot 法、 $\beta$ -アラニンと各種腎癌治療薬剤併用による細胞活性を MTS アッセイ法にて検討した。腎癌細胞株 A498 皮下移植マウスを用いた  $\beta$ -アラニンと mTOR 阻害剤併用投与試験で、in vivo における腫瘍抑制効果を評価した。

### 【結果】

腫瘍部ではペントースリン酸経路とグルタミンに関連する代謝物が多く見られた。グルタミン以外のアミノ酸や多価不飽和脂肪酸は、腫瘍部で少なかった。高悪性度腫瘍では、乳酸が豊富で、グルタミンと脂肪酸は少なかった。転移症例の特徴として  $\beta$ -アラニンが同等もしくは低値、かつイノシトールが低値であることが挙げられた。症例は、解糖系代謝産物、脂肪酸、アミノ酸により 4 つのクラスターに分類された。 $\beta$ -アラニンは解糖系代謝産物と類似の分布を示し、イノシトールはアミノ酸と類似の分布を示していた。mTOR 阻害剤を投与すると、調べたすべての細胞株でアミノ酸とイノシトールが増加したのに対し、 $\beta$ -アラニンと脂肪酸は細胞株によって異なる挙動を示した。そこで、新規治療標的として  $\beta$ -アラニンに注目し検討を行った。ラパマイシンと  $\beta$ -アラニンの併用投与は、A498 ( $P = 0.013$ ) および 7860 ( $P < 0.001$ ) のいずれにおいても、ラパマイシン単独投与よりも強く細胞生存率を抑制した。マウスの投与試験でも、ラパマイシンと  $\beta$ -アラニンの併用療法はラパマイシン単独療法と比較して強い腫瘍縮小効果を示した ( $P = 0.049$ )。

【結論】 ccRCC は解糖系代謝産物、脂肪酸、アミノ酸により 4 つのクラスターに分類できる。 $\beta$ -アラニンはラパマイシンの抗腫瘍効果を高め、新規治療薬となる可能性がある。

令和 4 年 1 月 17 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 小澤 迪喜

論文題目： 淡明細胞型腎細胞癌における代謝産物に基づいた分類の作成と治療標的代謝産物の探索

審査委員：主審査委員

山口 浩 明



副審査委員

渡 辺 昌 文



副審査委員

小 原 祐 太 郎



審査終了日： 令和 4 年 1 月 5 日

### 【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) は、腎細胞癌の 70-80%を占める。ccRCC では、高率に低酸素誘導因子 (HIF) や mammalian target of rapamycin (mTOR) が亢進していることから、細胞内代謝の異常が存在すると推測されるが、ccRCC 間での代謝物プロファイルを比較した報告は限られている。そこで本研究では、ccRCC のメタボロミクス解析を行うことにより、転移症例に特徴的な代謝産物を見出すこと、ccRCC のメタボローム分類を構築すること、mTOR の代謝産物への影響を明らかにすること、ならびに ccRCC の治療標的を探索することを目的とした検討を行った。

ccRCC 患者から外科的に切除した腫瘍組織より代謝物を抽出し、トリメチルシリル化誘導体後に GC/MS にてメタボローム解析したところ、腫瘍部ではアミノ酸の低値が観察された。また、悪性度との関連性においては、高悪性度 ccRCC で乳酸が有意に上昇していた。非転移症例と転移症例の比較結果では、転移症例で腫瘍部の  $\beta$ -アラニンが正常部と同等か低値、かつイノシトールが低値であることが明らかとなった。クラスター分析の結果、解糖系代謝物、脂肪酸、タンパク質構成アミノ酸含量を指標とする metabolic subtype1~4 に分類することが可能であった。続いて、ccRCC 細胞株における mTOR 阻害によるメタボローム変化を観察した結果、検討した全ての細胞株でアミノ酸とイノシトールが増加した。また、A498 細胞および 786O 細胞において、 $\beta$ -アラニンは mTOR 阻害薬ラパマイシンによって誘発される細胞増殖抑制を増強することが示された。この条件において、 $\beta$ -アラニンが Akt や ERK のリン酸化を減少させることが確認された。腎癌細胞株 A498 皮下移植マウスモデルを用いた  $\beta$ -アラニン投与試験では、 $\beta$ -アラニンの忍容性を確認するとともに、ラパマイシン併用による腫瘍抑制効果が確認された。

以上本研究では、ccRCC のメタボローム解析より新規の ccRCC 分類を作成し、 $\beta$ -アラニンが ccRCC の新規治療薬となる可能性を明らかにした。

学位論文審査会においては、実験条件や条件設定理由に関する詳細の記述、また  $\beta$ -アラニンの細胞内濃度や取り込み機構に関する情報提示が必要であるとの指摘があった。しかしながら、本研究が新規の腎癌治療法開発に向けた有用な基礎的知見を含むものであることから、本研究が学位論文に値するとの結論を得た。