

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 三宅 益代

横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻 消化器・腫瘍外科学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科 脳神経外科学	主任教授	山本 哲哉
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 消化器内科学	主任教授	前田 慎
副査	横浜市立大学附属病院 病理診断科	准教授	山中 正二

Synergy of oral recombinant methioninase (rMETase) and 5-fluorouracil on poorly differentiated gastric cancer

(低分化型胃癌に対するフッ化ピリミジン薬治療における

メチオニン分解酵素の相乗効果の検証)

本論文は低分化型胃癌細胞株 (NUGC3, NUGC4, MKN45) およびヌードマウス MKN45 皮下腫瘍モデルを用いて、メチオニン制限や申請者の留学先 (AntiCancer Inc., San Diego, CA, USA) の研究室で開発された Recombinant L-methionine α -deamino- γ -mercaptomethane lyase (rMETase) の抗腫瘍効果に関する研究成果である。

rMETase の低分化型胃癌における腫瘍増殖抑制効果と細胞周期に与える影響の検討では、NUGC3, NUGC4, MKN45 に対する 5-FU の IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) はそれぞれ 1.18 ± 0.21 , 1.33 ± 0.22 , 2.21 ± 0.53 , rMETase の IC_{50} (units/ml) はそれぞれ 0.24 ± 0.05 , 0.19 ± 0.06 , 0.25 ± 0.07 であった。FUCCI イメージングでは、0.25 Units/ml, 0.5 Units/ml の 2 種類の rMETase 濃度で培養した MKN45 細胞の細胞周期は、通常の培養液で培養した群と比較すると培養 24 時間後、48 時間後ともに G0/G1 期から S/G2/M 期へ有意に細胞周期が誘導されていることが示された。

また、in vivo における rMETase の経口投与の有用性および 5-FU との相乗効果についての検討では、5-FU 群, rMETase 群は control 群に比して有意に腫瘍増殖を抑制した ($p = 0.044$, $p = 0.044$)。5-FU + rMETase 群は、5-FU 群, rMETase 群に比して有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ($p = 0.044$, $p = 0.044$)。組織学的には rMETase 群はコントロール群と腫瘍壊死領域に関して有意差は認めなかったが、5-FU 群はコントロール群に比して有意に腫瘍壊死領域が増加した ($p < 0.001$)。5-FU+rMETase 群はコントロール群, 5-FU 群に比して腫瘍壊死領域の有意な増加を認めた ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。免疫組織学的染色では、5-FU 群はコントロール群と Ki-67 発現細胞量に有意な差を認めなかったのに対し、5-FU + rMETase 群はコントロール群, 5-FU 群と比較して有意に Ki-67 陽性細胞数の減少を認めた ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。

審査にあたり，以上の論文内容の説明がなされた後，以下の質疑応答が行われた．

まず，山中副査より次の質問がなされた．

- ① rMETase の糖鎖修飾は行ったのか．
- ② 分化型と未分化型では作用機序が異なるのか．なぜ未分化型を研究対象としたのか．
- ③ 病理スライドが壊死を証明するのには不十分な写真である．

この質問に対して以下のように回答された．

- ① エンドトキシンを除去したのみで糖鎖修飾を行っていないが，PEG 化した rMETase の半減期が rMETase よりも長くなることは知られている．
- ② 分化型との比較は行っていない．新たな治療の開発が必要と考えられる，予後不良の低分化腺癌を研究対象として用いた．
- ③ ご指摘の通り，厳選された病理組織学写真を提示すべきであった，

次に，前田副査より次の質問がなされた．

- ① メチオニンの定量測定は可能か．メチオニン制限をした場合と rMETase を使用した場合ではどの程度メチオニン値に影響がでるのか．
- ② メチオニンがどの程度減るとどのような作用が起こるのか，どの程度メチオニンが分解されているのか．
- ③ メチオニン依存性は癌腫によってばらつきがあるのか．
- ④ 投与経路は経口だが，代謝経路はどのように考えられるか．
- ⑤ 免疫細胞との関係についてわかっていることはあるか．
- ⑥ メチオニンは癌細胞にのみ有用なのか，臨床使用で副作用はないのか．

この質問に対して以下のように回答が行われた．

- ① 定量は可能である．前立腺癌患者において，rMETase の投与で血清メチオニン濃度が 40%減少した報告がある．
- ② 詳細不明のため今後検証が必要である．
- ③ 同一癌腫ではほぼ同程度である．癌腫により多少の差はあるが，正常細胞に比べると腫瘍細胞の IC_{50} は低値である．
- ④ rMETase は経口投与した．rMETase は幅広い pH 環境に対応可能な土壌細菌の *P. putida* より産生されるため，rMETase は低 pH 環境でも失活しない耐酸性酵素である．経口摂取された rMETase は失活せずに腸管内に届き，そこで大幅にメチオニンを阻害すると考えられるが，機序は詳細不明でありさらなる検証が必要．
- ⑤ メチオニン制限により CD4 陽性 T 細胞における PD-1 発現が増加することが報告されている．

- ⑥ 腫瘍細胞治療濃度では正常細胞には作用しないことが確認されている。臨床使用例でも副作用は報告されていない。

次に、山本主査より以下の質問がなされた。

- ① 安全性データについて。
- ② メチオニン制限自体が癌を抑制しているのか、それともメチオニン制限することにより複合的な代謝の変化なのか。
- ③ メチオニン依存性は本当に同一癌腫で同定度なのか。vivo では血流環境などが変わるので vitro のように同一ではない可能性があるかどうか。
- ④ 胃癌の再発は正確に評価することができるのか。
- ⑤ 転移巣についても効果を発揮することを示すためにはどのような実験を行うべきか。
- ⑥ 悪性腫瘍に対する食事療法について、その本質は何か。
- ⑦ rMETase の吸収経路はどのように考えられるか。
- ⑧ 本研究においても腫瘍のメチオニン定量を行うべきであった。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- ① 臨床使用において、有害事象は報告されていない。
- ② メチオニンそのものが制限されることにより、腫瘍増殖抑制効果を発揮していると考えている。
- ③ vitro では IC_{50} は3種類の低分化型胃癌細胞株で同定度であったが、臨床使用では同一癌腫であっても環境要因により rMETase の効果に差が出る可能性はある。
- ④ CT や腹部エコーといった画像診断が有効で再発を早期に確認することが可能である。腹膜播種再発はとらえにくい場合もある。
- ⑤ 蛍光タンパクで標識した胃癌細胞株を用いて同所性異種移植モデルを作成し、対照群、治療群に分けて治療を行ったあと、全体をイメージングし転移の有無を確認・評価する。
- ⑥ 腫瘍細胞上は糖代謝、アミノ酸代謝においても正常細胞に比べてトランスポーターが過剰発現しており、双方が関係していると考えられる。また、小腸粘膜における腸管免疫の関与も考えられる。
- ⑦ rMETase は幅広い pH 環境に対応可能な土壌細菌の *P. putida* より産生されるため、rMETase は低 pH 環境でも失活しない耐酸性酵素である。経口摂取された rMETase は失活せずに腸管内に届き、そこで大幅にメチオニンを阻害すると考えられるが、機序は詳細不明でありさらなる検証が必要。
- ⑧ ご指摘の通り、メチオニン定量を行い、血清メチオニン値や腫瘍内メチオニン値の比較を行うべきであった。

以上のように各質問に対して適切な回答が行われた。

申請された学位論文は、peer review を経て学術誌 Biochemical and Biophysical Research Communications. 643 : 48-54, 2023 (IF 3.1)に掲載されている。研究で用いた rMETase は申請者の所属した研究室で開発されたため独自性が高く、これを用いた治療法の開発は一定の新規性を有する。また、この専門領域全般に対する俯瞰的理解が確認されており、さらに学位論文・原著論文の記載方法についての理解も、本研究への主体的な貢献も質疑応答の中で確認できている。以上のことから、審査員による協議の結果、本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された。