

学位論文の要旨

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)

March, 2024

(2024年3月)

Masuyo Miyake

三宅 益代

Department of Gastroenterological Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

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

(Doctoral Supervisor: Itaru Endo, Professor)

(指導教員: 遠藤 格 教授)

学位論文の要旨

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)

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.12.062>

1. 序論

本邦における胃癌の罹患率は高く、2016年度部位別がん死亡数においても第3位である。中でも低分化腺癌は急速に進行するため予後不良であり、従来の化学療法に加え、新たな治療戦略の開発が期待されている。メチオニンはタンパク質合成、DNAのメチル化およびポリアミン合成など、哺乳類代謝において多くの役割を担う必須アミノ酸である。多くのヒト悪性腫瘍細胞は正常細胞に比してメチオニン依存性が高く、その増殖にメチオニンを要する。(Stern and Hoffman, 1984)そのためメチオニン欠乏状態は、正常細胞の増殖に影響を及ぼさず、悪性腫瘍細胞にのみ腫瘍増殖能の低下をもたらすとされている。さらに、メチオニン制限は腫瘍増殖を抑制するのみならず、抗癌剤や放射線治療との相乗効果を認めることも報告されている(Gao et al., 2019)。近年、メチオニン制限は抗腫瘍免疫を活性化させることで免疫チェックポイント阻害薬との相乗効果を示すことも報告されており、新たな癌治療法として注目されつつある。当研究室ではメチオニン分解酵素を開発し、血中メチオニン濃度を低下させることで様々な悪性腫瘍細胞のアポトーシス誘導や、S期後期・G₂期における細胞周期の可逆的停止によって抗腫瘍効果を示すことを報告してきた(Tan Y et al., 1997; Yano et al., 2014a)。本研究では、メチオニン分解酵素の低分化型胃癌における細胞周期への影響や、腫瘍増殖抑制効果を *in vitro*, *in vivo* で検証する。

2. 実験材料と方法

3種類の低分化型胃癌細胞株 (NUGC3, NUGC4, MKN45) を用いて、5-fluorouracil (5-FU)、メチオニン分解酵素である recombinant methionase (rMETase) の細胞増殖阻害作用を *in vitro* で検証した。50%阻害濃度 (50% Inhibition Concentration; IC₅₀) の測定には Cell Counting Kit-8、マイクロプレートリーダーを使用した。また、細胞周期モニタリングベクターとして知られる FUCCI を導入した MKN45 細胞を用いて通常培養群、rMETase 群 (0.25 Units/ml, 0.5 Units/ml) の3群を作成し、培養24時間後、48時間後の細胞周期を共焦点

レーザー走査型生物顕微鏡 (FV1000) で観察し比較検討した。さらに MKN45 を生後 5 週のヌードマウスの右側腹部に皮下注射して皮下腫瘍モデルを作成し, control 群, 5-FU 群 (50mg/kg, 腹腔内投与, 週 1 回), rMETase 群 (50U/body, 経口投与, 2 回/日), 5-FU + rMETase 群 (5-FU: 50mg/kg, 腹腔内投与, 週 1 回, rMETase: 50U/body, 経口投与, 2 回/日) (各群 n = 6) に無作為割付し, 腫瘍増殖抑制効果を in vivo で検証した。腫瘍径, 体重は週 2 回, 3 週間測定し, 22 日目に全例犠牲死させた。また, 22 日目以前に推定腫瘍体積が 2000 cm³ を超えた場合も同様に犠牲死させた。さらに各群の切除検体を用いて腫瘍細胞壊死範囲の計測や, 免疫組織化学染色で Ki-67 発現を評価し比較検討した。

3. 結果

NUGC3, NUGC4, MKN45 に対する 5-FU の IC₅₀ (μg/ml) はそれぞれ 1.18 ± 0.21, 1.33 ± 0.22, 2.21 ± 0.53, rMETase の IC₅₀ (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 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。マウス皮下腫瘍モデルを用いた検討では 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)。

4. 考察

今回の結果から, rMETase によるメチオニン制限は低分化型胃癌の細胞周期を G₀/G₁ 期から S/G₂/M 期へと誘導し, 単剤でも細胞増殖を抑制することが示された。また, メチオニン制限により細胞周期が S/G₂/M 期へとシフトすることで, 単剤での抗腫瘍効果のみならず, 5-FU との相乗効果をもたらすことが示された。rMETase は単剤, 化学療法との併用ともに有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。rMETase を用いたメチオニン制限は近年, 様々な種類の悪性腫瘍に対して治療効果があることが明らかになった (Pokrovsky et al., 2023)。rMETase

の臨床での使用報告も増えていて、経口摂取の安全性、有効性の示されている。胃癌に対する rMETase の臨床使用の報告は未だないが、メチオニン非含有アミノ酸溶液を用いた臨床試験においてメチオニン制限の胃癌に対する有効性が示されている(田口ら, 1995)。rMETase は低分化型胃癌の新たな治療選択肢となる可能性が示唆された。

引用文献

Gao, X., Sanderson, S. M., Dai, Z., Reid, M. A., Cooper, D. E., Lu, M., Richie, J. P., Jr., Ciccarella, A., Calcagnotto, A., Mikhael, P. G., Mentch, S. J., Liu, J., Ables, G., Kirsch, D. G., Hsu, D. S., Nichenametla, S. N. and Locasale, J. W. (2019) 'Dietary methionine influences therapy in mouse cancer models and alters human metabolism', *Nature*, 572, 397-401.

Pokrovsky, V. S., Qoura, L. A., Demidova, E. A., Han, Q. and Hoffman, R. M. (2023) 'Targeting Methionine Addiction of Cancer Cells with Methioninase', *Biochemistry (Mosc)*, 88, 944-952.

Stern, P. H. and Hoffman, R. M. (1984) 'Elevated overall rates of transmethylation in cell lines from diverse human tumors', *In Vitro*, 20, 663-70.

田口鐵男, 神前五郎, 小野寺時夫, 遠藤光夫, 中川原儀さん, 佐野開さん, 貝原信明, 掛川暉夫, 中野重行, 栗原稔, 赤沢修吾, 太田潤, 北村正次, 五関謹秀, 徳永仰 (1995). 進行・再発胃癌に対する A0-90 (メチオニン欠如アミノ酸輸液) の後期第II相試験 (外科部会). *癌と化学療法* 22, 753-764.

Tan Y, Zavala J Sr, Han Q, Xu M, Sun X, Tan X, Tan X, Magana R, Geller J, Hoffman RM. (1997) Recombinant methioninase infusion reduces the biochemical endpoint of serum methionine with minimal toxicity in high-stage cancer patients, *Anticancer Res*, 17, 3857-60.

論文目録

I 主論文

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

Miyake, M., Miyake, K., Han, Q., Igarashi, K., Kawaguchi, K., Barangi, M., Kiyuna, T., Sugisawa, N., Higuchi, H., Oshiro, H., Zhang, Z., Razmjooei, S., Bouvet, M., Endo, I., Hoffman, R. M.:

Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 643, 48-54, 2023

II 副論文

なし

III 参考文献

なし