

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 山本 淳

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	耳鼻咽喉科・頭頸部外科学	教授	折館 伸彦
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	病態病理学	准教授	奥寺 康司
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	生化学	講師	仙石 徹

## Oral recombinant methioninase increases TRAIL receptor-2 expression to regress pancreatic cancer in combination with agonist tigatuzumab in an orthotopic mouse model

(経口 recombinant methioninase は膵癌同所移植マウスの TRAIL レセプター2  
の発現を増加させ、tigatuzumab との併用で腫瘍を縮小させる)

### 【背景・目的】

膵癌は最も予後不良な悪性腫瘍の一つである。進行膵癌に対しては化学療法が治療の中心となるが、その治療効果や選択肢は限定的であり、新たな治療法の開発が必要である。ヒト腫瘍細胞はその増殖にメチオニンを要し、正常細胞に比べてメチオニン依存性が高い (Hoffman and Erbe, 1976)。近年、遺伝子発現解析により、メチオニン制限が様々な癌における TNF 関連アポトーシス誘導リガンドレセプター2 (TRAIL-R2) の発現を増加させることが報告されているが (Kokkinakis et al., 2004; Strelakova et al., 2015)、膵癌における報告はない。本研究ではメチオニン制限が TRAIL-R2 の発現、および抗 TRAIL-R2 抗体である tigatuzumab の抗腫瘍効果に与える影響について解明することを目的とした。

### 【方法】

ヒト膵癌細胞株の MIA PaCa-2 と BxPC-3 をコントロールの培地とメチオニンフリーの培地でそれぞれ培養し、メチオニン制限が tigatuzumab のアポトーシス誘導効果に与える影響について *in vitro* で検証した。また、MIA PaCa-2、BxPC-3 およびヒト正常線維芽細胞である Hs27 を用いてメチオニン制限が TRAIL-R2 の発現に与える影響を *in vitro* で検証した。また RFP 発現 MIA PaCa-2 を用いて同所移植膵癌マウスモデルを作成し、メチオニン分解酵素である rMETase を用いて、メチオニン制限が腫瘍における TRAIL-R2 の発現および tigatuzumab の効果に与える影響を *in vivo* で検証した。

### 【結果】

メチオニン制限は *in vitro* で膵癌細胞における tigatuzumab の効果を増強し、カスパーゼ活性やアポトーシス誘導効果を増加させた。メチオニン制限は膵癌細胞における TRAIL-R2 の

発現を増加させた一方で、正常線維芽細胞における TRAIL-R2 の発現には影響を与えなかった。また TRAIL-R2 の発現を抑制する MAGED2 タンパクが、メチオニン制限により膵癌細胞で減少した一方、正常線維芽細胞では変化が見られなかった。膵癌細胞における MAGED2 mRNA の発現量は、メチオニン制限による変化は見られなかった。メチオニン制限同所移植膵癌マウスモデルでは、rMETase によるメチオニン制限は腫瘍の TRAIL-R2 の発現を増加させ、tigatuzumab によるアポトーシスを増強した。また rMETase と tigatuzumab の併用療法群のみで腫瘍の縮小を認めた。

#### 【考察】

今回の結果から、メチオニン制限は膵癌細胞特異的に TRAIL-R2 の発現を増加させることで、tigatuzumab のアポトーシス誘導効果を増強することが示唆された。TRAIL-R2 発現の増加は、メチオニン制限が MAGED2 mRNA の翻訳過程に影響を与え、MAGED2 タンパクの発現量が減少することで引き起こされる可能性が示唆された。

#### 【結語】

メチオニン制限は膵癌において TRAIL-R2 の発現を増加することで、抗 TRAIL-R2 療法の効果を増強した。

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，奥寺副査より次の質問がなされた．

- 1) MAGED2 が TRAIL-R2 を抑制する経路は一般的なのか．またそれを直接確認する実験は行なったのか．
- 2) マウスモデルはなぜ腫瘍片を用いたのか．

この質問に対して以下のように回答が行われた．

- 1) MAGED2 が TRAIL-R2 を抑制するというのは先行研究がある．また他の癌種ではあるが，MAGED2 をノックアウトすると TRAIL-R2 の発現が増加するという先行研究があるため，論文ではそれを引用し本研究ではそのような実験は行わなかった．
- 2) 同所移植を行うにあたり，細胞の膀胱への注射を行うと偶発的な腹膜播種などをきたす可能性があるため，直接腫瘍片を縫合固定した．

次に，仙石副査より次の質問がなされた．

- 1) メチオニン制限食とはどのようなものなのか．Methioninase がメチオニン制限食と比べて優れていると考えられる点は何か．
- 2) 経口の methioninase が血中メチオニンを減少させる機序は明らかになっているのか．
- 3) メチオニン制限が MAGED2 mRNA を減少させずタンパク発現を減少させた機序として，翻訳過程の影響を考える根拠は何か．

この質問に対して以下のように回答が行われた．

- 1) メチオニンは肉などの動物性タンパクに多く含まれており，メチオニン制限食はビーガン食に近い．メチオニン制限食は好みの問題ですべての人にとって受け入れられるわけではなく，酵素を用いたメチオニン制限の方が簡便で許容されうると考えている．
- 2) methioninase の経口投与後に血中の methioninase 活性を測定し，活性が見られなかったことから，methioninase は血中へ移行せず消化管でメチオニンを分解していると考えられる．胃酸による methioninase の分解や失活など消化管内での methioninase の安定性については今後検証する予定である．
- 3) MAGED2 mRNA の翻訳に関わる DDX21 という RNA ヘリカーゼに変異をきたすと TRAIL-R2 タンパクの発現が上昇したという報告があり，メチオニン制限がこの酵素に何らかの

影響をきたしている可能性が考えられるが，そのような関連を示唆する先行研究はなく今後の検討課題である。

次に，折館主査より以下の質問がなされた

- 1) ヒトでの健常者と癌患者の血中メチオニン濃度に違いがあるというデータはあるか。またそのような過去の報告はあるか。
- 2) メチオニン制限療法の臨床試験に関する報告はあるか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

1) 血中メチオニン濃度はルーチンで測定する項目ではなく，ヒト検体における健常者と癌患者の血中メチオニン濃度の違いは不明であり過去の報告もない。癌はメチオニンを多く使用する傾向にあるため，健常者と癌患者の間で血中メチオニン濃度に違いがあれば癌診断や治療効果のサロゲートマーカーになりうる可能性がある。

2) メチオニン制限療法に関する臨床試験の報告はこれまでになく，現時点で進行中の臨床試験も確認できなかった。メチオニンは必須アミノ酸であり，まずは安全性の確認が重要であると考えられる。

以上のように各質問に対して，適切な回答がなされた。本研究によって，経口 methioninase は腭癌同所移植マウスの TRAIL レセプター2 の発現を増加させ，tugatuzumab との併用で腫瘍を縮小させる可能性が示唆され，当該分野の今後の研究に寄与するものと考えられた。申請者は質疑応答に対して的確に返答し，本課題について深い理解を持って研究を遂行したことを証明した。以上より本研究は博士(医学)の学位論文に値するものと判断した。