

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 59 / 号		学位申請者	黒島 和樹
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査	武田 泰生
	副査	谷口 昇	副査	大塚 隆生
<p>主査および副査の5名は、令和2年10月12日、学位申請者 黒島和樹 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) mTORC2 から AKT へのシグナル伝達はいつ頃報告されたのか。Temsirolimus に耐性を持つのはこれが原因か。 (回答) 2005 年には Sarbasov らにより報告されており、mTORC2 の AKT のリン酸化を介した下流へのシグナルが耐性の原因である可能性がある。</p> <p>質問2) Temsirolimus や Rapalink-1 の細胞毒性に関してはどうか。薬剤の有効血中濃度に差はあるのか。 (回答) 今回の in vivo 実験において、Temsirolimus 群と比較し、Rapalink-1 群はマウスの体重減少は顕著であった。Rapalink-1 の正常細胞への細胞毒性は強く、有効血中濃度は差があると思われる。</p> <p>質問3) Rapalink-1 は mTORC1/2 両方を阻害することから、細胞毒性が強くなることが予測される。よって Temsirolimus との比較にて血中濃度は低く保たなければならないのではないのか。 (回答) Rapalink-1 の細胞毒性を考慮すると Temsirolimus との比較にて血中濃度を低く保たなければならない可能性はあった。今回の実験では検証できていない。</p> <p>質問4) がん細胞のメタボリックリプログラミングについてどのように理解されているか。 (回答) がん細胞は正常細胞とは異なり、低酸素状態に適応する能力を獲得している。Warburg 効果として知られるように、酸化的リン酸化による ATP 産生を抑制し、解糖系による ATP 産生を促進している。</p> <p>質問5) Western blotting (WB) について、癌細胞株ではない正常細胞では、無刺激の状態でも AKT のリン酸化は増加しているものか。 (回答) 今回の実験では正常細胞での WB 評価はしていないが、使用した p-AKT 抗体の添付資料において、正常細胞 NIH3T3 は無刺激では p-AKT のバンドを示さない。</p> <p>質問6) apoptosis・cell cycle に関して Rapalink-1 投与で p53 が増加するのか。 (回答) AKT の標的である MDM2 のリン酸化が p53 のユビキチン化および分解を促進することが知られている。その為、Rapalink-1 によって mTORC2 を阻害すると p53 の安定化が促進される可能性があるが、今回の実験では検証できていない。</p> <p>質問7) in vivo で薬剤投与群の摘出腫瘍の赤みが薄いのはどうしてか。Apoptosis を起こしているからなのか。 (回答) mTOR の阻害によって HIF や VEGF の発現抑制につながり、apoptosis 誘導によって血管新生が抑制されたことが示唆される。両薬剤には直接の抗腫瘍効果に加えて血管新生抑制効果があると思われる。</p> <p>質問8) Rapalink-1 と HIF2α の関係についてはどうか。 (回答) HIF1α の発現は mTORC1/2 の両方によって調節されるが、HIF2α は mTORC2 によってのみ調節される。腎癌の成長は HIF2α によって促進されることが多く、Rapalink-1 による mTORC1/2 の両方の阻害は HIF1α/2α の両方の発現抑制につながる。</p> <p>質問9) Sunitinib 耐性腎癌細胞株と親株でどういった遺伝子の発現の違いがあるのか。 (回答) 以前行った親細胞と Sunitinib 耐性株の遺伝子プロファイルでは、Sunitinib 耐性株において、癌の遊走転移を促す CXCR4、VEGF ファミリーの1つである PGF、発癌性の機能をもつ FAM43A などの発現亢進を認めた。</p> <p>質問10) 薬剤投与による mTORC2 の下流の遺伝子の発現はどうであったか。 (回答) mTORC2 の下流標的遺伝子において代表的なものとして AKT、SGK1、NDRG1、PKCα が挙げられるが、今回の実験以外でも文献上、Rapamycin と異なり Rapalink-1 は AKT、SGK1、NDRG1 のリン酸化を抑制している。</p> <p>質問11) mTORC2 からの AKT へのシグナルがあっても、Temsirolimus のように下流の mTORC1 を阻害すれば効果があると思われるが、Sunitinib 耐性株でも Rapalink-1 がより優れた抗腫瘍効果を示すのは何故か。 (回答) Temsirolimus は Rapalink-1 と異なり、mTORC1 の下流の 4EBP1 のリン酸化抑制効果は弱くシグナル抑制効果としては不十分である。また、Sunitinib の長期投与により、PTEN 発現が抑制されることで mTOR シグナルが活性化するが、Rapalink-1 は mTOR シグナル上の mTORC1 より上流の AKT のリン酸化を抑制するため、下流へのシグナルを効率的に阻害できるものと思われる。</p> <p>質問12) Sunitinib 耐性化の機序に mTOR 以外の経路を介している可能性はないのか。 (回答) adrenomedullin や ERK/MAPK が発現上昇しているという報告があり、mTOR 以外のシグナルの活性化が Sunitinib 耐性化に寄与している可能性がある。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 13) 第 2 世代 mTOR 阻害剤である MLN0128 は製品化されているのか。

(回答) 現在 clinical trial の phase 2 の段階であり、まだ実臨床では使用に至っていない。

質問 14) 両薬剤の投与に関して、濃度比較の量を決めた根拠は何か。

(回答) 最初に両薬剤 0-1,000nM で濃度比較投与し、細胞増殖能を XTT assay にて検証した。今回の実験では同濃度比較を行うこととしたため有意差のついた 100 nM で各種機能解析を行った。

質問 15) Temsirolimus の濃度を上げると Rapalink-1 と同様の結果が出る可能性があるのではないか。

(回答) Temsirolimus の濃度を上げれば Rapalink-1 と同様の結果が出る可能性はあるが、生体内への細胞毒性を考慮した上でのさらなる検証が必要と思われる。

質問 16) Sunitinib と Temsirolimus と Rapamycin の薬剤の違いは何か。

(回答) Sunitinib は VEGFR, PDGFR, KIT などの multiple tyrosine kinase 阻害剤である。Rapamycin は PI3K/AKT/mTOR シグナルの mTOR 阻害剤であり、Temsirolimus はその Rapamycin の誘導体である。

質問 17) Rapalink-1 が第 3 世代 mTOR 阻害剤という理由は何か。

(回答) 第 1 世代 mTOR 阻害薬とされる Rapamycin と、第 2 世代 mTOR 阻害薬とされる mTOR kinase 阻害薬 MLN0128 を結合させた薬剤が、第 3 世代の Rapalink-1 である。

質問 18) 本実験では第 2 世代 mTOR 阻害薬は扱っていないが、効果についてどのように報告されているのか。

(回答) 第 1 世代 mTOR 阻害剤 Rapamycin との比較で、第 2 世代 mTOR 阻害剤が腫瘍増殖を有意に抑制することを検証した報告を多数認める。

質問 19) Rapalink-1 の他癌腫への効果はどのように報告されているのか。

(回答) FRB ドメイン・kinase ドメインの二重変異 mTOR を発現させた乳癌細胞において従来の mTOR 阻害剤と比較して有意に抗腫瘍効果を認めた報告や、膠芽腫において FKBP12 に対する親和性が高く mTOR 阻害効果が永続的に継続するという報告を認める。

質問 20) Rapalink-1 の人への有害事象は報告されているのか。動物実験に関してはどうか。

(回答) Rapalink-1 はまだ clinical trial には進んでいないため有害事象に関しては不明である。動物実験に関しては、引用文献において、Rapalink-1 群は vehicle 群や Rapamycin 群と比較し、体重や血算・生化学採血で有意差を認めなかった。一方、当実験では Rapalink-1 群は他群と比較し体重が減少しており、細胞毒性が強い印象を受けた。

質問 21) mTORC1 と mTORC2 は種を超えて存在するのか。mTORC1 と mTORC2 とで相互作用はあるのか。

(回答) TOR は酵母からほ乳類、藻類・植物など真核生物に広く認める。その複合体である TORC1 は真核生物に広く認めるが、TORC2 は藻類・植物には存在しないとされている。mTORC2 と AKT の関係性により、mTORC2 を抑制すると AKT 下流の mTORC1 も抑制される。mTORC1 は、p70S6K や Grb10 を介して、IRS1 や PI3K の活性を阻害することで mTORC2 の活性を抑制するという報告もある。

質問 22) Sunitinib 耐性株と親株で機能解析の結果は似ているため、Sunitinib 耐性株を使った意味がないように思えるが、それに関してどう考えているのか。

(回答) 実臨床では Sunitinib 耐性の腎癌患者に Temsirolimus を投与しても治療効果は乏しく、全生存期間を延長しないという事実があるため、今回の実験で Temsirolimus をコントロールとして用いた。ご指摘の通り、Sunitinib 耐性株と親株の機能解析の結果は似ているが、Rapalink-1 は Sunitinib 耐性株においても Temsirolimus と比べてより強い抗腫瘍抑制効果を示しており、Sunitinib 耐性への新たな治療選択肢としての可能性があることを示唆している。

質問 23) Rapalink-1 のように第 1 世代の Rapamycin と第 2 世代 mTOR kinase 阻害剤を結合させなくても、第 2 世代単独でも十分効くのではないか。

(回答) mTOR の kinase ドメイン変異が起こると mTOR kinase 阻害剤に耐性をもつが、このドメイン変異は mTOR kinase 阻害薬による治療歴のない癌患者にも存在することが報告されている。この変異に対しては Rapamycin に感受性を示すが、治療開始後に mTOR の FRB ドメインに耐性変異が生じると第 1 世代と第 2 世代の両薬剤に対して耐性を獲得してしまう。

質問 24) 実験で使用した細胞株の VHL や p53 などの変異等のバックグラウンドの違いはあるのか。

(回答) 他の論文にて、786-o・A498・Caki1 は VHL 変異あり、ACHN・Caki2 は VHL 変異を認めていないことが報告されている。p53 はいずれの細胞株でも変異は認められていない。

質問 25) pathway 解析にて Rapalink-1 による ABC transporter の発現抑制を挙げている。抑制された遺伝子からすると evidence は低いと思われるがどう考えているのか。

(回答) 今回挙げた遺伝子とは相違があるが、Rapamycin 単独で ABC transporter の一部を発現抑制するという報告はあり、Rapamycin と mTOR kinase 阻害剤を結合させた Rapalink-1 の発現抑制効果は同等以上である可能性が予想される。今後さらなる検証が必要である。

質問 26) 最近、Cabozantinib が発売されているが、この薬剤との併用はどうか。

(回答) Rapalink-1 単独でも生体毒性は高く、至適濃度に関してもまだ検証の余地があり、他の新規治療薬との併用に関しては、今後もさらなる研究が必要である。

質問 27) 第二世代の mTOR kinase 阻害剤の clinical trial が止まっている理由は何か。

(回答) 転移性腎癌患者に対する MLN0128 の Everolimus との比較実験は 2020 年 3 月に終了し、解析結果待ちである。他の癌腫においても未完または解析結果待ちである。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。