

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 687 号		学位申請者	川上 一誠
審査委員	主査	大塚 隆生	学位	博士 (医学)
	副査	井上 博雅	副査	橋口 照人
	副査	西尾 善彦	副査	家人 里志

主査および副査の5名は、令和4年12月16日、学位申請者 川上 一誠君に面接し、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。

質問1) 阻害薬を使った際の腎でのアミノ酸の再吸収はどうか。

(回答) 腎でのアミノ酸の再吸収の評価は、尿の採取が必要でありマウスでの検討は難しいと考えられる。

質問2) *SLC1A5*は正常組織の中でも脂肪組織での発現が特に高いが、実際に阻害剤を投与した場合の脂肪組織への影響はどうか。

(回答) 阻害剤を投与したマウスにおいて認められた体重減少が、脂肪組織の減少によるものである可能性は十分考えられ、今後評価を検討したい。

質問3) 正常な腎細胞株において *SLC1A5* をノックダウンもしくは阻害した場合どうなるか。

(回答) 正常な腎細胞株においても *SLC1A5* の発現を認めるため、細胞増殖が抑制される可能性があり今後評価を行いたい。

質問4) グルタミン代謝がどのように細胞老化に関わるか。

(回答) グルタミンの取り込みが阻害されると下流のグルタチオンが低下し、ROSが蓄積する。ROSの上昇により p21 (p53 経路) が活性化され、細胞老化が誘導されると考えている。

質問5) in vivo において、*SLC1A5* の発現が低い細胞株を用いた場合、今回の結果と比較してどうなるか。

(回答) *SLC1A5* の発現が高い細胞株と比較すると、阻害剤の効果が限定的になる可能性が考えられ、今後比較を検討したい。

質問6) *SLC1A5* を過剰発現させた場合どうなるか検証したか、または報告があるか。

(回答) *SLC1A5* を過剰発現させた実験は行っておらず、そのような報告も認めなかったが、過去にグルタミンの多寡での検証は行われており、グルタミンが多い状況で癌細胞が増殖することが報告されている。

質問7) 細胞老化を論じる際に、p21 を介在した細胞老化、p53 を介在した細胞老化と区別されるものか。

(回答) p21 は p53 シグナルの下流因子であり、細胞老化において p21 を介することは p53 を介することと同義であるため区別されないと考えられる。

質問8) 淡明型腎細胞癌の半分以上で認められる VHL 遺伝子の変異は他の癌種でも認められるか。

(回答) 悪性腫瘍としては淡明型腎細胞癌以外で膵臓の神経内分泌腫瘍の一部が報告されている。

質問9) 各細胞株における阻害剤の IC50 を求める際にどのように細胞生存率を評価したか。

(回答) XTT アッセイを用いてマイクロプレートリーダーで吸光度 (生細胞数) を測定することで IC50 を評価した。

質問10) 遊走、浸潤における代表的な因子は何か。

(回答) 遊走においては、細胞接着因子であるインテグリン、細胞遊走因子であるケモカイン、アクチン-ミオシン複合体 (アクトミオシン) など、浸潤においては細胞内低分子重量 G 蛋白質である Rac1, Rho や Cdc 42 などが報告されている。

質問11) Western Blot において p21/waf1 と記載されているが、waf1 とは何か。

(回答) p21, waf1 はヒト6番染色体 (6p21.2) に位置する *CDKN1A* 遺伝子にコードされる同一のタンパク質であり、waf1 は p21 の別名である。

質問12) 尿細管由来である淡明型腎細胞癌はエネルギー産生にグルコースではなくグルタミンを使用しているか。

(回答) 淡明型腎細胞癌でも多くの癌と同様に ATP 産生を好気性解糖に依存している。グルタミンはエネルギー源としてよりも細胞内の ROS を中和するために供給されていることが報告されている。

質問 13) 淡明型腎細胞癌の細胞株において培地のグルコース濃度を変化させるとどうなるか。

(回答) 低濃度グルコース下では上記とは逆にグルタミンはエネルギー源として利用されると予想するが、本実験では評価していない。

質問 14) グルタミン取り込みの阻害によってグルタチオンが減少し、ROS が上昇することで細胞生存率が低下することを証明するのならば、グルタチオンを入れ戻すことで細胞生存率が回復することを確認した方が良いのではないか。

(回答) 本実験では評価していない。今後の研究課題とさせていただきたい。

質問 15) 細胞に極性を持たせることで *SLC1A5* の発現を変化させることは可能か。

(回答) 細胞の癌化により極性が失われることが報告されており、癌細胞に極性を持たせることが可能かは調べた限り不明であった。

質問 16) *SLC1A5* はグルタミンの取り込みを血液から行っているか、尿から行っているか。

(回答) マウスでの阻害剤の腹腔内投与で抗腫瘍効果が得られたことから、尿ではなく血液から取り込みを行っていると考えられる。

質問 17) 正常細胞と癌細胞では阻害剤が効果を示す濃度が異なるか。

(回答) HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞) での IC50 が $9.6 \mu\text{M}$ であったのに対し、今回使用した A498 および Caki1 細胞における IC50 が 17.7 および $24.6 \mu\text{M}$ であったことを考慮すると、正常細胞においてより低い濃度で効果を示すと考えられる。

質問 18) 泌尿器科領域以外での他癌種における *SLC1A5* の発現のデータはあるか。

(回答) 肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌など様々な癌種で *SLC1A5* の発現が増強していることが報告されている。

質問 19) 淡明型腎細胞癌以外の腎癌 (ペリニ管癌、透析腎癌) ではどうか。

(回答) 今回淡明型腎細胞癌のみの評価しか行っておらず、今後の研究課題とさせていただきたい。

質問 20) 小児の腎癌における *SLC1A5* に関する報告はあるか。

(回答) 今のところ小児の腎癌において *SLC1A5* に関する報告はなされていない。

質問 21) *in vivo* において阻害剤の投与で腫瘍を消失させることは可能か。

(回答) 今回用いた阻害剤の治療有効域が狭いことと、腫瘍がヘテロな集団である事を考えると本薬剤だけの根治は難しく、他の薬剤や免疫チェックポイント阻害剤などの併用療法が可能性を上げると考える。

質問 22) 生体で予想される副作用はどうか。

(回答) これまでに生体における阻害剤投与での副作用の詳細は報告されていない。*SLC1A5* の発現が高い臓器における副作用が予想され、脂肪組織での発現が最も高いことや、マウスにおいて有意な体重減少を認めたことから、体重減少を来す可能性が考えられる。

質問 23) 糖代謝と腎癌の報告はあるか。

(回答) 正常な腎臓組織と比較して腎癌においては、解糖系上のグルコース輸送体 1 (GLUT-1) やヘキソキナーゼ 2 (HK2) の発現が有意に増加することを我々の教室から報告している。

質問 24) グルタミンがアミノ酸の中でも最も重要度が高いか。

(回答) グルタミン以外のアミノ酸の評価を行っていない。今後の研究課題とさせていただきたい。

質問 25) *SLC1A5* はグルタミン以外にも取り込むか。

(回答) グルタミン以外にアラニン、セリン、システイン、スレオニン、アスパラギンの取り込みにも関与することが分かっている。

質問 26) 全生存期間のグラフにおいて *SLC1A5* の高発現群、低発現群をどのように分けているか。正常組織での *SLC1A5* の発現を基準に高発現、低発現と分けた方が良いのではないか。

(回答) *SLC1A5* の発現の中央値で分けている。正常組織での *SLC1A5* の発現を基準に再検討したい。

質問 27) 老化細胞の評価を行う際により長期間観察した方が良いのではないか。また、細胞形態の変化も確認した方が良いのではないか。老化細胞ではカスパーゼ 3 やカスパーゼ 7 が欠落していることが多いため、その評価も行った方が良い。

(回答) 短期間での染色のみの評価であり、今後の研究課題とさせていただきたい。

質問 28) VHL 遺伝子異常で起こる腫瘍に共通した特徴はあるか。

(回答) 血管新生因子である HIF を誘導する蛋白の過剰蓄積が腫瘍形成の原因とされており、腫瘍は血管が豊富で、多発・再発しやすい特徴があると報告されている。

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。