

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16814

研究課題名（和文）メタボローム解析の結果から考える淡明細胞型腎癌に対する新規治療戦略の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy for clear cell renal cancer based on metabolome analysis

研究代表者

小澤 迪喜（Ozawa, Michinobu）

山形大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10637218

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：βアラニン単独、およびラパマイシンとの併用で腎癌細胞株に添加し細胞活性を見たところ、βアラニン単独では細胞活性への影響は見られなかったが、ラパマイシンとの併用でラパマイシンの効果を増強することを確認した。

βアラニンによりERKやAktのリン酸化抑制が確認され、βアラニンの作用機序の一つとして、ERK経路やAkt経路への影響があることが推察された。

βアラニンとmTOR阻害剤によるin vitroの効果がin vivoで確認できるか検討するため、ヒト腎癌細胞株A498をヌードマウスに皮下移植し検討したところ、ラパマイシン単独よりも併用において腫瘍縮小効果が強いことが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌薬物療法においてmTOR阻害剤は保険承認を受けている薬剤ではあるが、その効果は限定的で、現在では使用頻度が減っている。ラパマイシンの効果を増強する手段として、サプリメントとして投与可能かつ有害性の報告がないβアラニンを同時併用することにより、ラパマイシンの効果を増強させる可能性があり、臨床応用の前段階として、価値のある研究結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：β-alanine enhanced the cell viability inhibition effect of mTOR inhibitor rapamycin renal cancer cell lines, although β-alanine alone did not suppress cell viability.

β-alanine was found to inhibit the phosphorylation of ERK and Akt, suggesting that one of the mechanisms of action of β-alanine involves its influence on the ERK and Akt pathways.

To investigate whether the in vitro effects of β-alanine and mTOR inhibitors could be confirmed in vivo, human renal cancer cell line A498 was subcutaneously transplanted into nude mice. It was observed that the combination treatment resulted in stronger tumor shrinkage effects compared to rapamycin alone.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎癌 βアラニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

淡明細胞型腎癌の共通した遺伝子異常として *VHL* 遺伝子の不活化がある。*VHL* 蛋白の機能は種々の分子をポリユビキチン化することにより、プロテアソーム輸送を促し、分解誘導することにあるが、*VHL* が作用する代表的な分子として低酸素誘導因子 (HIF) がある。HIF は主に転写調節を介して細胞内代謝に作用する。淡明細胞型腎癌は遺伝子レベルの機序により HIF を蓄積しており、腎癌組織内の代謝産物を測定することにより、腎癌の薬物治療への応用、薬物治療の補助療法、薬物治療予測マーカーの開発につながると考えた。

以上の考えのもとに、我々は摘出腎癌組織の正常部および腫瘍部についてメタボローム解析を行ったところ、有転移症例の特徴として、摘出腎癌組織部で β アラニン含有量が多くなく(正常部分と同等か少ない)、イノシトール含有量が少ない、という知見が得られた。

2. 研究の目的

β アラニン、イノシトールが腎癌に対して起こす影響を調べることにより、これらの接種が腎癌治療への応用が可能となる可能性があるか探索すること。

薬物治療の効果を予測する代謝産物がないか探索すること(当初の予定ではなかったが、研究開始後に探索を行った)。

3. 研究の方法

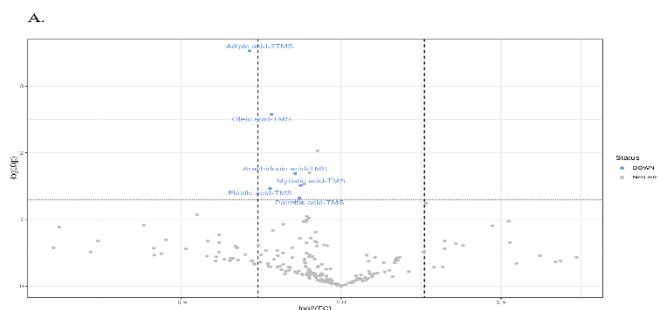
に関して メタボローム解析を行った症例のうち、薬物治療(チロシンキナーゼ阻害剤[TKI]、免疫チェックポイント阻害剤[ICI]、ニボルマブ/ピリマブ併用療法[NI])を行った症例について、縮小を認めた症例(responder)と認めなかった症例(non-responder)に群分けし、代謝物に関して Volcano plot で表示し、responder もしくは non-responder に特徴的な代謝物を同定する。

に関して 淡明細胞型腎癌細胞株に mTOR 阻害剤ラパマイシンを添加し、 β アラニン、イノシトールの推移を計測。ラパマイシンと β アラニンを併用しその併用効果を MTS アッセイで観察。シグナル伝達に対する影響をウェスタンブロット法で観察。ヒト淡明細胞型腎癌細胞株 A498 皮下移植ヌードマウスモデルを用いて、ラパマイシンと β アラニンの併用効果について検討

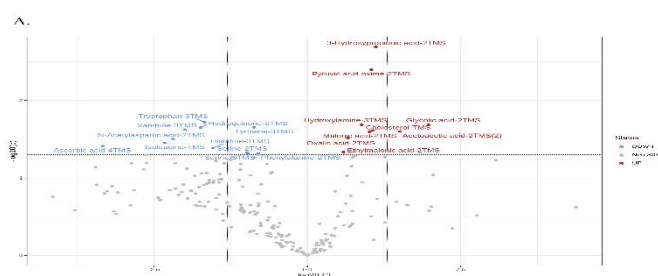
4. 研究成果

に関して

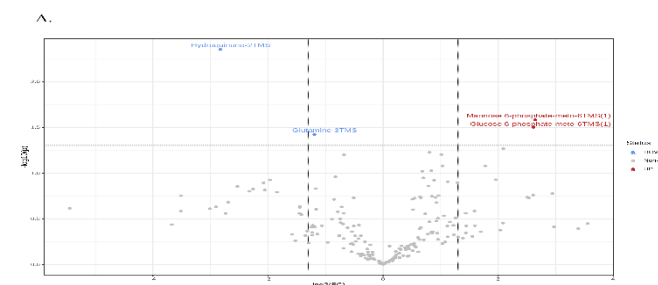
(1) TKI に効果を示した群では、腎癌腫瘍内の脂肪酸 (Oleic acid、Arachidonic acid、Myristic acid、Elaidic acid、Palmitic acid) 含有が少ない傾向が見られた(右図)。



(2) ICI に効果を示した群では、腎癌腫瘍内のアミノ酸 (Tryptophan、Xanthine、Hydroquinone、Tyrosine、Histidine、Isoleucine、Histidine、Serine、Phenylalanine) 含有が少ない傾向が見られた(右図)。



(3) NI に効果を示した群では腎癌腫瘍内のグルタミン含有量が少なく、小胞体ストレスマーカーとされるグルコース 6 リン酸やマンノース 6 リン酸含有が多い傾向が見られた(右図)。



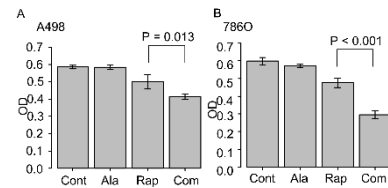
に関して

(1) ヒト淡明細胞型腎癌細胞株 A498、786O、769P、A704 にラパマイシンを添加し、ラパマイシン添加前と添加 8 時間後の細胞株についてメタボローム解析を行ったところ、アミノ酸全般の増加、イノシトールの増加を認めた。一方、βアラニンは細胞株によって増減は様々であった(右図: log(ラパマイシン添加後/添加前))。

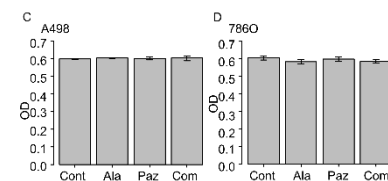
Fig 10

metabolite	786O	A704	A498	769P
Glucose-meto-5TMS(1)	1.054392	-0.24895	2.079520	-0.02116
Lactic acid 2TMS	0.082822	0.1559	0.531576	0.067308
β-alanine-3TMS	0.08928	-0.33217	0.581894	-0.51036
Caproic acid-TMS	1.062599	-0.08255	1.001651	0.286508
Myristic acid-TMS	0.721352	-0.18889	1.384622	0.337501
Nonanoic acid-TMS	1.069885	-0.05481	1.025027	0.301683
Octanoic acid-TMS	1.047378	-0.03088	0.962778	0.138
Decanoic acid-TMS	1.110283	0.037022	1.088627	0.33873
Lauroic acid-TMS	0.854581	0.090436	1.273367	0.482178
Stearic acid-TMS	1.083259	-0.29628	1.271586	0.07244
Margaric acid-TMS	1.060186	-0.28012	1.243541	-0.24823
Palmitic acid-TMS	0.860712	-0.30118	1.218259	-0.05516
Arachidonic acid-TMS	1.160348	-0.25835	1.280019	0.409838
Elaidic acid-TMS	0.913319	-0.27156	1.516276	-0.15316
Oleic acid-TMS	1.042579	-0.35044	1.477553	-0.11034
Linoleic acid-TMS	0.990707	-0.38441	1.489607	0.170743
Palmitoleic acid-TMS	0.703025	-0.28519	1.542995	-0.18829
Eicosapentaenoic acid-TMS	1.015965	-0.12304	1.331156	0.585684
Glycine-2TMS	3.034997	1.756663	1.245468	1.393652
Glycine-3TMS	1.610944	0.327504	1.06381	0.561021
Asparagine-3TMS	1.707883	0.475357	1.200324	1.37266
Cysteine-3TMS	0.860979	0.481313	0.831327	0.35291
Serine-2TMS	1.834642	0.271984	1.322387	1.313147
Serine-3TMS	2.000372	0.310278	1.244014	1.280432
Threonine-3TMS	1.785869	0.273492	1.198934	1.111318
Tyrosine-3TMS	1.656414	0.204113	1.121382	0.810169
Proline-2TMS	0.967848	0.124764	0.951916	0.765043
Valine-2TMS	1.612996	0.078942	1.174724	0.661319
Leucine-2TMS	1.661165	0.096899	1.106485	0.803679
Isoleucine-2TMS	1.611561	0.106188	1.103061	0.785332
Phenylalanine-2TMS	1.662117	0.060307	1.115114	0.823476
Alanine-2TMS	1.610557	0.389408	1.118895	1.047773
Glutaric acid-2TMS	0.567486	-0.21586	1.275582	0.104317
Lysine-4TMS	1.420551	-0.10388	1.613514	0.251368
Inositol-8TMS(2)	0.991024	0.226274	1.111971	0.297717

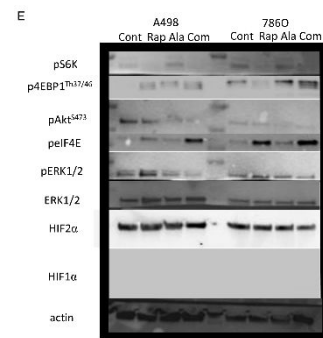
(2) A498、786O にラパマイシン、βアラニン、両者添加し、MTS アッセイで 48 時間後に細胞活性を測定。両細胞株でβアラニン単剤では細胞活性への影響は見られなかったが、ラパマイシンと併用することにより、その細胞増殖抑制効果を増強していた(右図)。



(3) 同様に腎癌治療に使用される血管内皮細胞増殖因子受容体阻害作用をもつ TKI パゾパニブとβアラニン併用効果を検討したが、パゾパニブ、および併用により細胞増殖抑制効果は認めなかった(右図)。

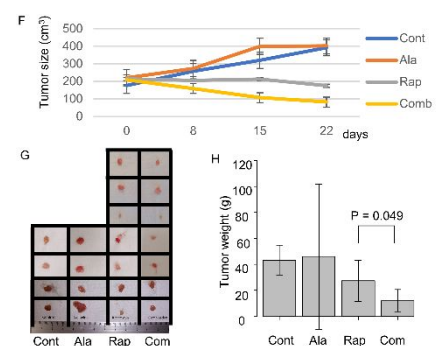


(4) βアラニンによるラパマイシン効果増強の機序を解明するため、既報でβアラニンが関与すると報告がらうシグナル伝達経路、および分子についてウェスタンブロット法で検討したところ、βアラニンにより mTORC2 を制御するとされる AktS473 や ERK1/2 のリン酸化低下がみられた。一方、低酸素誘導因子の発現は影響がなかった(右図)。



(5) ノードマウスに A498 細胞株を皮下移植し、4 群にわけ、コントロール、βアラニン経口投与(5 g/kg of body)、ラパマイシン腹腔内投与(20 mg/kg of body)、併用療法を行った。βアラニン単剤ではコントロールとさを認めなかったが、ラパマイシンでは腫瘍進行を抑制、併用群では縮小効果を認めた。

投与 3 週後、腫瘍摘出重量を書くにしたところ、ラパマイシン単独と比較して、併用療法群で重量が軽かった(P = 0.049)。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------