

氏 名	澤 口 武 尊
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 718 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 18 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	神経膠芽腫における BBOX1 を介した腫瘍増殖に関する代謝調節機構の研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 五味 玲 (委 員) 教授 仁木 利郎 講師 唐澤 直義 (委 員) 教授 武田 憲彦

論文内容の要旨

1 研究目的

多形性神経膠芽腫（GBM）は侵攻性の高い脳腫瘍であり、最も致死率の高いヒト腫瘍のひとつである。現在使われている標準治療を受けた GBM 患者でも全生存期間の中央値が 12～15 ヶ月と予後不良であるため、より強力な治療戦略の確立が望まれている。代謝リプログラミングは、脳腫瘍を含む多くの腫瘍で認められることから、GBM における共通のがん代謝パターンを明らかにすることは、新たな治療標的の探索につながる可能性がある。

生体内でのカルニチンの重要な役割の一つは、カルニチンシャトルにより長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に輸送することである。ミトコンドリア内に輸送された長鎖脂肪酸は、主に脂肪酸酸化（ β 酸化）を受け、エネルギー産生に使用される。

イソクエン酸脱水素酵素 1/2（IDH1/2）に変異を持つ脳腫瘍患者の生存期間は、野生型 IDH1/2 を持つ脳腫瘍患者の生存期間よりも有意に長く、予後良好である。当研究室では以前、脳腫瘍サンプルのメタボローム解析を行い、IDH1 に変異を持つ脳腫瘍サンプルでは、野生型 IDH1 を持つ脳腫瘍サンプルと比較して、カルニチンとアシルカルニチンが有意に減少していることを報告した。変異型 IDH1/2 は、 α -ケトグルタル酸（ α -KG）から 2-ヒドロキシグルタル酸（2-HG）を生成する。2-HG は、 α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ群の 1 つであり、カルニチン生合成経路の律速酵素である γ -ブチロバタインジオキシゲナーゼ（BBOX1）を阻害する。以上より、2-HG の腫瘍抑制作用における鍵酵素はカルニチン合成系の最終酵素である BBOX1 であることが示唆される。本研究では、IDH を有する GBM に対する BBOX1 野生型阻害を治療標的とすることへの妥当性を検証することを目的とした。

2 研究方法

本研究では野生型 IDH を有するヒト神経膠腫細胞株 U87MG および LN229 をモデル細胞として使用した。まずゲノム編集技術を用いて BBOX1 遺伝子を欠失した細胞株（BBOX1-KO）と CAG プロモーター制御下に BBOX1 を過剰発現する細胞株（BBOX1-OE）を作製した。これらの細胞株を用いて通常のカルニチン含有ウシ胎児血清（FBS）を用いた培養条件下で細胞増殖能を検討した。次に、血清由来のカルニチンの影響を排除するため、カルニチン不含の透析ウシ胎児

血清 (dFBS) を用いた培養条件下で実験を行った。これらの細胞株にカルニチンまたは BBOX1 阻害剤 (カルニチン合成阻害) であるメルドニウムを添加し、増殖に対する影響を検討した。さらに、より腫瘍内の微小環境を模倣すると考えられるスフェロイド形成能を測定し、細胞内で合成されるカルニチンの腫瘍スフェロイド形成に与える影響を検討した。神経膠芽腫細胞内で合成されたカルニチンの脂肪酸酸化に対する影響を調べるため、U87 細胞について細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。最後に、同所性細胞株異種移植 (CDX) マウスモデルを用いて *in vivo* における腫瘍形成の検討を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて、NOD/Scid マウスに BBOX1 と IL-2 受容体 γ (Il2rg) を二重に欠損させたマウス系統 (Il2rg/Bbox1 KO) を樹立し、内在性のカルニチン供給を遮断した移植用マウスを確立した。このマウスの脳内に U87BBOX1-OE 細胞株およびコントロール細胞株を移植し、BBOX1 が腫瘍増殖に及ぼす影響を検討した。

3 研究成果

FBS を用いた培養条件下で U87 コントロール細胞と U87BBOX1-OE 細胞の増殖能に有意差はみられなかった。次に、dFBS を用いた培養条件下では、野生型 U87 細胞へのカルニチンの添加により無添加と比較して増殖が促進した。U87BBOX1-KO 細胞では野生型 U87 細胞と比較して、透析血清培地での増殖が抑制した。また、U87BBOX1-OE 細胞および LN229BBOX1-OE 細胞はコントロール細胞に比べ増殖の促進が認められ、メルドニウムの添加では、無添加の細胞と比較して増殖の抑制が確認された。U87BBOX1-OE 細胞および LN229BBOX1-OE 細胞は、対応するそれぞれのコントロール細胞と比較し、腫瘍スフェロイド形成能が増大した。細胞外フラックスアナライザーを用いた解析では、L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸を加えた測定培地に脂肪酸やグルコースを順次加えていく系を用いて野生型 U87 細胞と U87BBOX1-KO 細胞の OCR と ECAR の測定を行った。野生型 U87 細胞では、U87BBOX1-KO 細胞と比較してオレイン酸 (OA) を加えると OCR が上昇した。さらに、同じ測定培地で培養した U87BBOX1-OE 細胞にポート A でピルビン酸又は測定培地のみ、ポート B で OA、ポート C でグルコースを順次添加し、OCR と ECAR を経時的に測定した。ピルビン酸存在下での OA 添加では OCR が有意に上昇したが、非存在下では認められなかった。さらにグルコースを添加すると OCR に差は無くなった。この結果から、脂肪酸代謝の結果生じたアセチル CoA と、ピルビン酸の添加による補充反応の促進によって生じたオキサロ酢酸の増加により、クエン酸合成が促進され、TCA 回路の活性化により OCR が増大したと考えられた。一方、ECAR はピルビン酸添加の有無にかかわらず OA 添加後に差は認められなかったが、グルコース添加後の ECAR の上昇はピルビン酸を含む条件で低く抑えられた。これは、ピルビン酸の添加によりアセチル CoA とオキサロ酢酸から生じるクエン酸が増加し、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ 1 のクエン酸による阻害を介して解糖系が抑制された結果と考えられた。最後に *in vivo* での腫瘍形成の測定を行った。カルニチン不含の飼料を与えた Il2rg/Bbox1 KO マウスに U87BBOX1-OE 細胞と U87 コントロール細胞の同所性異種移植を行い、腫瘍形成能は移植細胞に発現するルシフェラーゼ活性を経時的に測定することにより検討した。U87BBOX1-OE 細胞と U87 コントロール細胞との間の腫瘍増殖の差は、移植後 35 日で明らかになり、その後さらに U87BBOX1-OE 細胞を移植したマウスで増大が顕著になった。

4 考察

本研究では、BBOX1 を神経膠芽腫細胞に安定発現させると脂肪酸酸化の活性化により腫瘍細胞の増殖が促進されること、レシピエントや飼料からのカルニチン補充が制限された CDX マウスモデルにおいて神経膠芽腫細胞に発現する BBOX1 が腫瘍形成を促進することを示した。GBM のような進行性の腫瘍は、生存のために特定の代謝経路に依存するため、代謝再プログラミングは新規治療法を開発するための標的となりうる。アシル-CoA 結合タンパク質(ACBP)は、ミトコンドリアへの輸送のために中鎖および長鎖脂肪アシル-CoA と高い親和性で結合する。GBM では高発現しており、ACBP をノックダウンすると、脂肪酸酸化活性が低下し、培養での腫瘍増殖が抑制され、同所性異種移植マウスの生存期間が延長する。GBM の浸潤も、ACBP 欠損 GBM では *in vitro* および同所異種移植マウスで阻害されることが報告されている。これらの結果は、脂肪酸酸化が悪性神経膠腫の治療標的となることを強く示唆している。

カルニチンは、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に不可欠な補因子であり、大部分は食事から摂取されるが、BBOX1 を発現する肝臓、腎臓、脳でも内因性に合成される。BBOX1 は血管の発達が不十分なためにカルニチンの供給が不十分な固形腫瘍で発現している可能性がある。このような条件下では、癌細胞の生存に有利となり、進行や転移をさらに促進する。従って、BBOX1 は、GBM のように、現在の治療レジメンでは予後不良な腫瘍のタイプにおいて、薬剤開発の良い候補となる可能性がある。

5 結論

GBM に発現する BBOX1 が、*in vitro* では腫瘍増殖と腫瘍スフェロイド形成を促進し、*in vivo* ではカルニチン供給が制限された CDX モデルマウスにおける腫瘍形成を促進することを証明した。以上の結果は、腫瘍細胞自体が供給するカルニチンによる脂肪酸酸化活性の上昇に起因すると考えられる。本研究による発見は、難治性の神経膠腫や悪性腫瘍に対する新しい治療法を確立するための新たな方法を提供すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

澤口武尊氏の学位論文「神経膠芽腫における BBOX1 を介した腫瘍増殖に関する代謝調節機構の研究」は、難治性脳腫瘍である神経膠芽腫の臨床検体を用いた先行研究のメタボローム解析で、イソクエン酸脱水素酵素 1/2 (IDH1/2) 変異型腫瘍では IDH1/2 野生型腫瘍と比較しカルニチンとアシルカルニチンが有意に減少していたことでカルニチンに注目し、変異型 IDH1/2 がカルニチン合成系の最終酵素である BBOX1 を阻害することから、この酵素が治療標的とならないか研究したものである。

まず神経膠芽腫細胞株で、BBOX1 過剰発現株とノックアウト株を作成した。通常の胎児ウシ血清を用いた培養では、野生型細胞株とこれらの細胞株では増殖に差がなかったが、外因性カルニチンの影響を排除するため透析胎児ウシ血清を用いた培養では、過剰発現株で腫瘍増殖が促進した。これに BBOX1 を阻害するメルドニウムを添加することで細胞増殖は抑制され、内在性の BBOX1 により合成されるカルニチンで神経膠芽腫の増殖が促進することが示唆された。ま

た、BBOX1 過剰発現株ではスフェロイド形成能も亢進した。さらに酸素消費速度と細胞外酸性化速度を測定し、神経膠芽腫細胞に BBOX1 を安定発現させると、脂肪酸の β 酸化が活性化することが示された。

次いで、BBOX1 発現神経膠芽腫細胞とコントロール細胞を用いて、同所性細胞株異種移植マウスモデルにおける *in vivo* での腫瘍形成を検討した。内因性のカルニチン供給を遮断するために、BBOX1 と IL2 受容体 γ を二重に欠損したノックアウトマウスを作成し、さらにこれにカルニチン不含の飼料を与え、細胞株の移植をおこなった。その結果、BBOX1 発現神経膠芽腫細胞を移植したマウスでの腫瘍増大がコントロールに比べて顕著であった。

以上から BBOX1 が神経膠芽腫の腫瘍増殖に強く関与し、その機序として脂肪酸の β 酸化が活性化していることが明らかになった。細胞株レベルから代謝解析、マウスモデルへと系統的に進めた研究で、内容的にも多岐にわたり充実した内容であった。今後の新たな治療法へのアプローチになる研究であり、独創的で学術的価値があると考えられた。

動物実験が特殊な環境下でのデータで、今回の結果が直接的に臨床応用につながるかは疑問があるものの、神経膠芽腫ではこれまで研究されてきていないカルニチンおよび BBOX1 について注目したことは、現在難治性で根治療法の確立していないこの腫瘍において、重要な意義があり発展性もあると考えられた。

審査委員全員一致で学位論文にふさわしいと判断された

最終試験の結果の要旨

最終審査では、まず細胞株実験での実験条件についての質問があった。1 つめは内因性のカルニチン合成の意義を検証するのに、外因性のカルニチン供給を遮断した条件のみで行った点であったが、これについては通常胎児ウシ血清でのデータもすでに得られており、論文に追記された。2 つめは透析胎児ウシ血清を用いた場合にカルニチン以外に除去された因子についてで、これも追記された。

次に先行研究の腫瘍検体でのカルニチン濃度と、今回のマウスでの解析時の血中カルニチン濃度との比較についてであった。これについては直接的な比較は難しく、あくまで細胞株異種移植モデルでの実験系を確立する上での必要条件として、体内循環からのカルニチン供給が遮断される環境であったことを説明され、これについても学位論文に追記された。

また、最新の WHO 分類で、神経膠芽腫が IDH1/2 変異の有無でそもそも全く別の腫瘍分類となった点も指摘され、腫瘍の heterogeneity に関する記載は削除された。IDH1/2 変異型と野生型でのカルニチンの意味合いは全く異なると考えられることについても、十分質問に回答できた。この分野についての深い知識を有していることが示され、今後の研究の発展も十分期待された。

以上から、申請者は本学の学位授与に値する学識を有すると審査委員全員一致で判断された。