

氏名	森田 那奈架
学位の種類	博士(医療科学)
学位記番号	甲第36号
学位授与の日付	2023年3月12日
学位論文題名	Viability of diffuse large B-cell lymphoma cells is regulated by kynurenine 3-monooxygenase activity 「びまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞の生存率はキヌレニン-3-モノオキシゲナーゼにより制御される」
指導教員	教授 齋藤 邦明
論文審査委員	主査 教授 毛利 彰宏 副査 教授 市野 直浩 教授 鈴木 康司

論文内容の要旨

要旨

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)は、本邦で最も頻度の高い悪性リンパ腫である。DLBCLの標準療法であるCHOP療法と、抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブを組み合わせたR-CHOP療法は、DLBCL患者の半数以上を治療できるが、患者の30-40%が再発、または治療抵抗性を示すことから、難治症例における新規治療標的の確立が望まれている。これまでの研究で、DLBCL細胞におけるインドールアミン酸素添加酵素(IDO1)と血中キヌレニン(KYN)濃度の増加は、予後不良であると報告されているが、IDO1下流の酵素や代謝産物の役割について明らかではない。そこで本研究では、DLBCL細胞におけるキヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ(KMO)に着目し、その機能や予後との関連性を評価することを目的とした。

本研究では、DLBCL患者(28名)と健常ボランティア(34名)の血清サンプルを用いて、血清中のKYN代謝産物をHPLC法で測定し、患者の病態とKMO活性または3-HKレベルとの関連性を解析した。さらに、ヒトDLBCL細胞株とDLBCL患者のリンパ節を用いて、RT-qPCR法・WB法・免疫組織化学/蛍光染色によるKMO発現の評価、KMO阻害剤や3-HK添加による細胞生存率の測定、細胞内NAD⁺レベルの測定を行い、KMOとその代謝産物がDLBCL細胞に及ぼす影響を評価した。

DLBCL患者群では健常人群に比べ、血清3-HK及びKMO活性が有意に増加していることが明らかとなった。DLBCL患者では血清KYNレベルが増加すると報告されているが、DLBCL患者の3-HKレベルはKYNレベルと相関しなかった。このことから、DLBCL患者の3-HKレベルは、KYNレベルとは独立して制御されていることが推察された。次に、血清3-HKレベル及びKMO活性と、DLBCL患者の病態との関連性を調査するために、血清3-HKレベル及びKMO活性の中央値を基準に2群に分類し、相関関係を評価した。血清3-HKレベルが高いDLBCL患者では、臨床病期・DLBCLで用いられる国際予後指標・リ

ツキシマブ導入後の修正国際予後指標が進行していた。KMO活性が高い同患者では、臨床病期が進行していた。さらに治療前に比べ、治療後の患者血清の3-HKおよびKMO活性レベルは、減少傾向が示されたことから、血清3-HKレベルおよびKMO活性が腫瘍の進行を反映している可能性が示唆された。

そこで、3-HKレベルおよびKMO活性が腫瘍の進行に与える影響を*in vitro*で評価するため、ヒトDLBCL細胞株(KML-1細胞とSTR-428細胞)及びDLBCL患者のリンパ節を用いて、KMOの発現を調査した。その結果、同じDLBCL細胞株でも、KMO発現が恒常的に異なることが明らかとなり、STR-428細胞は高レベルのKMO発現を示したが、KML-1細胞は低レベルのKMO発現を示した。また、陰性対照のリンパ節と比較して、DLBCL患者のリンパ節でも高レベルのKMO発現が観察された。そこで、このKMO発現が異なるDLBCL細胞を用いて、KMO発現が腫瘍細胞の進行に与える影響を評価するため、KMO代謝産物である3-HKまたはKMO阻害剤を添加し、細胞生存率を調査した。定常状態において、高い3-HK生成能を有するKMO^{high}のSTR-428細胞の細胞生存率は、KMO^{low}のKML-1細胞の細胞生存率と比較して、有意に高いことが明らかとなった。さらに、3-HKの添加は、KMO^{low}のKML-1細胞の細胞生存率を有意に改善した。反対に、KMO阻害剤の添加は、KMO^{high}のSTR-428細胞の細胞生存率を有意に低下させた。これらの結果から、DLBCL細胞の生存率がKMO活性を介した3-HKの産生によって調節されている可能性が示唆された。KYN経路の最終産物であるNAD⁺は、細胞増殖に必要な補酵素であることから、これらDLBCL細胞株の生存率の違いは、NAD⁺レベルに起因するか調査した。KMO^{high}のSTR-428細胞のNAD⁺レベルは、KMO^{low}のKML-1細胞と比較して、有意に増加していることが明らかとなった。

*In vitro*実験におけるDLBCL細胞株の高いKMO活性と細胞増殖率が正の相関を示すことは、DLBCL患者における高いKMO活性が臨床病期の進行と関連していることを裏付けるものかもしれない。さらに、KMO阻害剤あるいは3-HKの添加がDLBCL細胞の生存率に影響を与えることやKMO発現量はNAD⁺レベルと相関することを明らかにした。このことより、KMO活性によって生成される3-HKは、NAD⁺合成を介してDLBCL細胞の生存率を制御している可能性が示された。したがって、KMOを標的とした新規治療法の確立は、現在の標準的治療法とは異なる治療アプローチであり、有用性が期待された。

倫理委員会 承認番号：藤田医科大学 (HM20-268)、岐阜大学(2018-25)

論文審査結果の要旨

DLBCL細胞株の高いKMO活性と細胞増殖率に正の相関が示されたことから、DLBCLに対する病態解明および治療薬開発の標的としてのKMOの有用性を見出した。主査及び副査から、既報のキヌレニン高値と今回の3-HK高値の差異と予後および重症度の関連性、対象者となる患者・健常者の選択基準及びその方法、統計解析におけるノンパラメトリックの選択理由、LDHおよびsIL-2Rの選択理由と図示方法、箱ひげ図の記載手法および相関図における直線性、他のがんとの共通性・差異、IDO1とKMOの病態への関与の差異など多岐に亘る質問があり、申請者は各質問に対して的確に説明することができた。申請者は本研究を主体的に実施したこと及び専門領域の知識を十分有していたことを確認できた。本論文は、査読付き英文雑誌「Oncology Letters」に掲載されており、英語による論文作成能力も有していると判断した。博士(医療科学)の学位を与えるに十分な能力を有すると判定した。