

京都大学	博士（医学）	氏名	坂元宏匡
論文題目	Functional and genomic characterization of patient-derived xenograft model to study adaptation to mTORC1 inhibitor in clear cell renal cell carcinoma 淡明細胞型腎細胞癌における mTORC1 阻害剤耐性機序解明のための患者由来ゼノグラフトモデルの機能およびゲノムの解析		
（論文内容の要旨） 進行性淡明型腎細胞癌の治療では VEGF や mTOR に対する分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が主として用いられる。テムシロリムスを含む mTOR 阻害薬は mTOR 複合体の一つである mTORC1 を阻害し、予後改善効果が示されている。標準治療の一つとして用いられているが、その効果は限定的で、ほとんどの腫瘍で薬剤耐性を獲得する。mTOR 阻害薬への耐性獲得機序は <i>mTOR</i> の遺伝子変異、代替シグナル伝達経路の活性化、腫瘍内不均一性などが報告されているが、いまだ未解明な点が多い。一方、患者由来ゼノグラフト (PDX) モデルは薬剤スクリーニング、バイオマーカー検索、薬剤感受性や耐性の解析に用いられる有用なモデルであるが、mTOR 阻害薬の耐性機序の検討に用いられることは少ない。本研究では PDX モデルを用いて、腎細胞癌における mTOR 阻害薬耐性獲得の機序を解明することを目的とした。 安定的に継代可能な腎細胞癌 PDX モデル 2 系統に対して、テムシロリムスを投与しながら継代を繰り返すことで耐性を獲得したモデルの樹立を試み、1 系統で完全耐性を獲得した。PDX モデルにおける薬剤耐性獲得に伴う遺伝子変異を解析するために、テムシロリムス耐性群ならびに溶媒を投与したコントロール群の PDX 腫瘍を用いて全エクソンシーケンスを施行した。耐性腫瘍に共通する特異的な 4 つの遺伝子変異を同定し、PDX 各世代におけるこれらの変異の有無をサンガーシーケンスで評価したところ、 <i>DNMT1</i> と <i>ANKRD12</i> の 2 つの変異は、耐性を獲得した PDX モデルの第 1 継代時に既に腫瘍内に認められた。そこで、 <i>DNMT1</i> 変異に着目し、その mTOR 阻害薬耐性機序への関与について検討を行った。PDX 腫瘍における DNMT1 タンパク発現と DNMT 酵素活性を評価したところ、テムシロリムス耐性腫瘍の DNMT1 発現はコントロール腫瘍と同程度であったが、DNMT 酵素活性はコントロール腫瘍と比較して有意に低下していた。以上の結果から、テムシロリムス耐性 PDX 腫瘍において <i>DNMT1</i> 変異ならびに DNMT 酵素活性の低下が認められ、耐性形質の獲得に関与している可能性が示された。次に、腎癌細胞において DNMT 酵素活性の低下によりテムシロリムス耐性形質が獲得されるか評価するために、CRISPR / Cas9 system を用いてテムシロリムス感受性腎癌細胞株 786-O の DNMT1 ヘテロノックアウト細胞株を作成し、DNMT 活性の変化、ならびに <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> におけるテムシロリムスの腫瘍増殖抑制効果について評価した。DNMT1 ヘテロノックアウト 786-O 細胞株では DNMT 酵素活性が親株より有意に低下し、 <i>in vitro</i> 、 <i>in vivo</i> ともに親株と比較してテムシロリムスによる腫瘍増殖抑制効果が有意に減少し、耐性形質を示した。また、DNMT1 の酵素活性は DNA メチル化ならびに遺伝子発現に強く関与するため、メチル化解析ならびにマイクロアレイ解析を用いて PDX 腫瘍の統合的遺伝子プロファイルを評価した。			

テムシロリムス耐性 PDX 腫瘍において、プロモーター領域を含めて、全体的にコントロール腫瘍に比べて低メチル化にシフトしていることが示唆され、mTOR 経路を活性化する分子の発現亢進も認められた。

本研究では、腎細胞癌の PDX モデルを用いて mTOR 阻害薬耐性モデルを樹立し、薬剤耐性獲得機序を解析するプラットフォームとなりうることが示され、腎癌細胞のメチル化状態を変化させる DNMT1 を含む遺伝的変化が、テムシロリムスに対する耐性獲得のメカニズムの一つである可能性を示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

進行性淡明型腎細胞癌に対して、テムシロリムスを含む mTORC1 阻害剤は予後改善効果を示すが、その効果は限定的であり、多くの腫瘍が薬剤耐性を獲得する。本論文では患者由来ゼノグラフト (PDX) モデルを用いて mTORC1 阻害剤耐性腎細胞癌のゲノム解析を行い、耐性獲得機序について検討した。

PDX モデルにテムシロリムスを継代投与することで得られた耐性腫瘍とコントロール腫瘍（溶媒投与）を全エクソンシーケンスにて解析し、耐性腫瘍に特異的な 4 つの遺伝子変異を同定した。そのうち、薬剤投与後の継代早期に検出された *DNMT1* 変異に着目した。耐性 PDX 腫瘍の DNMT1 蛋白発現はコントロール腫瘍と同程度であったが、酵素活性は低下していた。DNMT1 ヘテロノックアウト 786-O 腎癌細胞株は、親株と比較して *in vitro*、*in vivo* ともに mTORC1 阻害による腫瘍増殖抑制効果が有意に減少し、耐性形質を示した。また、PDX 腫瘍の DNA メチル化解析では、コントロール腫瘍に比べて耐性腫瘍では低メチル化状態にシフトしており、遺伝子発現解析では mTOR 経路を活性化する分子の発現亢進が認められた。*DNMT1* 遺伝子変異による腫瘍のメチル化状態の変化が PDX モデルのテムシロリムス耐性獲得に関与している可能性が示された。

以上の研究は腎細胞癌における mTOR 阻害剤耐性獲得機序の解明に貢献し、その耐性克服に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 2 月 10 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降