

令和元年6月18日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10486

研究課題名(和文) 化学・放射線療法で誘導される細胞老化応答を標的にした、乳がん補助療法の錬成

研究課題名(英文) Cellular senescence induced by chemo/radio-therapy as new therapeutic opportunity of mammary tumors.

研究代表者

河合 賢朗 (Kawai, Masaaki)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・特任研究員

研究者番号：80513530

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)：化学・放射線治療は、腫瘍細胞に、細胞死や細胞老化(治療誘導性細胞老化；以下、therapy-induced senescence: TIS)を誘導する。どちらも腫瘍の縮小や無憎悪につながるため、レスポンスとして同列に捉えられることも多いが、老化腫瘍細胞は生き残り、種々の仕組みを介して再発や耐性がん出現の促進に寄与していると考えられている。本研究では、TISに伴う腫瘍細胞の代謝応答を解明し、TIS細胞をさらに効率的に除去することで乳がん補助療法の実効性を高める治療の開発に向けて、その基礎となるデータを収集した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、補助療法として各種分子標的治療の発展は目覚ましいが、それらの恩恵を受けられるのは一部患者に限られる。よって、従来型の化学療法・放射線療法は今後も引き続き重要で、より一層の治療効果向上や副作用改善が求められている。とくに前者に関し、治療抵抗性の解明が大きなブレイクスルーになると期待されている。本研究にて、TISに伴う代謝変化や関連表現型、およびそれらの分子メカニズムの一部を明らかにすることが出来た。新たな乳がん補助療法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor cells often undergo cellular senescence when treated with DNA-damaging agent or radio-therapy (TIS: therapy-induced senescence) in addition to cell death. TIS cells are thought to survive longer time, and promotes relapse and/or emergence of therapy-resistant tumors by various mechanisms. In this study, we tried to understand metabolic reprogramming during TIS, and to explore it as new therapeutic target in order to improve adjuvant therapy of mammary tumors.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：乳がん 補助療法 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、補助療法として各種分子標的治療の発展は目覚ましいが、それらの恩恵を受けられるのは一部患者に限られる。よって、従来型の化学療法・放射線療法は今後も引き続き重要で、より一層の治療効果向上や副作用改善が求められている。とくに前者に関し、治療抵抗性の解明が大きなブレークスルーになると期待されている。

2. 研究の目的

化学・放射線治療は、腫瘍細胞に、細胞死や細胞老化（治療誘導性細胞老化；以下、therapy-induced senescence: TIS）を誘導する。どちらも腫瘍の縮小や無憎悪につながるため、レスポンスとして同列に捉えられることも多いが、老化腫瘍細胞は生き残り、種々の仕組みを介して再発や耐性がんの出現を促進していると考えられている。近年の研究から、TISに伴って細胞の代謝ネットワークがリプログラムされ、この代謝再プログラム化が、老化細胞の様々な形質に寄与することが分かってきた。しかし、その実態の解明は緒についたばかりで、詳細は不明の点が多い。そこで本研究では、TISに伴う腫瘍細胞の代謝応答を解明し、TIS細胞をさらに効率的に除去することによって乳がん補助療法の実効性を高める治療の開発に向けて、その基礎となるデータを収集した。

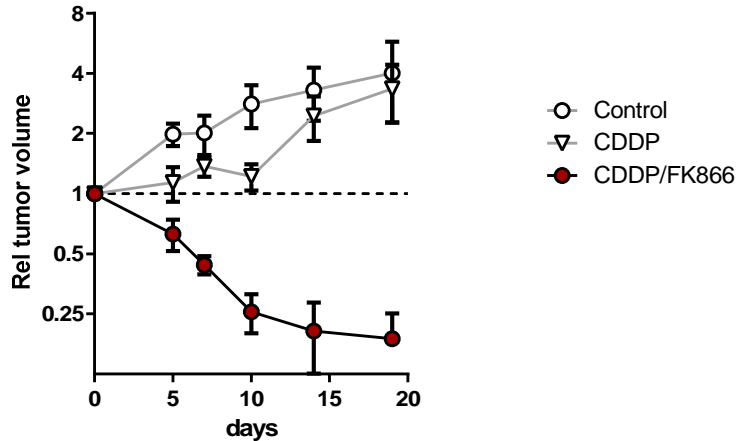
3. 研究の方法

これまでの手術検体の解析から TIS プログラムへの関与がうかがわれていた解糖系酵素と、その下流エフェクター経路を中心に研究を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞株を用いた解析では、化学療法に耐性の細胞株、細胞老化を起こしやすい細胞株、細胞死を起こしやすい細胞株、などの分類をすすめた。TIS 関連表現型として、解糖系酵素ピルビン酸キナーゼ M (Pkm) のスプライシングスイッチを見出した。このスイッチが、代謝のリプログラム化を介して、TIS細胞の生存に非常に重要であることを見出した。

TIS細胞にて、オートファジーや NAD 代謝が亢進していることを示唆する知見を得た。これらのうち、少なくとも NAD 代謝の阻害が、化学療法の成績を著しく改善することを、マウス前臨床モデルで確認した（下図）。オートファジーについては、ATG 遺伝子をノックアウトした細胞の作製や、オートファジーレポータープロンプを導入するなどして、解析をすすめている。



(2) 前年度において、老化細胞にて NAD 合成代謝が亢進していることが示唆されたこと、海外にて NAD 合成阻害剤を用いた臨床試験が開始されたことなどをふまえ、老化細胞における NAD 代謝に着目した。NAD は合成-分解のターンオーバーが著しく、絶対量の多寡が、必ずしも合成系の活性に一致しない。この点について、新たなアッセイ系を開発して評価することをこころみ。安定同位体 NAD 合成前駆体と質量分析を組み合わせた NAD 合成のフラックス解析系の開発を行った。NAD 合成経路としては、サルベージ経路と de novo 経路の大きく二つの経路が存在する。このうちまずサルベージ経路について、¹⁵N 標識前駆体を用いた解析を行なった。前駆体添加後の培養時間の最適化を行い、異なる質量分析手法を用いた際の各種関連代謝産物の定量限界等を各々検討した。サルベージ経路と de novo 経路をそれぞれ担う酵素の発現を抑制する網羅的なノックダウン実験を行い、腫瘍細胞の NAD プールは主にサルベージ経路への依存が強い事、de novo 経路の貢献は比較的少ないことを確認できた。NAD 生合成の基質である PRPP はペントースリン酸経路から供給されるだろうことをふまえ、グルコース由来炭素が NAD 骨格に取り込まれているかの検証をこころみた。

(3) NAD サルベージで基質となる PRPP が、グルコースに由来していることが、安定同位体グルコースを用いたトレーサー実験にて確認できた。老化細胞の NAD サルベージ亢進には解糖系酵素 PKM1 の関与が示唆されていることから、遺伝子改変によって老化誘導前から PKM1 を発現するように施した細胞の遺伝子発現解析を行った。その結果、PKM1 の発現のみで、SASP

(senescence-associated secretory phenotype) 様の現象が惹起されることが示唆された。一連の結果から、治療ストレスを受けた乳がん細胞では、PKM1 発現が誘導されてグルコース代謝・NAD サルベージが亢進し、炎症性サイトカインなどの発現を介して治療抵抗性や再発を促進しているモデルが浮上してきた。一方、乳がんの一部では、de novo 経路も考慮する必要があることが示唆された。TCGA データセットでの検討から、乳がん症例の約 10%において、de novo NAD 合成経路遺伝子 (NAPRT, NADSYN1, QPRT) の増幅がみとめられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Minami Y, Nishino Y, Kawai M, Tada H, Kanemura S, Miyashita M, Ishida T, Kakugawa Y.: Reproductive history and breast cancer survival: a prospective patient cohort study in Japan. *Breast Cancer*. 2019 doi: 10.1007/s12282-019-00972-5. 査読有

Miyashita M, Niikura N, Kumamaru H, Miyata H, Iwamoto T, Kawai M, Anan K, Hayashi N, Aogi K, Ishida T, Masuoka H, Iijima K, Masuda S, Tsugawa K, Kinoshita T, Tsuda H, Nakamura S, Tokuda Y.: Role of Postmastectomy Radiotherapy After Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients: A Study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Ann Surg Oncol*. 2019. doi: 10.1245/s10434-019-07453-1. 査読有

Kurosawa K, Inoue Y, Kakugawa Y, Yamashita Y, Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Momi Y, Sato I, Chiba N, Suzuki M, Ogoh H, Yamada H, Miura K, Watanabe T, Tanuma N, Tachi M, Shima H.: Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-rasG12D-driven tumor promotion. *Cancer Sci*. 2018;109(7):2178-2187 査読有

Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama K, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M and Tanuma N: Pkm1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, 33(3):355-367. 2018 査読有

Sato T, Morita M, Tanaka R, Inoue Y, Nomura M, Sakamoto Y, Miura K, Ito S, Sato I, Tanaka N, Abe J, Takahashi S, Kawai M, Sato M, Hippo Y, Shima H, Okada Y, Tanuma N: *Ex vivo* model of non-small cell lung cancer using mouse lung epithelial cells. *Oncol Lett*. 14(6):6863-6868. 2017; doi: 10.3892/ol.2017.7098. 査読有

Takizawa Y, Kawai M, Kakugawa Y, Nishino Y, Ohuchi N, Minami Y.: Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk According to Hormone Receptor Status in Japanese Women: A Case-Control Study. *Tohoku J Exp Med*. 244(1):63-73. 2018; doi: 10.1620/tjem.244.63. 査読有

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：島礼

ローマ字氏名：SHIMA, Hiroshi

所属研究機関名：宮城県立がんセンター（研究所）

部局名：がん薬物療法研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：10196462

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。