

令和元年5月23日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10765

研究課題名（和文）IDH1変異神経膠腫に対するNAD+枯渇促進を目的とした修飾療法の開発

研究課題名（英文）Therapeutic strategy for IDH mutant gliomas by NAD+ depletion

研究代表者

立石 健祐（Tateishi, Kensuke）

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00512055

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）：我々はこれまでにIDH1変異がNAD+合成代謝機構に影響を及ぼすことを見出してきた。本研究ではNAD+の消費経路に着目し、DNA修復機構の主要タンパク質であるPARPの活性の亢進を通じてNAD+を消費するテモゾロミドとNAD合成阻害剤の併用療法を試みた。その結果IDH1変異神経膠腫において遺伝子変異特異的に合成致死性が得られた。動物レベルにおいても薬剤併用による相乗効果的な抗腫瘍効果が認められた。これらの結果IDH1変異神経膠腫に対する遺伝子変異特異的な治療法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫は未だ人類が克服しきれていない疾患である。IDH変異は低悪性から悪性化を引き起こすタイプの神経膠腫の大部分に認める遺伝子異常であり、治療標的としての意義がこれまでに期待されてきた。我々の研究により、IDH1変異神経膠腫に対し、標準的治療薬であるテモゾロミドにNAD+合成阻害剤を併用する治療が遺伝子特異的な治療標的であることが判明した。今後さらなる研究が進むことで将来の遺伝子変異特異的な治療法として臨床応用につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：We have previously developed novel therapeutic strategy for IDH1 mutant gliomas by depleting intracellular NAD+. Unfortunately, systemic NAMPT inhibitor treatment is toxic to humans, thus we aimed to develop therapeutic strategy to reduce toxicity. We found temozolomide, which is used as standard therapy in gliomas, transiently induce intracellular NAD loss by base excision repair pathway activation. Using this biological effect, we found combination with NAMPT inhibitor with temozolomide could induce potent NAD+ depletion inducible anti-tumor effect without critical toxicity in mice. Thus, we could establish novel therapeutic regimen for IDH1 mutant gliomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠腫 IDH変異 DNA修復 NAD+代謝 テモゾロミド

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

1. 研究開始当初の背景

原発性脳悪性腫瘍において神経膠腫は代表的致死的疾患に挙げられる。一部の神経膠腫において *IDH1* 遺伝子の変異が、腫瘍形成に極めて重要であることが判明している。申請者らは *IDH1* 変異腫瘍細胞は野生型と比較して細胞内 NAD⁺の基礎値が低値であること、その原因として *IDH1* 変異により NAD⁺合成の主要経路の酵素である Naprt1 が抑制されることを見出した。癌細胞では NAD⁺合成は 2 つのサルベージ経路が重要であり、一つは Naprt1 を介する経路、もう一つは律速酵素である Nampt を介した経路である。*IDH1* 変異細胞では Naprt1 発現が抑制されているため、極めて低濃度の Nampt 阻害剤により NAD⁺合成が強力に阻害される。その結果 NAD⁺ 値が *IDH1* 変異神経膠腫細胞の生存に不可欠な閾値を下回ることによって細胞死に至ることが判明した (Tateishi K et al. Cancer Cell, 2015)。これらの結果は NAD⁺合成阻害をターゲットにした治療法が実際の *IDH1* 変異を有する脳腫瘍患者にも応用可能であることを示唆するものであった。これらの結果により、申請者らは *IDH1* 変異腫瘍に対する NAD⁺代謝性変化を利用した有力な治療法を確立した。一方生体への応用を考慮した際に、安全性、有効性を更に高めた治療法の確立が課題として残っている。即ち Nampt 阻害剤を最小限に使用しつつ NAD⁺値を低下させる治療法が必要であると考えられた。そこで申請者らは外因的な NAD⁺消費経路の活性化が *IDH1* 変異腫瘍細胞内の NAD⁺基礎値低下を促進させ、Nampt 阻害剤の感受性を更に高めるのではないかと仮説を立てた

2. 研究の目的

これらの研究背景を踏まえ、本研究では外因的な NAD⁺消費経路の活性化により *in vivo* において従来よりも低濃度の Nampt 阻害剤にて NAD⁺枯渇が誘発される治療法を確立することを研究全体構想に掲げた。具体的にはアルキル化剤テモゾロミド (TMZ) 投与により PARP 依存性に NAD⁺消費が生じると仮説を立て、*IDH1* 変異神経膠芽腫に対して TMZ と NAMPT 阻害剤の併用による抗腫瘍効果が増強されるか検討を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) *in vitro* 実験:

IDH1 変異が及ぼす代謝ストレスの解明

DNA 修復機構には PARP を介した base excision repair (BER) や single strand break repair のみならず double strand break に対する homologous recombination, TMZ によるメチル基負荷後の MMR などがある。最初に *IDH1* 変異神経膠芽腫幹細胞株に対し TMZ 投与を行い細胞毒性効果、NAD⁺消費、PARP 活性などを検討した。また NAD⁺変動が PARP 依存性を明らかにするために PARP 阻害剤を用いた拮抗化が生じるか検討した。

TMZ と NAMPT 阻害剤の併用による細胞毒性効果の検討

内因性 *IDH1* 変異神経膠芽腫幹細胞株、*IDH1* 野生型神経膠芽腫幹細胞株を用いて TMZ と NAMPT 阻害剤併用による抗腫瘍効果を検討した。また併用による細胞内 NAD⁺値の変動を検討した。

外因性 *IDH1* 変異細胞株を用いた確証実験

併用効果が *IDH1* 変異に基づくものか明らかにする為に、申請者らが樹立したテトラサイクリン誘導下 *IDH1* 変異強制発現神経膠芽腫幹細胞株 (MGG18-*IDH1*-R132H) を用いて細胞毒性効果、NAD⁺変動を検討した。また *NAPRT1* 抑制モデルを作成し、同様の抗腫瘍効果があるか検討した。

細胞毒性効果と MMR 機構や *MGMT* 遺伝子発現との関連性についての検討

併用効果が TMZ 耐性に関連する MMR 遺伝子変異や *MGMT* プロモーター領域のメチル化状態に影響されるか検討するため *MGMT* 高メチル化、低メチル化細胞を用いて *MSH6* 抑制モデルを作成し抗腫瘍効果を検討した。

細胞毒性メカニズムの検討

細胞毒性がアポトーシス依存性かオートファジー依存性が検討した。FACS, western blotting 法にて解析するとともにアポトーシス、オートファジー阻害剤にて細胞毒性効果

に対する拮抗が得られるか検討した。

in vivo 研究

TMZ と NAMPT 阻害剤による併用療法が *IDH1* 変異腫瘍動物モデルに対する抗腫瘍効果を発揮するか、更には NAMPT 阻害剤減量下でも同様の効果が得られるか検討した。

4. 研究成果

IDH1 変異が及ぼす代謝ストレスの解明

IDH1 変異神経膠芽腫幹細胞に対し TMZ を投与したところ、濃度依存性に細胞毒性を誘導することが判明した。ただし細胞増殖抑制効果は4日目以降に生じ、これは TMZ の薬理作用 (MMR 依存性の futile mismatch repair 機構) によるものと考えられた。一方 TMZ 投与直後より数時間以内に細胞内 PARP 活性の上昇とともに代謝産物である poly ADP-ribose (PAR) が過剰に産生された(図1)。更には PARP 活性と連動し NAD⁺消費が生じることが判明した(図2)。これらの現象は PARP 阻害剤である olaparib にて拮抗が生じたことから PARP 活性依存性であることが判明した。このことは TMZ 投与後急速に生じる DNA メチル基負荷に対する修復機構が潜在的な治療標的となりうることを示唆する結果であった。

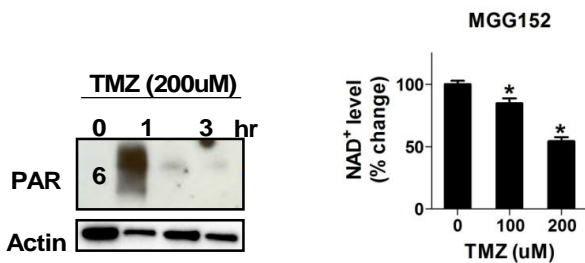


図1 TMZ 投与後の PAR 発現の変化 図2 TMZ 投与6時間後に於ける NAD⁺値の変動

TMZ と NAMPT 阻害剤の併用による細胞毒性効果の検討

次に内因性 *IDH1* 変異神経膠芽腫幹細胞株である MGG119, MGG152, BT142、*IDH1* 変異軟骨肉腫細胞株である HT1080 を用いて TMZ と NAMPT 阻害剤を投与したところ、いずれの細胞においても TMZ の濃度依存性に NAMPT 阻害剤との併用効果が生じることが判明した(図3)。この現象は *IDH1* 野生型神経膠芽腫幹細胞株では認められなかったことから、少なくとも *IDH1* 変異細胞においては TMZ と NAMPT 阻害剤の併用効果が期待できることが示唆された。また NAD⁺ は NAMPT 阻害剤、TMZ 単独と比較し、併用下では強力に抑制されることが併せて判明した(図4)。

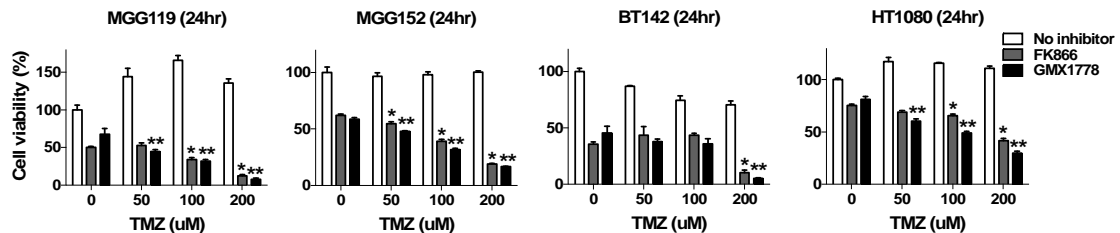


図3 内因性 *IDH1* 変異神経膠芽腫幹細胞株に対する NAMPT 阻害剤と TMZ 併用による抗腫瘍効果

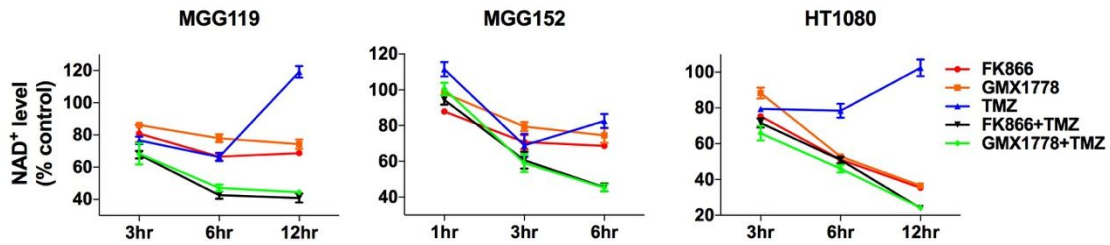


図4 内因性 *IDH1* 変異神経膠芽腫幹細胞株に対する NAMPT 阻害剤と TMZ 単独及び併用下における NAD + 値の変動

外因性 *IDH* 変異細胞株を用いた検証実験

外因性 *IDH* 変異細胞株を作成し併用効果を検証したところ、強制 *IDH1* 変異細胞株において NAMPT 阻害剤の感受性が高まること、更には TMZ との併用効果が有意に認められることが明らかになった (図5)。更に UACC257 細胞株に対し shRNA を用いて *NAPRT1* を抑制したところ強制 *IDH1* 変異細胞に於ける薬効と類似した現象が認められたことから、細胞毒性効果は *IDH1* 変異による *NAPRT1* 発現の抑制が関与していることが明らかになった。これにより NAMPT 阻害剤と TMZ の併用療法は *IDH1* 変異神経膠芽腫において特に有用な治療法であることが裏付けられた。

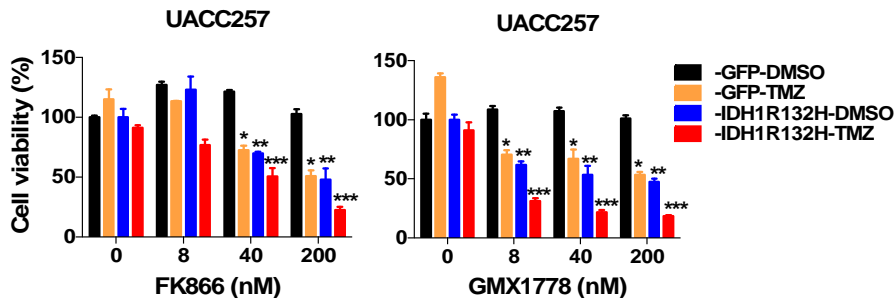


図5; *IDH1* 変異強制モデル (*IDH-R132H*) とコントロール (*GFP*) における NAMPT 阻害剤単独及び TMZ との併用下における抗腫瘍効果の検討

細胞毒性効果と MMR 機構や MGMT 遺伝子発現との関連性についての検討

MGMT メチル化 (MGG152) 非メチル化 (HT1080) 細胞を用いて主たる MMR 関連遺伝子である *MSH6* を抑制し、TMZ 耐性細胞モデルを作成した。これらの細胞を用いて TMZ と NAMPT 阻害剤の併用療法を検討したところ、いずれも相乗効果が保たれることが判明した。このことは TMZ 耐性及び不応神経膠芽腫においてもこの併用療法の効果が期待されるものであった。

細胞毒性メカニズムの検討

細胞毒性メカニズムとしてオートファジーに関連する蛋白発現が亢進していた。またアポトーシス非依存性であることも判明した。さらにオートファジー阻害剤を用いたところ細胞毒性効果に抑制が生じたことから細胞毒性は NAD + 枯渇によって生じた ATP 産生低下に起因するオートファジーによるものと考えられた。

in vivo 研究

TMZ と併用することで、低濃度 NAMPT 阻害剤治療が高濃度下での治療効果と同様の抗腫瘍効果が得られるか *IDH1* 変異、野生型細胞株を用いて検討した。*IDH1* 変異腫瘍に対し最初に NAD+値を測定したところ、高濃度 NAMPT 阻害剤と比較し TMZ と 50%濃度の NAMPT 阻害剤で同レベルの NAD+低下が腫瘍組織内で生じていることが判明した。この濃度を用いてマ

ウス *IDH1* 腫瘍に対して抗腫瘍効果が生じるか検討したところ、NAMPT 阻害剤、TMZ 単独治療と比較して併用療法では顕著な抗腫瘍効果が生じることが判明した。一方 *IDH1* 野生型腫瘍では抗腫瘍効果は認められなかった。

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. McBrayer SK, Mayers JR, DiNatale GJ, Shi DD, Khanal J, Chakraborty AA, Sarosiek KA, Briggs KJ, Robbins AK, Sewastianik T, Shareef SJ, Olenchock BA, Parker SJ, Tateishi K, Spinelli JB, Islam M, Haigis MC, Looper RE, Ligon KL, Bernstein BE, Carrasco RD, Cahill DP, Asara JM, Metallo CM, Yennawar NH, Vander Heiden MG, Kaelin WG, Jr. (2018) Transaminase Inhibition by 2-Hydroxyglutarate Impairs Glutamate Biosynthesis and Redox Homeostasis in Glioma. *Cell*.175(1):101-16 e25. 査読あり
2. Nakamura T, Fukuoka K, Ikeda J, Yoshitomi M, Udaka N, Tanoshima R, Tateishi K, Yamanaka S, Ichimura K, Yamamoto T (2017) Encouraging option of multi-staged gross total resection for a C11orf-RelA fusion-positive supratentorial anaplastic ependymoma. *Brain Tumor Pathol*.34(4):160-4. 査読あり
3. Nakamura T, Yamashita S, Fukumura K, Nakabayashi J, Tanaka K, Tamura K, Tateishi K, Kinoshita M, Fukushima S, Takami H, Fukuoka K, Yamazaki K, Matsushita Y, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Kubo A, Shuto T, Kocialkowski S, Yamanaka S, Mukasa A, Sasayama T, Mishima K, Maehara T, Kawahara N, Nagane M, Narita Y, Mano H, Ushijima T, Ichimura K (2017) Genome-wide DNA methylation profiling identifies primary central nervous system lymphoma as a distinct entity different from systemic diffuse large B-cell lymphoma. *Acta Neuropathol*.133(2):321-4. 査読あり
4. Ohtake M, Tateishi K, Murata H, Nagashima Y, Yamanaka S, Yamamoto T (2018) Succinate Dehydrogenase B Subunit-Negative Jugular Foramen Paraganglioma Manifesting Malignant Progression with Pseudohypoxia-Related Atypical Uptake of [(18)F]-Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose: A Case Report. *World Neurosurg*.114:47-52. 査読あり
5. Shankar GM, Kirtane AR, Miller JJ, Mazdiasni H, Rogner J, Tai T, Williams EA, Higuchi F, Juratli TA, Tateishi K, Koerner MVA, Tummala SS, Fink AL, Penson T, Schmidt SP, Wojtkiewicz GR, Baig A, Francis JM, Rinne ML, Batten JM, Batchelor TT, Brastianos PK, Curry WT, Jr., Barker FG, 2nd, Jordan JT, Iafrate AJ, Chi AS, Lennerz JK, Meyerson M, Langer R, Wakimoto H, Traverso G, Cahill DP (2018) Genotype-targeted local therapy of glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*.115(36):E8388-E94. 査読あり
6. Tateishi K, Higuchi F, Miller JJ, Koerner MVA, Lelic N, Shankar GM, Tanaka S, Fisher DE, Batchelor TT, Iafrate AJ, Wakimoto H, Chi AS, Cahill DP (2017) The Alkylating Chemotherapeutic Temozolomide Induces Metabolic Stress in *IDH1*-Mutant Cancers and Potentiates NAD(+) Depletion-Mediated Cytotoxicity. *Cancer Res*.77(15):4102-15. 査読あり
7. Tateishi K, Iafrate AJ, Ho Q, Curry WT, Batchelor TT, Flaherty KT, Onozato ML, Lelic N, Sundaram S, Cahill DP, Chi AS, Wakimoto H (2016) Myc-Driven Glycolysis Is a Therapeutic Target in Glioblastoma. *Clin Cancer Res*.22(17):4452-65. 査読あり
8. Tateishi K, Wakimoto H, Cahill DP (2017) *IDH1* Mutation and World Health Organization 2016 Diagnostic Criteria for Adult Diffuse Gliomas: Advances in Surgical Strategy. *Neurosurgery*.64(CN_suppl_1):134-8. 査読あり

9. Toriihara A, Ohtake M, Tateishi K, Hino-Shishikura A, Yoneyama T, Kitazume Y, Inoue T, Kawahara N, Tateishi U (2018) Prognostic implications of (62)Cu-diacetyl-bis (N(4)-methylthiosemicarbazone) PET/CT in patients with glioma. Ann Nucl Med.32(4):264-71. 査読あり

〔学会発表〕(計 18 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : Daniel P. Cahill (Massachusetts General Hospital)

ローマ字氏名 : Daniel Cahill

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。