

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09243

研究課題名(和文) BRCA変異がんの代謝特性解明と、治療・診断への応用

研究課題名(英文) Metabolisms in BRCA-deficient and -proficient ovarian cancer as new therapeutic and diagnostic target.

研究代表者

山田 秀和 (Yamada, Hidekazu)

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：10254012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 卵巣がんの代謝特性を解明し、新規治療標的として開発することを目的として研究を行った。具体的には、ゲノム上の全ての代謝遺伝子(代謝酵素だけでなく、関連が深い分子も含む)を対象とした、ゲノム編集スクリーニングを行った。2種の卵巣がん細胞株を用いたスクリーニングにより、その遺伝子のノックアウトが集団内での淘汰につながる代謝関連遺伝子を、CAOV3細胞にて42遺伝子、es2細胞では119遺伝子同定することができた。興味深いことに、それら遺伝子のうち33遺伝子は互いにオーバーラップしていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬標的化が可能なドライバー遺伝子変異が少ない卵巣がんにおいて、新規治療シーズの開拓は非常に重要である。本研究において取得した代謝(関連)遺伝子のリストは、卵巣がんの代謝脆弱ポイントを網羅すると予想され、今後、新たな標的治療への展開を期待できる。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is identifying metabolic vulnerability of ovarian cancer for the development of new molecular-targeting therapy in that cancer. To do so, we performed CRISPR/Cas9 screening using two ovarian cancer cell lines, namely CAOV3 and es2 cells. We identified 42 and 119 essential metabolic genes in CAOV3 and es2 cells, respectively. Importantly, 33 genes of them are overlapped. Mapping of the overlapping genes in metabolic network may represent pathway(s) whose inhibition result in cell-death of ovarian cancer.

研究分野： 婦人科腫瘍学

キーワード： 卵巣がん 標的治療 代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣がんでは創薬標的化が可能なドライバー遺伝子変異が少なく、新たな標的治療の開発が十分ではなかった。我々の研究グループは卵巣がんの代謝特性を明らかにし、新たな治療標的として開拓することを目標に研究をすすめてきた。予備的な検討から、NAD 合成阻害に対する感受性が、BRCA や関連経路の変異の有無によって異なることが示唆されていた。また、それとは別に、無バイアスの網羅的スクリーニングを行う準備をすすめていた。

### 2. 研究の目的

(1) がん代謝は、近年、新規治療標的としての開発が期待され、多くの研究がなされてきたが、臨床応用までに越えなければならないハードルは多い。その一つが代謝ネットワークの恒常性であり、少々の干渉では、代償経路の活性化やフィードバック等を介した緩衝作用によって、うまく回避されてしまうことが多い。そのような代謝ネットワークロバスト性が垣間見られる現象として、例えば、NAD 合成に対する応答が挙げられる。本課題では、NAD 合成阻害、とくに NAD サルベージ経路の遮断に対し BRCA 野生型と変異型の卵巣がん細胞が互いに感受性を異にすることに着目し、研究を行った。

(2) 一方、ゼロベースの遺伝子探索にも着手した。具体的には、ゲノム編集と次世代シーケンズ技術を基盤としたスクリーニングを、全代謝関連遺伝子を対象に実施することにした。

### 3. 研究の方法

#### (1) NAD 代謝阻害への感受性に関わるメカニズム

細胞株パネル：ヒト卵巣がん細胞 SKOV3、CAOV3、JHOC5、A2780、ES2、TOV112D、OV-MIU、OV-MANA、KURAMOCHI、JHOS2、JHOS4 株を用いた。

低分子阻害剤：NAD サルベージ阻害剤としては FK-866・GNE-617 を、PARP 阻害剤としては MK-4827 を使用した。

リアルタイム細胞増殖アッセイ：リアルタイム細胞増殖アッセイは、IncuCyte セルアナライザーを用いたタイムラプス画像取得・画像解析にて行った。

コロニー形成アッセイ：細胞を 12 穴プレートに播き、翌日から薬剤処理を開始した。薬剤処理の長さは、個々の細胞株がおおよそ 50 倍に増殖するのに要する日数とした。細胞を固定したのち、スルホローダミン B 色素にて染色し、相対的細胞数を算出した。

細胞外フラックス解析：酸素消費量および乳酸放出量の測定は、シーホース XF96 フラックスアナライザーを用いて行った。定常時の測定の後、ロテノンとアンチマイシンを添加し、同薬剤感受性の酸素消費をミトコンドリア酸素消費として算出した。測定後、細胞をスルホローダミン B にて染色し、補正值の算出に用いた。

酵素学的手法による代謝物の定量：細胞の NADt (NAD<sup>+</sup>と NADH の総和) 量、NADPHt (NADP<sup>+</sup>と NADPH の総和) 量の測定には、BioVision 社カラーアッセイキットを用いた。

#### (2) CRISPR スクリーニングによる卵巣がん代謝脆弱ポイントの解明

ヒト代謝関連遺伝子約 3000 遺伝子に対する sgRNA を組み込んだレンチウイルスライブラリー (~10 sgRNA/遺伝子、および ~100 コントロール sgRNA) を大量調整した。2 種の卵巣がん細胞株に上記ウイルスライブラリーを感染させ、未感染細胞を薬剤選択にて除いたのち、約 10 世代のポピュレーション選択を行った。選択前後の細胞からそれぞれ精製したゲノム DNA から sgRNA バーコード配列を PCR 増幅し、次世代シーケンズによって各バーコード配列の存在比を決定した。フィットネス解析を行って、その遺伝子の破壊が集団内での淘汰につながったと推定される遺伝子を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) NAD 代謝阻害への感受性に関わるメカニズム

コロニー形成試験により、NAD 合成阻害剤 (FK866、GNE-617) に対する細胞株パネルの感受性を調べた。FK866 に対する IC50 値と、GNE-617 に対する IC50 値は、よく相関していた (図 1c)。興味深いことに、BRCA 遺伝子変異の有無で比較すると、BRCA 変異なし (野生型) の株群の方が、NAD 合成阻害剤への感受性が高い傾向がみとめられた。これら結果を受け、NAD を基質とする DNA 修復関連分子、PARP 阻害剤に対する感受性も調べた。その結果、少なくとも調べた細胞株において、NAD 合成阻害への感受性と PARP 阻害への感受性は一致しないことが明らかになった。

NAD 合成阻害感受性規定因子を明らかにするため、FK866 処理に対する代謝応答をしらべ、感受性との相関がみられるか検討した。NAD 合成阻害剤 FK866 存在下あるいは非存在下にて 48 時間培養したのちの乳酸産生と酸素消費を計測した。大へん驚いたことに、BRCA1/2 遺伝子野生型の細胞株では FK866 処理によって乳酸産生が有意に減少したのに対し、BRCA 変異型細胞群では FK866 処理の影響がほとんど見られなかった。より重要なことに、FK866 処理によって減少する乳酸産生の減少度と FK866 感受性 (IC50 値) とが、有意に相関することが明らかになった。これら結果から、中心炭素代謝 (解糖系や TCA 回路) の応答が、NAD 合成阻害への感受性と相関す

ることが強く示唆された。

トランスクリプトームデータと FK866 感受性データとの比較から、PRPS1 遺伝子の発現が、NAD 合成阻害感受性の予測因子となることが示唆された。PRPS1 はペントースリン酸経路の代謝物から核酸合成の前駆体である PRPP を合成する酵素である。PRPP は NAD 合成の基質にもなっていることから、PRPS1 のノックダウンを行い、細胞の NAD レベル、増殖への影響をしらべた。PRPS1 siRNA のトランスフェクションによって、調べた 3 つの細胞株全てにおいて、NAD レベルの明らかな減少が観察された (図 1)。また、es2 細胞では細胞の変形、Tov112d 細胞では強い細胞死が誘導された。

3-days after siRNA transfection

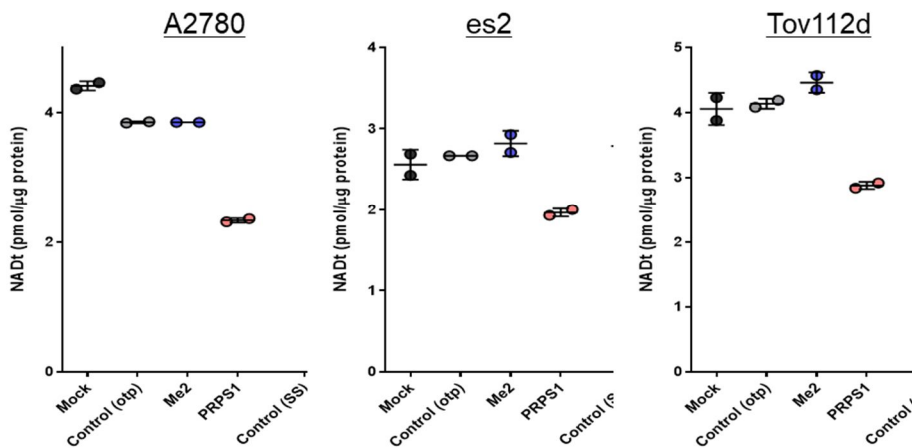


図 1 PRPS1 siRNA をトランスフェクションした卵巣がん細胞株での NAD レベル

(2) CRISPR スクリーニングによる卵巣がん代謝脆弱ポイントの解明

その遺伝子のノックアウトが集団内での淘汰につながる代謝関連遺伝子を、CAOV3 細胞にて 42 遺伝子、es2 細胞では 119 遺伝子同定することができた (図 2)。興味深いことに、それら遺伝子のうち 33 遺伝子は互いにオーバーラップしていた。この遺伝子群を MVOC-33 (Metabolic vulnerability of ovarian cancer 33 genes) と命名した。

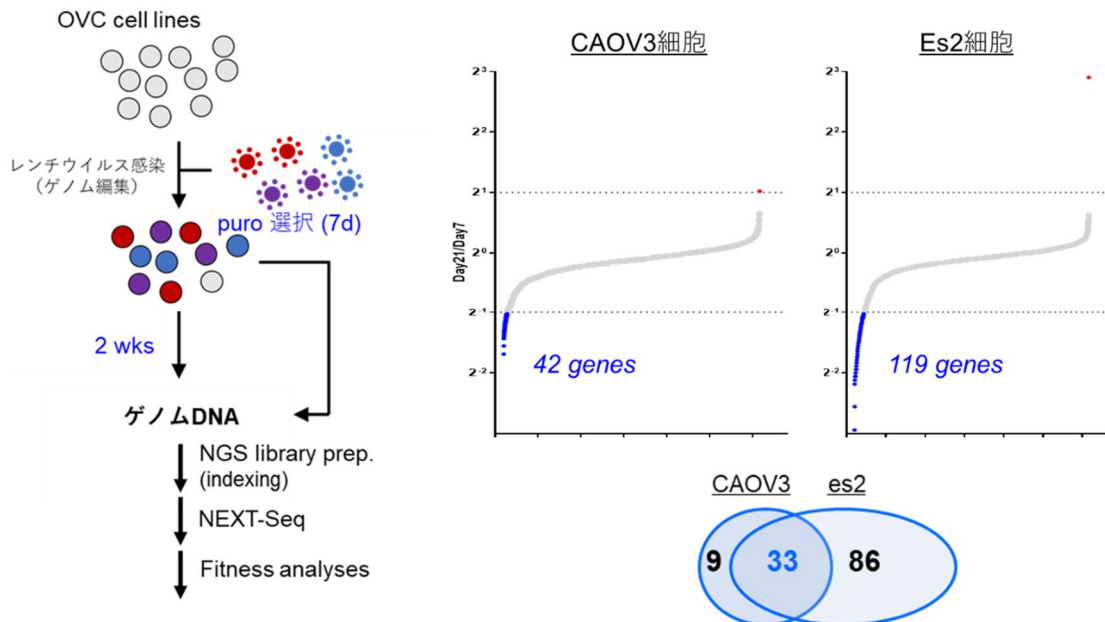


図 2 卵巣がん細胞株を用いた CRISPR スクリーニング

MVOC-33 の各遺伝子を、がん生物学上の意義が既に確立されているもの、他がん種等において研究が進行中のもの、がんとの関連が全く未知のもの、に分類し、後半グループについてさらに解析を行うこととした。それぞれに対する siRNA を合成し、各種阻害剤の収集を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kudo K, Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Morita M, Kawai M, Yamashita Y, Ito K, Yamada H, Shima H, Yaegashi N, Tanuma N.	4. 巻 594
2. 論文標題 Divergent metabolic responses dictate vulnerability to NAMPT inhibition in ovarian cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1379 ~ 1388
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe T, Soeda S, Nishiyama H, Kiko Y, Tokunaga H, Shigeta S, Yaegashi N, Yamada H, Ohta T, Nagase S, Shoji T, Kagabu M, Baba T, Shimizu D, Sato N, Terada Y, Futagami M, Yokoyama Y, Fujimori K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical and reproductive outcomes of fertility-sparing surgery in stage I epithelial ovarian cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 44-50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2019.1954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Soeda S, Furukawa S, Sato T, Ueda M, Kamo N, Endo Y, Kojima M, Nomura S, Kataoka M, Fujita S, Endo H, Takahashi T, Watanabe T, Yamada H, Fujimori K.	4. 巻 39
2. 論文標題 Pelvic Exenteration as Potential Cure and Symptom Relief in Advanced and Recurrent Gynaecological Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5631 ~ 5637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.13759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakurada S, Watanabe Y, Tokunaga H, Takahashi F, Yamada H, Takehara K, Yaegashi N.	4. 巻 48
2. 論文標題 Clinicopathologic features and BRCA mutations in primary fallopian tube cancer in Japanese women	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 794 ~ 798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyy095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa K, Inoue Y, Kakugawa Y, Yamashita Y, Kanazawa K, Kishimoto K, Nomura M, Momoi Y, Sato I, Chiba N, Suzuki M, Ogoh H, Yamada H, Miura K, Watanabe T, Tanuma N, Tachi M, Shima H.	4. 巻 109
2. 論文標題 Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-ras G12D-driven tumor promotion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2178 ~ 2187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13638	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田沼 延公  (Tanuma Nobuhiro)  (40333645)	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・主任研究員    (81303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関