

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07565

研究課題名（和文）がん特異的な栄養代謝経路におけるニコチンアミド代謝の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of nicotinamide metabolism in cancer-specific nutrient metabolic pathways

研究代表者

上野 将也（Ueno, Masaya）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：20334766

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：がんは、栄養素をエネルギーに変え旺盛な増殖能を発揮する一方で、ストレスに抗して生き残る機能も兼ね備えている。抗がん剤などのストレス応答には、様々な代謝調節機構が関与しており、がんを根治する治療薬の開発には、がん特有の代謝調節機構を解明する必要がある。本研究では、がんの生存や治療抵抗性におけるニコチンアミド代謝経路の機能を理解することで、がん特有の代謝調節機構の解明を目指した。本研究の遂行により、ニコチンアミド代謝経路から、治療抵抗性を誘導する代謝物や、逆に、抑制する代謝物を同定した。がんは、これらの代謝物のバランスを制御し、治療抵抗性を獲得していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの根治を目指した治療法の開発には、がん細胞の特性を知り、その制御を司る重要な分子を特定することが必要である。研究代表者らは、がん細胞の代謝調節に着目し研究を進め、ニコチンアミド代謝経路およびその代謝物が抗がん剤耐性に重要であることを明らかにした。これらの知見は、代謝経路の阻害剤と抗がん剤を組み合わせた新たな治療法の確立に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells convert nutrients into energy and show high proliferative capacity, but they also have the ability to resist stress for survival. Various metabolic regulatory mechanisms are involved in the stress response to anti-cancer treatments, and the development of drugs to cancer requires the elucidation of regulation mechanisms of cancer-specific metabolisms. In this study, we aimed to elucidate cancer-specific metabolisms by understanding the functions of nicotinamide metabolic pathways in cancer survival and anti-cancer drug resistance. Through this study, we identified metabolites from the nicotinamide metabolic pathway that induce or, conversely, suppress therapeutic resistance. It was suggested that cancers acquire therapeutic resistance by regulating the balance of these metabolites.

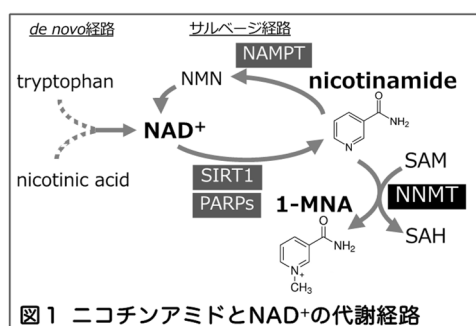
研究分野：がん細胞生物学

キーワード：がん 代謝 薬剤耐性 ニコチンアミド#12441;代謝

1. 研究開始当初の背景

がんにおける代謝制御の重要性は、ワーバーグ効果をはじめ、古くより議論されてきた。がん細胞は代謝リプログラミングにより、栄養素からエネルギーを産生し、旺盛な増殖を維持するとともに、ストレス応答を可能にしていることが認知されている。栄養素を感知するシグナルにおいて、mTOR キナーゼ複合体が中心的役割を担っている。mTOR キナーゼは、複数の制御因子と結合し、機能が異なる二つの複合体を形成する。mTOR 複合体 1 (mTORC1) は様々な栄養素を感知して活性化し、mRNA 翻訳や様々な代謝経路を調節することによって、がんの生存や悪性化に重要な役割を果たしている。一方、mTORC2 は細胞接着や細胞骨格を制御しているものの、代謝調節における機能は不明な点が多い。申請者は、mTORC2 の下流分子について、「CRISPR カスタムライブラリーを用いた機能スクリーニング法」を駆使し、分子標的薬(チロシンキナーゼ阻害剤 TKI)) 抵抗性の鍵分子として、ニコチンアミド代謝に関わる酵素を同定した。予備の実験で、がん細胞株で本分子を破壊すると、培養系では野生型と同様に増殖するにもかかわらず、生体内での増殖は極端に抑制されること、さらに本分子の欠損マウスは、ほぼ正常に成育することが観察され、本分子はがん特異的に、しかも生体内環境において必須であるという結果を得た(未発表)。さらに興味深いことに、本分子は抗がん剤耐性にも関与することが認められた。

ニコチンアミド代謝経路は、ニコチンアミドを出発物質として、様々な酵素が関わって進む代謝経路であるが、このニコチンアミドは、ビタミン B3 として食餌から摂取されるほか、トリプトファンやニコチン酸を原料とした NAD⁺ 合成経路からも供給されている(図 1)。NAD⁺ 合成経路はエネルギー代謝に中心的な役割を担っていることから、ニコチンアミド代謝経路が、がんの増殖や薬剤耐性に関わっていることが示唆されたが、がんにおける機能はほとんどわかっていなかった。従って、本研究では、がんにおけるニコチンアミド代謝経路の役割を解析し、この代謝経路がいかにがんの生存戦略に寄与しているのかを理解することを目指した。



2. 研究の目的

本研究では、ニコチンアミド代謝経路がいかにがんの生存と治療抵抗性に寄与しているのかを解明することを目的とした。ニコチンアミドは食餌から摂取されるほか、NAD⁺ サルベージ経路からも供給されており、ニコチンアミド代謝経路は、様々な代謝経路やシグナル分子とリンクしている。ニコチンアミドは、nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) 依存的に nicotinamide mononucleotide (NMN) へ、さらに NAD⁺ へと代謝される。がん細胞の NAD⁺ 合成はサルベージ経路に強く依存しており、NAMPT 阻害剤は細胞内 NAD⁺ を枯渇させて、様々ながん細胞株のアポトーシスを誘導する。NAD⁺ は補酵素として多くの酵素反応に寄与している。さらに、NAD⁺ は SIRT1 などの NAD⁺ 依存酵素の活性を制御している。SIRT1 は脱アセチル化酵素として、様々な遺伝子発現調節や蛋白修飾を介してがん動態制御に関与している。特に、TKI 耐性では必須の役割があることから、SIRT1 阻害剤が分子標的治療薬の耐性克服に寄与することが期待されている。

一方、ニコチンアミドは、nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) により 1-MNA に代謝され、SIRT1 の蛋白安定性に寄与している。また、ニコチンアミドそのものも SIRT1 の負の制御因子である。NNMT の活性亢進は、メチル基ドナーである S-(5'-Adenosyl)-L-methionine (SAM) の消費を促し、その細胞内濃度を低下させ、グローバルなヒストンのメチル化に変化を促し、WNT やミトコンドリア代謝を調節し未分化性の誘導・維持に寄与するという報告もある。以上の知見から、がんにおけるニコチンアミド代謝経路の機能を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に以下の方法で研究を遂行した。

研究 1 正常およびがん細胞でのニコチンアミド代謝経路の機能解析

代謝経路はさまざまな反応が代謝物を共有し、複雑に連携しているため、単に代謝物を測定するだけでは代謝の流れ（フラックス）を理解することはできない。そこで、安定同位体を用いたニコチンアミド代謝のフラックス解析法を確立した。代謝物の水素分子を重水素（deuterium）に置換した d-体は、天然体と分子量が異なるため、質量分析計で容易に区別することができる。d-体のニコチンアミド代謝物を培地に添加、あるいはマウスに投与し、その後、d-体に由来する下流の代謝物を質量分析計で経時的に測定した。

研究2 がんの増殖および治療抵抗性におけるニコチンアミド代謝経路の機能解析

予備的実験で、ニコチンアミド代謝に関わる酵素を欠損した細胞株は、コロニー形成の抑制と、TKI 感受性の亢進が認められた。また、免疫不全マウス皮下に移植する担がんモデルでは、野生型移植群と比べて本分子の欠損細胞株の腫瘍形成能が抑制され、さらに治療中断後の再発が著しく抑制された。そこで、本研究では、がんの増殖および治療抵抗性におけるニコチンアミド代謝経路の機能を詳細にするために、以下の項目を実施した。

- ① ニコチンアミド代謝に関わる酵素の欠損で変動する遺伝子発現解析：野生型および酵素欠損細胞に対して、RNA-seq 法で遺伝子発現プロファイリングを実施し、ニコチンアミド代謝経路が制御する遺伝子を同定した。
- ② ニコチンアミド代謝物の機能解析：ニコチンアミド代謝経路には複数の代謝物があるが（図 1）、各々の代謝物を抗がん剤と組み合わせるがん細胞を処理し、薬剤耐性を惹起する、あるいは抑制するか解析した。また、RNA-seq 法で遺伝子発現プロファイリングを実施し、代謝物の添加により発現が変動する遺伝子を同定した。
- ③ ニコチンアミド代謝物の動態解析：上記で、評価した代謝物について、その細胞内動態を d-体を用いたフラックス解析法で解析した。また、薬剤耐性に関わる分子を同定する目的で CRISPR/sgRNA ライブラリーを用いた drop-out スクリーニングを実施した。

4 . 研究成果

本研究の実施により、主に以下の成果が得られた。

1. d-体と LC/MS/MS を用いることで、*in vitro* および、*in vivo* のニコチンアミド代謝フラックスを解析できる実験系を確立した。
2. がん細胞が、特定のニコチンアミド代謝物を取り込み、これが、薬剤耐性を惹起することが示唆された。
3. 上記の代謝物の取り込みに関与するトランスポーターを同定した。
4. 遺伝子プロファイリングにより、ニコチンアミド代謝経路が、細胞の分裂や転移に関わる様々な遺伝子の発現調節に寄与していることが判明した。
5. 上述の代謝物とは対照的に、別の代謝物は、治療抵抗性を抑制する効果がみられ、二つの代謝物が相反する機能を持っていることが示唆された。

以上のことから、がん細胞は、ニコチンアミド代謝を制御することで、代謝物の量的バランスを制御し、これが治療抵抗性の獲得に寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pham Loc Thi, Peng Hui, Ueno Masaya, Kohno Susumu, Kasada Atuso, Hosomichi Kazuyoshi, Sato Takehiro, Kurayoshi Kenta, Kobayashi Masahiko, Tadokoro Yuko, Kasahara Atsuko, Shoulkamy Mahmoud I., Xiao Bo, Worley Paul F., Takahashi Chiaki, Tajima Atsushi, Hirao Atsushi	4. 巻 621
2. 論文標題 RHEB is a potential therapeutic target in T cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74～79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.06.089	査読の有無 無
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 Jing Yongwei, Kobayashi Masahiko, Vu Ha Thi, Kasahara Atsuko, Chen Xi, Pham Loc Thi, Kurayoshi Kenta, Tadokoro Yuko, Ueno Masaya, Todo Tomoki, Nakada Mitsutoshi, Hirao Atsushi	4. 巻 113
2. 論文標題 Therapeutic advantage of targeting lysosomal membrane integrity supported by lysophagy in malignant glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2716～2726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15451	査読の有無 無
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 Nomura N, Ito C, Ooshio T, Tadokoro Y, Kohno S, Ueno M, Kobayashi M, Kasahara A, Takase Y, Kurayoshi K, Si S, Takahashi C, Komatsu M, Yanagawa T, Hirao A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1666
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81076-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueno Masaya, Tomita Takuya, Arakawa Hiroshi, Kakuta Takahiro, Yamagishi Tada-aki, Terakawa Jumpei, Daikoku Takiko, Horike Shin-ichi, Si Sha, Kurayoshi Kenta, Ito Chiaki, Kasahara Atsuko, Tadokoro Yuko, Kobayashi Masahiko, Fukuwatari Tsutomu, Tamai Ikumi, Hirao Atsushi, Ogoshi Tomoki	4. 巻 3
2. 論文標題 Pillar[6]arene acts as a biosensor for quantitative detection of a vitamin metabolite in crude biological samples	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42004-020-00430-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 1 メチルニコチンアミドの測定方法及びニコチンアミド-N-メチル基転移 酵素阻害剤のスクリーニング方法	発明者 平尾敦、生越友樹、 上野将也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-174186	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------