

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20795

研究課題名(和文)「がん代謝」を標的とした、神経芽腫に対する新規治療の創出と抵抗性の克服

研究課題名(英文) Generating novel therapies for neuroblastoma by targeting cancer metabolism and overcoming its resistance

研究代表者

渡邊 健太郎 (Watanabe, Kentaro)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経芽腫の「がん代謝」の性質を利用した治療法の可能性を追求することを目的とし、投薬時の腫瘍細胞の反応を観察することにより、最適な併用療法について探求することを主眼としている。マウスを用いた動物実験により、候補薬剤の投与により腫瘍細胞に生じる遺伝子発現の変動を網羅的に観察した。投薬により腫瘍細胞の増殖に関わる細胞内活動の低下がみられるとともに、特定の代謝経路が逆に増強されていることも観察された。この結果は候補薬剤の作用メカニズムの検証と同時に併用療法の新たな標的を示すものであり、今後はこの結果を踏まえて最適な併用療法の探索を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫のうち半数程度を占める高リスク例の予後は未だ不良であり、濃厚な治療に伴う合併症も問題である。また、病因となるドライバー遺伝子の検出される割合が低く、標的治療の効果が期待し辛いことから、他のアプローチによる新規治療の創出が求められている。本研究は正常細胞とがん細胞の性質の差の一つである「がん代謝」の性質を利用しており、既存の化学療法の効果乏しい例に対する新たな治療法の創出につながる可能性がある。また、複数の経路の同時阻害による治療の最適化は、治療対象の拡大や効果の増強に結びつくものであり、将来的な臨床への還元に資する成果である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to explore the possibility of treatment based on the "cancer metabolism" characteristics of neuroblastoma. By observing the response of tumor cells upon drug administration, we focused on exploring optimal combination therapies. Animal experiments using mice were conducted to comprehensively observe the changes in gene expression that occur in tumor cells upon administration of the candidate drug. We observed that the drugs reduced intracellular activities involved in tumor cell proliferation, and at the same time, reversely enhanced specific metabolic pathways. The results of this study provide a new target for combination therapy as well as verification of the mechanism of action of the candidate drugs, and we will continue our search for the optimal combination therapy based on these results.

研究分野：腫瘍学

キーワード：神経芽腫 小児がん がん代謝

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児の悪性固形腫瘍のうち脳腫瘍について多く発生する¹。このうち半数程度を占める高リスク例においては、集学的治療にもかかわらず未だ長期生存率は4割程度にとどまっている。また、濃厚な治療に伴う短期的・長期的合併症も問題であり、効果の高く合併症の少ない新規治療が求められている。

研究代表者らは、先行研究にて DNA メチル化データ・遺伝子発現データの統合的な解析と細胞実験・動物実験の結果から、神経芽腫において PHGDH 遺伝子の発現増強による「がん代謝」の一つであるセリン産生の亢進が新たな治療標的となりうることを示した。また、*in vitro* の培養細胞の環境において、PHGDH 阻害剤などががん代謝に干渉する薬剤の投薬後の細胞の遺伝子発現状況を観察し、「がん代謝」への干渉が細胞内活動に与える影響の検証を行った。セリン産生亢進などの「がん代謝」はがん細胞に特有の性質であるため²、これを標的とした治療は正常細胞への影響が少なく、副作用の少ない治療に結びつく可能性がある。

一方で、*in vivo* の生体内環境においては、*in vitro* の培養細胞環境と薬剤への反応が若干異なることが観察され、候補薬剤が *on target effect* であることの証明が改めて必要であると考えられた。また、他のがんに対する先行研究において、「がん代謝」を利用した治療は耐性が出現しやすく、単独での効果が限定的であることがしばしば問題となっている³。これは投薬に伴うがん細胞の代償作用が生じることで、治療効果が緩和されがん細胞が生存してしまうことが原因と考えられている。

これらの課題を解決する手段として、動物実験において投薬後の腫瘍細胞の観察を行うことが考えられる。候補薬剤がもたらす治療効果のメカニズムの検証が *in vivo* でより正確に行うことができるのと同時に、投薬時に細胞が呈する代償作用を観察し、その作用をさらに阻害する何らかの治療を併用することで、治療効果を増強できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、「がん代謝」を標的とした候補薬剤が神経芽腫細胞に対して与える治療効果を *in vivo* で観察し、候補薬剤の治療におけるメカニズムを検証すること、さらに、投薬に伴ってがん細胞が呈する代償作用を観察することで、併用すべき薬剤候補の選出を進めることを目的とした。これらの知見を収集することで、最終的には臨床における効果が高く副作用の少ない新規治療戦略の創出に資することを目指している。

3. 研究の方法

本研究はマウスを用いた動物実験を主な研究手段とした(図1)。

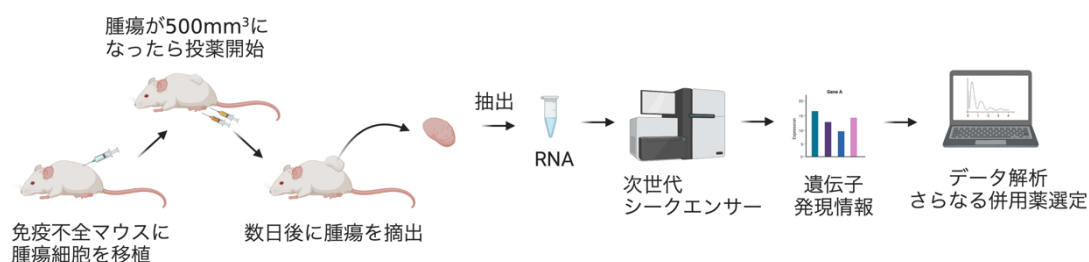


図1. 研究の方法。マウスモデルを用いた腫瘍に対する投薬実験と摘出腫瘍の解析を行う。

腫瘍モデルマウスの作成と投薬実験

NOG マウスの皮下に神経芽腫の腫瘍細胞を注射し、腫瘍が生着して腫瘍の形成が行われた時点から PHGDH 阻害剤である NCT-503 もしくは対照となる溶媒の腹腔内投与を行う。明らかな腫瘍サイズの治療による差が観察されるタイミングでは投薬群での腫瘍の液状化・壊死がみられてしまうことから、それよりも早い時点での摘出が必要であり、予備実験により最適な投薬日数及び観察期間の設定を行った。マウスの安楽死後に腫瘍の摘出を行った。

摘出腫瘍から抽出した RNA を用いた発現解析

摘出腫瘍から RNA を抽出し、品質確認の後に次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスを実施した。Genomon パイプラインを用いたアラインメントの後に、得られたリード数に対して DESeq2 を用いて正規化し、遺伝子発現のマトリックスデータを作成した。

遺伝子発現データに対する遺伝子セット解析

データをもとに投薬群と非投薬群の遺伝子発現を比較し、発現変動遺伝子の抽出を行った。また、Gene set enrichment analysis (GSEA)を行い、投薬に伴う細胞内活動や、薬物耐性、代謝経路などに関わる各遺伝子セットの変動を解析した。これらの結果を先行研究で取得した *in vitro* のデータや既存の細胞内活動経路と比較検証することで、薬剤の効果のメカニズムの解釈検討と、併用薬剤候補の検討を実施した。

4. 研究成果

(1) *in vivo* での投薬後腫瘍細胞解析の系の確立

投薬後の抽出腫瘍の解析を行うにあたり、最適な投薬日数および抽出までの観察日数の検討を行った。先行研究で腫瘍サイズを指標とした治療効果を観察するために 1 週間以上の投薬を行った際の抽出腫瘍では腫瘍の液化化や縮小が明らかで、既に広範な細胞死がみられていると考えられることから、より短い日数を念頭に条件検討を反復した。これにより、腫瘍の壊死を生じる前の抽出腫瘍標本の確保と保存が可能な系を確立した。

(2) PHGDH 阻害剤の腫瘍にもたらす治療効果の *in vivo* での検証

投薬後の抽出腫瘍から抽出した RNA を用いた発現データをもとに GSEA を実施し、投薬群、非投薬群で enrichment されている経路をそれぞれ抽出した。このうち、非投薬群で enrichment されている経路は、投薬群で減弱している遺伝子群であることから、主に投薬により腫瘍細胞が受けているダメージを反映していると考えられる。KEGG の遺伝子セットを対象に解析を行った際に上位に抽出された経路として、Focal adhesion, Tight junction, MAPK signaling pathway, WNT signaling pathway, NOTCH signaling pathway, Pathways in cancer といった細胞機能に関連した経路が挙げられており、細胞死に向かう際の特異的でない反応を含んでいると考えた。

(3) PHGDH 阻害剤に対して腫瘍細胞が呈する代償作用の *in vivo* での観察

一方で、投薬群で enrichment されている経路は、より特異的な細胞の反応を示している可能性が高い。特に、投薬に対する代償作用として亢進している経路が含まれていると考えられる。具体的には KEGG の遺伝子セットのうち Ribosome, Oxidative phosphorylation, proteasome, protein export, peroxisome といったセットの亢進が上位に抽出された。リボソーム関連遺伝子の機能亢進は、細胞障害に対抗する何らかのタンパク合成亢進などの可能性が考えられる。PHGDH は解糖系から分岐する代謝の分枝であるセリン産生経路を亢進させることから、PHGDH 阻害剤による酸化的リン酸化経路の亢進はセリン産生経路への分枝が弱まることによる解糖系のエネルギー産生経路の増強を反映していると考えられ、PHGDH 阻害剤が on target effect を呈していることを示している。プロテアソーム、ペルオキシソームの経路の亢進はそれぞれタンパク質分解、脂質代謝の亢進を示唆するため、投薬によるダメージに対応するための細胞の反応であることが考えられる。

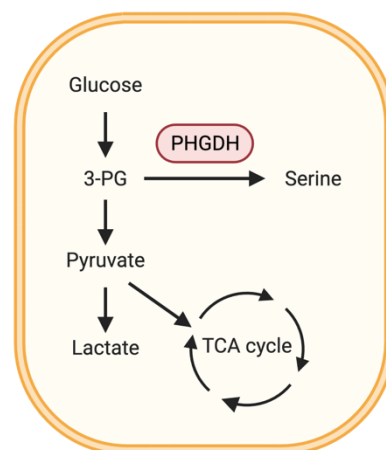


図 2. PHGDH と解糖系

(4) PHGDH 阻害剤と併用する薬剤の候補の抽出

これらの亢進している機能を阻害する薬剤が、PHGDH との併用薬剤の候補となりうる。具体的には、リボソーム機能亢進に対しリボソーム機能を阻害する一部の抗生剤や、プロテアソーム機能亢進に対するプロテアソーム阻害剤などが候補となると考えられる。実際の併用効果の検証については今後の細胞実験・動物実験を要する。

参考文献

1. Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and practice of pediatric oncology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
2. Newman AC, Maddocks ODK. Serine and Functional Metabolites in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2017;27(9):645-657.
3. Kremer JC, Prudner BC, Lange SES, et al. Arginine Deprivation Inhibits the Warburg Effect and Upregulates Glutamine Anaplerosis and Serine Biosynthesis in ASS1-Deficient Cancers. *Cell Rep.* 2017;18(4):991-1004.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe K, Kimura S, Seki M, Isobe T, Kubota Y, Sekiguchi M, Sato-Otsubo A, Hiwatari M, Kato M, Oka A, Koh K, Sato Y, Tanaka H, Miyano S, Kawai T, Hata K, Ueno H, Nannya Y, Suzuki H, Yoshida K, Fujii Y, Nagae G, Aburatani H, Ogawa S, Takita J.	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of the ultrahigh-risk subgroup in neuroblastoma cases through DNA methylation analysis and its treatment exploiting cancer metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4994 ~ 5007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02489-2	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Watanabe, Shunsuke Kimura, Masafumi Seki, Tomoya Isobe, Yasuo Kubota, Masahiro Sekiguchi, Mitsuteru Hiwatari, Yusuke Sato, Hiroko Tanaka, Satoru Miyano, Tomoko Kawai, Kenichiro Hata, Hiroo Ueno, Yasuhito Nannya, Hiromichi Suzuki, Kenichi Yoshida, Yoichi Fujii, Seishi Ogawa, Motohiro Kato, Junko Takita.
2. 発表標題 Treatment of neuroblastoma targeting serine and arginine metabolism.
3. 学会等名 The 53rd Congress of the International Society of Pediatric Oncology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊健太郎、木村俊介、樋渡光輝、加藤元博、宮野悟、上野浩生、南谷泰仁、油谷浩幸、小川誠司、滝田順子
2. 発表標題 DNAメチル化解析による神経芽腫11q LOH群内の超予後不良群の同定と、その「がん代謝」の特徴を利用した新規治療
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

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

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