

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20811

研究課題名（和文）細胞内メタボロームに着目した抗癌剤耐性尿路上皮癌に対する新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）New Treatment Strategy for Chemoresistant Urothelial Carcinoma Regarding of Metabolic Reprogramming

研究代表者

茂田 啓介（SHIGETA, KEISUKE）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：10649875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、尿路上皮癌における抗癌剤耐性後の代謝リプログラミング機構を明らかにした。UC野生株、CDDP耐性株、GEM耐性株の3細胞における水溶性代謝産物の網羅的定量解析を行った。結果、GEM耐性株の代謝機構はCDDP耐性/野生株と異なり、1)解糖系（ピルビン酸/乳酸）代謝産物の産生量が有意に高いこと、2)ペントースリン酸回路の主経路であるピリミジン代謝経路に関連する代謝産物量が高いこと、3)-ケトグルタル酸、イソクエン酸、クエン酸の産生量が有意に高く、クエン酸回路（TCA cycle）が一部「逆行性」に駆動していること(reductive TCA cycle)を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌細胞は抗癌剤暴露の過程で細胞内代謝機構をリプログラミングすることで抗癌剤耐性機構を獲得することが分かった。IDH2阻害によるHif1- α の制御が難治癌を克服する新規治療標的になりうることを示唆された。IDH2阻害薬は悪性脳腫瘍や再発性急性骨髄性白血病の一部臨床応用が開始されていることから、今後IDH2を標的とした新規治療法の開発は治療選択の乏しい抗癌剤耐性UC患者への予後向上に向けて大きく寄与すると考えている。

研究成果の概要（英文）： We found a unique metabolism in chemo resistant urothelial carcinoma UC). One key finding is the increased glycolytic flux observed in gemcitabine-resistant UC cells. This metabolic reprogramming promotes the activation of the pentose phosphate pathway (PPP), leading to enhanced pyrimidine biosynthesis. Consequently, there is an increase in the production of deoxycytidine triphosphate (dCTP), which competitively inhibits the therapeutic effects of gemcitabine. The study also identified the induction of reductive carboxylation flux of glutamine to citrate, a process known as the "reductive tricarboxylic acid (TCA) cycle," in gemcitabine-resistant UC cells. This phenomenon is mediated by the expression of the enzyme IDH2, which leads to the accumulation of 2-hydroxyglutarate (2-HG). The accumulation of 2-HG stabilizes hypoxia-inducible factor 1-alpha (Hif1- α), establishing an aerobic metabolic reprogramming in gemcitabine-resistant UC.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：尿路上皮癌 抗癌剤耐性 代謝リプログラミング IDH2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌は不均一性(Tumor heterogeneity)を保ちながら絶えず悪性度の高いサブクローンに進化を続けることで治療抵抗性を獲得していく。癌における抗癌剤耐性もその一つと考える。膀胱癌(Urothelial Carcinoma: UC)は米国NCIが示す世界的なcommon cancerの1つであり、泌尿器科癌の中で最も難治性である。難治性UCにおける標準化学療法は代謝拮抗薬 Gemcitabine(GEM) + プラチナ製剤 Cisplatin(CDDP)(GC)療法が1st lineとして位置づけられているが長期暴露による耐性化が問題である。申請者らは抗癌剤耐性の原因をさぐるべく、2種の抗癌剤耐性株(CDDP耐性:CR、GEM耐性:GR)を樹立した。そこで、CDDP耐性UC細胞ではミトコンドリアの活性が野生株より有意に亢進しており、細胞内に酸素を要求する好気代謝に依存している事を確認した。一方、GEM耐性株はCDDP耐性株と異なり、1%O₂下でも細胞増殖が可能であること、ミトコンドリアの活性が有意に低下していることからCDDP耐性機構とは異なった、エネルギー代謝機構を形成していると予想した。すなわち、難治UC細胞では抗癌剤暴露の過程で、癌細胞内メタボロームを巧みに構造変化させることで抗癌剤耐性を獲得すると予想された。しかし、現時点で膀胱癌細胞における長期抗癌剤暴露による細胞内代謝機構の網羅的構造変化について深く考察されていない。UC細胞において抗癌剤の長期暴露は細胞内代謝機構をどのように変化させ、難治性獲得に至るのか？抗癌剤耐性前後の細胞内メタボローム変化に着目した新規治療標的はないか？これが本研究における学術的「問い」であった。

2. 研究の目的

本研究は、抗癌剤の長期暴露により形成された癌細胞内代謝リプログラミング機構に着目し、難治性膀胱癌患者への新規治療戦略を構築する事である。

3. 研究の方法

(1)メタボローム解析による膀胱癌野生株と抗癌剤耐性株間の代謝動態比較

当教室では、膀胱癌細胞株T24とUMUC3を使用し、12か月間CDDPとGEMに暴露したCDDP耐性株(T24CR、UMUC3CR)とGEM耐性株(T24GR、UMUC3GR)をそれぞれ樹立している。これら2種の細胞株を本学医科学研究室に配備されているメタボロミクスコアを用いて野生株、耐性株間のメタボローム解析を行う。

(2)膀胱癌GEM耐性株における解糖系 五炭糖経路迂回による抗癌剤耐性機構構築の検証

申請者らは解糖系から五炭糖経路(PPP:ペントースリン酸経路)に誘導する酵素であるTIGAR、TKT(トランスケラーゼ)の発現亢進とNAPDHの産生量の亢進、さらにはヌクレオシドの増生に関する酵素CTPS1(CTP synthase 1)の発現亢進を確認している。GEM耐性下では好気代謝が抑制される一方で解糖系PPP解糖系と糖代謝が一部PPP回路に迂回する経路の可能性を考えた。以上より、解糖系からPPP回路に誘導する代謝産物を野生株、耐性株で比較することを行う。

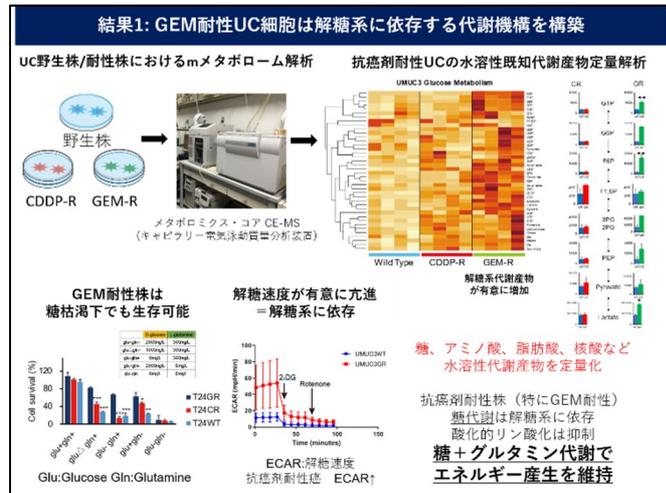
(3) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH1/2)を標的としたメタボローム制御の検証

過去の報告において、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1/2(IDH1/2)は低酸素下で糖代謝をグルタミン代謝に置換し、嫌気代謝下でのATP産生に寄与する事が知られている。よって、抗癌剤耐性株におけるIDH1/2の発現は一連の低酸素シグナルのmaster triggerとなっている可能性が高いことからIDH1/2をknock downすることで、Hif1-をはじめとした嫌気酵素群の発現が一律制御されるかどうかを遺伝子、蛋白レベルで確認する。

4. 研究成果

1) GEM 耐性 UC 株は、野生株/CDDP 耐性株と比較し、好気下で解糖系が亢進している。

2 種の膀胱癌細胞株で CDDP/GEM 耐性細胞株をそれぞれ樹立し、これら細胞株を野生株とともにメタボロミクスコア CE-MS(キャピラリー電気泳動質量分析装置)を用いてメタボローム解析を行い、水溶性代謝産物の全貌を定量化すると同時に、安定同位体 ^{13}C で標識した糖代謝産物のリアルタイムの代謝動態を確認した。メタボローム解析の結果、GEM 耐性下では、



解糖系とペントースリン酸経路 (PPP) に関する代謝産物の増加を認め、好気下において解糖系の亢進を認めた。一方、ミトコンドリア内では、グルタミンを代替エネルギー源として使用し、グルタミン クエン酸産生が促進する逆行性 TCA サイクルの駆動が示唆された。また、解糖系酵素群である TKT、CTPS1 は GEM 耐性下で一律発現上昇を認めており、CDDP 耐性下には見られない代謝リプログラミング機構を獲得しエネルギーチャージを行っていることが示唆された。

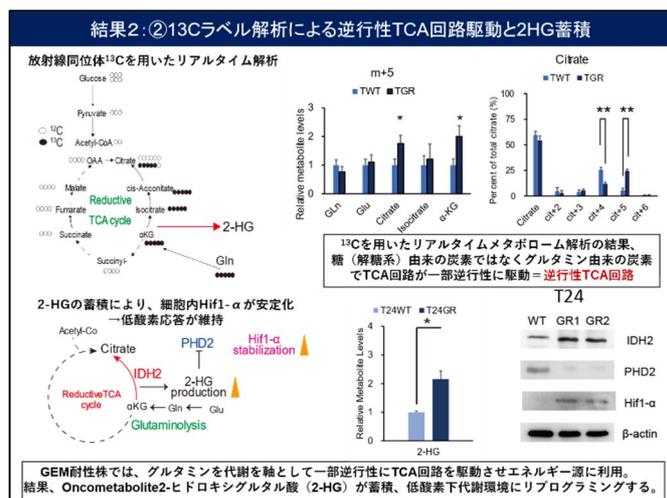
2) 逆行性 TCA 回路の駆動により、Oncometabolite 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が蓄積し、細胞内 Hif1-α を安定化させる。

メタボローム解析結果から、TCA 回路内の α -ケトグルタル酸、イソクエン酸、クエン酸の産生量が有意に高く、クエン酸回路 (TCA cycle) が一部「逆行性」に駆動している可能性 (reductive TCA cycle) を疑った。

次に細胞内代謝キットを用いて oncometabolite である 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) の産生量を測定した結果、GEM 耐性株は野生株と比較し優位

に 2-HG 量が高かった。2-HG は oncometabolite に代表される代謝産物であり、逆行性 TCA 駆動の際にのみ蓄積される代謝産物である。さらに 2-HG は細胞内 Hif-1 α をユビキチン化する PHD2/EGLN1 を分解することで細胞内 Hif-1 α 濃度を安定化させていることがわかった。

その結果、糖代謝の大部分が嫌気解糖系にシフトすることで GEM に競合作用を持つデオキシシチジン三リン酸 (dCTP) が産生されると同時に、強力な還元物質 NADPH が産生されることで抗酸化能が増強され、CDDP への抗腫瘍効果をも無力化する防御機構を備えることがわかった。



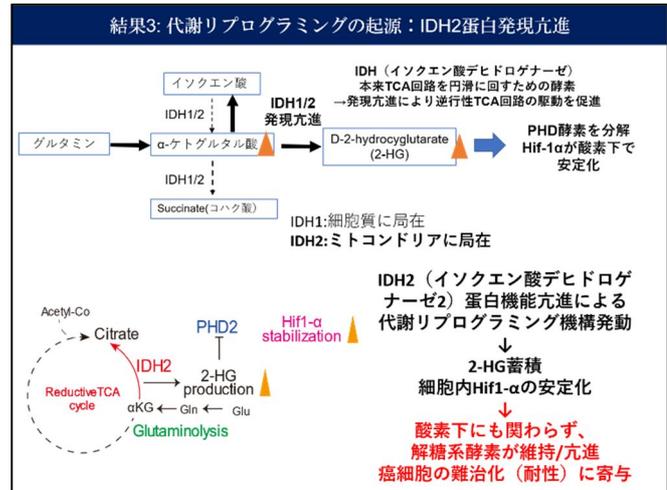
3) 代謝リプログラミングの起源：IDH2 蛋白発現亢進

regulator である。

次に、一連の代謝リプログラミング機構の起源に代謝リプログラミング機構として知られるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2 (IDH2) に着目した。IDH2 蛋白を野生株 UC 細胞に over expression する in vitro 実験を行った結果、解糖系、PPP 回路の代謝産物の有意な上昇に加え、Hif-1 をはじめとする嫌気解糖系酵素が有意に産生されることを確認した。IDH2 蛋白を siRNA で knock

down したところ、逆行性 TCA 回路の駆動を阻害し 2-HG の蓄積が失われることで細胞内 Hif-1 α の分解が促進され、糖代謝を嫌気解糖系にシフトできなくなることを確認した。

以上の結果から、IDH2 は抗癌剤耐性 UC の代謝リプログラミング機構を制御する master regulator であると考えられた。IDH2 阻害薬は悪性脳腫瘍や再発性急性骨髄性白血病に一部臨床応用が開始されていることから、今後 IDH2 を標的とした新規治療法の開発は治療選択の乏しい抗癌剤耐性 UC 患者への予後向上に向けて大きく寄与すると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shigeta Keisuke, Matsumoto Kazuhiro, Ogihara Koichiro, Murakami Tetsushi, Anno Tadatsugu, Umeda Kota, Izawa Mizuki, Baba Yuto, Sanjo Tansei, Shoji Kazunori, Tanaka Nobuyuki, Takeda Toshikazu, Morita Shinya, Kosaka Takeo, Mizuno Ryuichi, Arita Yuki, Akita Hirotaka, Jinzaki Masahiro, Kikuchi Eiji, Oya Mototsugu	4. 巻 40
2. 論文標題 Does neoadjuvant chemotherapy have therapeutic benefit for node-positive upper tract urothelial carcinoma? Results of a multi-center cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 105.e19 ~ 105.e26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2021.07.029	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 Shigeta Keisuke, Matsumoto Kazuhiro, Takeda Toshikazu, Hattori Seiya, Kaneko Gou, Matsushima Masashi, Abe Takayuki, Tanaka Nobuyuki, Mizuno Ryuichi, Asanuma Hiroshi, Kikuchi Eiji, Oya Mototsugu	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluating the Oncological Outcomes of Pure Laparoscopic Radical Nephroureterectomy Performed for Upper-Tract Urothelial Carcinoma Patients: A Multicenter Cohort Study Adjusted by Propensity Score Matching	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 465 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09046-9	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 Shigeta Keisuke, Hasegawa Masanori, Hishiki Takako, Naito Yoshiko, Baba Yuto, Mikami Shuji, Matsumoto Kazuhiro, Mizuno Ryuichi, Miyajima Akira, Kikuchi Eiji, Saya Hideyuki, Kosaka Takeo, Oya Mototsugu	4. 巻 42
2. 論文標題 IDH2 stabilizes HIF-1 -induced metabolic reprogramming and promotes chemoresistance in urothelial cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 1-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022110620	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shigeta K, Hasegawa M, Kosaka T, Matsumoto K, Mizuno R, Miyajima A, Kikuchi E, Oya M
2. 発表標題 Isocitrate dehydrogenase 2 Regulates Intracellular Metabolic Reprogramming in Chemo-resistant Urothelial Carcinoma
3. 学会等名 36th EAU Annual Congress, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeta K, Kikuchi E, Hasegawa M, Matsumoto K, Kosaka T, Mizuno R, Mikami S, Oya M
2. 発表標題 Gemcitabine Resistant Urothelial Cancer Cell may Acquire Cross Resistance to Cisplatin via Intracellular Metabolic Reprogramming
3. 学会等名 35th EAU Annual Congress, 2020 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shigeta K, Kikuchi E, Hasegawa M, Matsumoto K, Kosaka T, Mizuno R, Mikami S, Oya M
2. 発表標題 Gemcitabine Resistant Urothelial Carcinoma Acquires Cross Resistance to Cisplatin by Altering Intracellular Metabolism
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
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
---------	---------