

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18442

研究課題名(和文) 核酸代謝阻害との合成致死性に基づいた新しい神経芽腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatments for neuroblastoma based on the synthetic lethality

研究代表者

清成 信一 (KIYONARI, Shinichi)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：70570836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児がんの一種である神経芽腫のなかでも悪性度の高いMYCN遺伝子増幅型がんに対する効果的な治療標的を探索するために「合成致死」のアプローチを用いた。独自の遺伝子ノックダウンスクリーニングの結果、dTTP生合成経路に関わる酵素群の一部が新規な合成致死遺伝子の候補であることが判明した。特異性の高い酵素阻害剤が利用可能な場合はMYCN増幅型の神経芽腫細胞に対する選択的な細胞増殖抑制効果を検討した。阻害剤が存在しない場合にはsiRNAを用いた遺伝子ノックダウンによりその効果を検証した。一連の研究の結果から、既存の核酸代謝阻害剤の有効性が確認され、適応拡大への基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：MYCN gene amplification clearly correlates with poor prognosis in patients with pediatric cancer, neuroblastoma. Recently, synthetic lethal (SL) approaches are emerging as a promising strategy for MYCN-amplified neuroblastoma therapy. Therefore, we performed a genome-wide shRNA library screening to identify new candidate genes. Based on our experimental validations using siRNA and chemical inhibitors, some enzymes involved in nucleic acid metabolism were proposed to be new SL targets. Our result suggest that repositioning of existing agents would be worth considering as a new therapeutic strategy. Moreover, finding new chemical inhibitors of new SL targets is important for therapeutic development.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：合成致死 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

小児がんの一種である神経芽腫では患者の約20%で MYCN 遺伝子の増幅が認められ、きわめて予後不良であることが知られている。しかしながら、この MYCN 増幅型の神経芽腫に対しても区別なくシスプラチンなどの成人がん用の抗がん剤が用いられており、不可逆的な副作用や治療率が頭打ちであることが問題となっている。そのため、MYCN 増幅型の神経芽腫の特性を踏まえた安全かつ治療効果の高い新規分子標的薬の開発が望まれている。MYCN の遺伝子産物である N-Myc は c-Myc と同様に転写因子として働き、核酸代謝や細胞分裂に関わる様々な遺伝子群の発現を調節している。一般に転写因子の機能を低分子量の化合物で阻害することは難しい。そのため、特定の遺伝子の機能阻害によって正常細胞には影響を与えないが、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞においてのみ致死的に働く遺伝子、いわゆる「合成致死」遺伝子の探索とその治療応用は有効な解決策と考えられている。

2. 研究の目的

本研究開始までに研究代表者は独自に網羅的な遺伝子ノックダウンスクリーニングを実施し、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞における合成致死遺伝子の候補群を同定していた。具体的には約 18,000 遺伝子を標的とする市販の shRNA ライブラリーを MYCN 増幅型の細胞株・IMR-32 と MYCN 正常型の細胞株・SH-SY5Y に導入し一定期間培養した後、染色体 DNA に組み込まれた shRNA 配列を次世代シーケンシングにより検出、定量して IMR-32 で有意に存在量が低下した shRNA 配列とその標的遺伝子を同定した。この結果、既に報告のあるカゼインキナーゼ1などの合成致死遺伝子に加え、細胞分裂期において重要な役割を果たす遺伝子群や DNA 合成に必須のデオキシチミジン三リン酸 (dTTP) の生合成経路 (図1) に関与する遺伝子群が新たな合成致死遺伝子であることを見いだした。

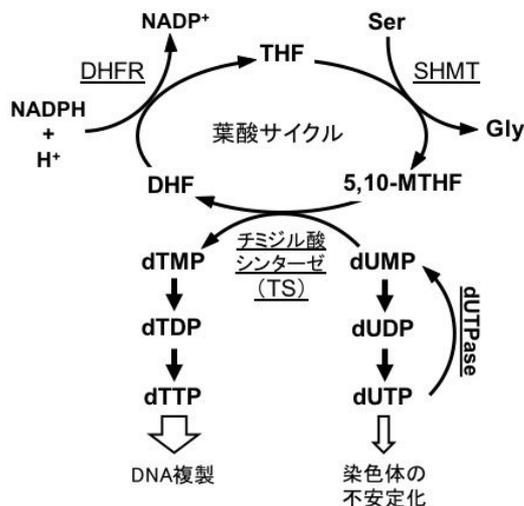


図1 dTTP 生合成経路

なお、dTTP 合成経路に関与する酵素のなかでもチミジル酸シンターゼを標的とする 5-フルオロウラシルやジヒドロ葉酸レダクターゼを標的とするメトトレキサートは各種のがんに対する治療薬として古くから使用されているものの、神経芽腫に対する有効性は確認されていない。そこで、本研究では MYCN 増幅型の神経芽腫細胞に対する上記の核酸代謝阻害剤の有効性を確認することで適応拡大の可能性を探る。また、dTTP 生合成経路のなかでも、これまで阻害剤が開発されていない新規な候補分子について治療標的としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

特許等の関係で新規に発見した候補分子名を明らかにできないが、図1に示す dTTP 生合成経路に関わる遺伝子をノックダウンすることで新規 DNA 合成が阻害され、がん細胞の増殖が停止する。また、dTTP 量の低下にともなってデオキウリジン三リン酸 (dUTP) 量が相対的に増加し、dTTP の代わりに誤って DNA 合成に用いられることがある。通常、DNA 中にはウラシル塩基は存在しないため、ウラシル DNA グリコシラーゼなどによる除去修復反応により除去される。このとき、核酸代謝阻害剤の影響により大量のウラシル塩基が存在する場合には、除去修復反応の一過程である DNA の一本鎖切断が蓄積して細胞死が誘導されることも作用機序の一つであるとされている。

本研究では新規の候補分子については主に siRNA による遺伝子ノックダウン実験によって神経芽腫細胞に対する細胞増殖抑制効果を確認した。その一方で、このような新規分子に対する特異性の高い低分子阻害剤は存在しないため、5-フルオロウラシルやメトトレキサートなどの既存の核酸代謝阻害剤を利用して MYCN 増幅型あるいは MYCN 正常型の神経芽腫細胞に対する効果を比較検討した。また、分子メカニズムの解明に向けて阻害剤処理時の DNA 二本鎖切断損傷の発生をリン酸化型ヒストン H2AX、アポトーシス性の細胞死を cleaved-PARP の生成を指標として評価を行った。また、染色体 DNA 中のウラシルの存在量を質量分析器 (LC-MS/MS) によって定量する系の構築を行った。

4. 研究成果

(1) 核酸代謝拮抗剤の効果

現在、消化器系や呼吸器系のがんで広く用いられる 5-フルオロウラシルおよび古くから用いられている代謝拮抗剤であるメトトレキサートについて様々な神経芽腫細胞に対する細胞増殖抑制効果を試験した。その結果、感受性の差はあるものの、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞は上記の代謝拮抗剤に対して高感受性であることが判明した(図2)。現在、神経芽腫の治療に用いられている代表的な抗がん剤であるシスプラチンやカルボプラチン、エトポシドなどについても同様の試験を行ったが、50%細胞増殖阻害濃度・GI50 で

比較した場合、核酸代謝拮抗剤の方が約 20 倍の細胞増殖抑制能を持つことがわかった。例えば、エトポシドに関しては MYCN 遺伝子の増幅、非増幅によって GI50 値に大きな差はなく、一般的な DNA 損傷を作用機序とする抗がん剤と核酸代謝拮抗剤とは作用に明確な違いが見られた。

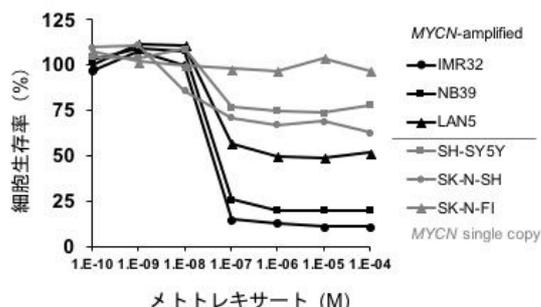


図2 核酸代謝阻害剤の効果

### (2) 遺伝子ノックダウンによる新規治療標的の探索

shRNA ライブラリーを用いた網羅的遺伝子ノックダウンスクリーニングの結果を個別に検証するために siRNA を用いた検証実験を実施した。図 1 の dTTP 生合成経路に関わる複数の遺伝子をノックダウンした結果、新規な合成致死遺伝子の候補を発見した。この遺伝子産物である酵素の阻害剤は抗がん剤として開発されていないものの、研究用の阻害剤が存在した。これを入手し、神経芽腫細胞への影響を確認したところ遺伝子ノックダウンと同様の効果が確認できた。しかしながら、他の酵素への影響など、阻害剤の特異性が担保されていないため、今後は独自に低分子量の阻害化合物のスクリーニングを実施したい。

### (3) 分子メカニズムの検討

1980 年代に行われた小規模な臨床研究では神経芽腫患者に対するメトトレキサートなどの核酸代謝阻害剤の効果は認められず、現在に至るまで抗がん剤として利用されていない。当時は MYCN 遺伝子の増幅が予後不良因子であることは発見されておらず、MYCN 増幅型の神経芽腫患者群に対する有効性は依然として不明である。本研究を遂行中の 2015 年にメトトレキサートが MYCN 増幅型の神経芽腫細胞に有効であり、その作用機序としてメトトレキサートが細胞内に取り込まれる際のキャリア分子の発現量に差異があることが報告された(引用文献)。キャリア分子の遺伝子発現量の差を示すデータは提示されていたが、タンパク質レベルでの証拠は示されていなかったため、独自に抗体を入手して検証を試みた。その結果、MYCN 増幅の有無にかかわらず、キャリア分子のタンパク質の存在量に差がないことが明らかとなった。また 5-フルオロウラシルやメトトレキ

サートの標的となる酵素であるチミジル酸シンターゼのタンパク質の存在量にも差がないことを確認した。

メトトレキサートと同様の作用機序である 5-フルオロウラシルは細胞内で代謝を受けて FdUMP に変換され、これがチミジル酸シンターゼの真の基質である dUMP と類似した化学構造をとるために酵素-基質複合体を形成することで阻害効果を発揮する。この FdUMP-チミジル酸シンターゼ複合体は非常に安定であるため還元条件下のウエスタンブロッティングにおいてもチミジル酸シンターゼの分子量増加(バンドシフト)として検出できる。そこで MYCN 増幅型の IMR-32 細胞と正常型の SH-SY5Y 細胞を同濃度の 5-フルオロウラシル代謝物で処理し、ウエスタンブロッティングにより FdUMP-チミジル酸シンターゼ複合体の形成量を定量した。その結果、いずれの細胞においても 5-フルオロウラシル代謝物の濃度依存的なバンドシフトが同程度観察されたことから、5-フルオロウラシル代謝物の細胞内取り込みと排出、標的分子への結合には差がないことが明らかとなった。

ここまでの結果から、各種の代謝阻害剤の細胞内取り込みには MYCN 増幅の有無によって明確な差はなく、標的となる酵素分子へ確実に作用していることが示唆された。dTTP の生合成が阻害された場合、DNA 合成の停止とそれに伴う細胞死が起きる、いわゆる「チミンレスデス」が古くから分子メカニズムとされているが、この場合、MYCN 遺伝子の増幅の有無が影響しているとは考えにくい。そこで、もう一つの分子メカニズムである染色体 DNA 中のウラシル塩基の蓄積とその除去修復機構との関連性について検討を行った。まず、MYCN 増幅型の IMR-32 細胞と正常型の SH-SY5Y 細胞を同濃度の核酸代謝阻害剤で処理し、24 時間ごとに細胞数を計測するとともに細胞抽出液を調製し、DNA 二本鎖切断マーカーとアポトーシスマーカーの生成を確認した。興味深いことに、薬剤処理開始から数日までは両者の細胞数に差はなく、二本鎖切断の発生も確認できなかった。その後、MYCN 増幅型の IMR-32 細胞において急激な二本鎖切断の生成とアポトーシスの誘導、それに伴う細胞数の低下が観察された。このことは dTTP の枯渇による細胞増殖の停止よりも、時間の経過とともにウラシル塩基が蓄積したのちに過剰な除去修復の結果として DNA の二本鎖切断が誘起されて細胞死が起きるといったメカニズムの可能性を強く示唆している。従って、MYCN 増幅型細胞においてウラシル塩基除去修復に関与する分子の遺伝子発現量、タンパク質存在量を確認し、MYCN 正常型細胞と比較することが今後の課題として挙げられる。

### (4) 染色体 DNA に含まれるウラシル塩基の定量法の開発

これまでのところ、メトトレキサートなどの核酸代謝阻害剤の効果により dTTP の生合成量が低下し、相対的に dUTP 量が増加することで染色体 DNA 中のウラシル塩基量が増加して DNA 損傷が誘起されることが分子メカニズムと考えている。一般に核酸代謝阻害剤の分子メカニズムの研究においてこの仮説が支持されているが、必ずしも染色体 DNA に含まれるウラシル量が増加することを示す定量的データが明示されてはいない。ウラシル塩基の定量法にはリアルタイム PCR 法の変法や放射性同位体利用する方法、抗体を用いた検出法などが報告されているが一長一短であり、特殊な施設や機器を必要とする。

そこで本研究では質量分析器 (LC-MS/MS) を用いたウラシル定量法の開発を行った。染色体 DNA 中のメチル化塩基の定量法に関する論文 (引用文献) を参考に改変を加えた。各種の核酸代謝阻害剤を処理した細胞から染色体 DNA を精製し、DNA 分解酵素の混合物を加えてモノヌクレオシドまで分解した。この混合物に同位体ラベルされたウリジンの標準品を添加した上で LC-MS/MS により相対量を定量することに成功した (図 3)。

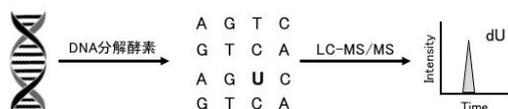


図 3 LC-MS/MS によるウラシルの定量

今後はこの系を駆使し、様々な神経芽腫細胞の染色体 DNA 中のウラシル量の経時的変化を観察し、その除去と修復、破綻による DNA 損傷の誘起の差異を観察する。

#### <引用文献>

Lau DT *et al.*, MYCN amplification confers enhanced folate dependence and methotrexate sensitivity in neuroblastoma, *Oncotarget*, Vol.6, 2015, 5510-5523

Bachman M *et al.*, 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification, *Nature Chemistry*, Vol.6, 2014, 1049-1055

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 3 件)

北尾 洋之、清成 信一、飯森 真人、新美 晋一郎、片岡 裕貴、秋山 真吾、枝廣 圭太郎、中西 良太、徳永 えり子、佐伯 浩司、沖 英次、金治 新悟、掛地 吉弘、前原 喜彦、オキサリプラチンと 5-FU

併用による抗腫瘍効果の分子機序、癌と化学療法、査読有、43 巻、2016、707-714  
<http://www.pieronline.jp/content/article/0385-0684/43060/707>

Kiyonari S, Iimori M, Matsuoka K, Watanabe S, Morikawa-Ichinose T, Miura D, Niimi S, Saeki H, Tokunaga E, Oki E, Morita M, Kadomatsu K, Maehara Y, Kitao H, The 1,2-diaminocyclohexane carrier ligand in oxaliplatin induces p53-dependent transcriptional repression of factors involved in thymidylate biosynthesis, *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読有, Vol.14, 2015, 2332-2342  
 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0748

Matsuoka K, Iimori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, Kuniwa M, Ando K, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Kitao H, Trifluridine induces p53-dependent sustained G2 phase arrest with its massive misincorporation into DNA and few DNA strand breaks, *Molecular Cancer Therapeutics*, 査読有, Vol.14, 2015, 1004-1013  
 DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0236

#### [学会発表](計 3 件)

清成 信一、MYCN 遺伝子増幅型神経芽腫細胞における新規合成致死遺伝子の同定、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

Shinichi Kiyonari, Identification of new synthetic lethal genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells, *Advances in Neuroblastoma Research (ANR)*, 2016

清成 信一、オキサリプラチンによって誘起される DNA 損傷応答と dUTPase 遺伝子発現抑制の分子機構、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年

#### [その他]

ホームページ等  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

清成 信一 (KIYONARI, Shinichi)  
 名古屋大学・医学系研究科・特任助教  
 研究者番号: 70570836

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし