

令和元年6月2日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04717

研究課題名(和文) がん細胞の代謝ストレス応答における多様性の分子基盤解明と治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular basis of diversity in metabolic stress response of cancer cells for drug discovery

研究代表者

富田 章弘 (TOMIDA, Akihiro)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・部長

研究者番号：40251483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：代謝ストレス応答は、がんの特徴的な種々の条件下で機能し、がん細胞の生存や増殖に重要な役割を果たしている。本研究では、代謝ストレス応答のなかでも、統合ストレス応答(ISR: Integrated Stress Response) 経路の活性化機構の多様性に着目し研究を行った。そして、がん化シグナルを阻害するキナーゼ阻害剤を中心に、ISRを制御する化合物を探索し同定に成功した。さらに、それらの化合物を用い、ISRを制御し合成致死を誘導する治療法の開発に向けた研究を推進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色・独創性は、がん細胞の代謝ストレス応答のなかで、がん化シグナルと密接に関連しがん細胞間で異なる反応がみられるものに注目し、がん特異的なストレス応答の制御法を開発しようという点にある。そして、ストレス応答を制御するツールとして、臨床に直結し得るキナーゼ阻害剤の同定に至っている。速やかな臨床応用の可能性も期待される本研究の成果は、新たながん治療法の開発という社会的要請に応えるものと位置づけられる。

研究成果の概要(英文)：Metabolic stress responses of cancer cells play an important role in cell survival and growth under various tumor-associated conditions. In this study, we focused on the diversity of activation mechanisms of integrated stress response (ISR) pathway among metabolic stress responses. By screening a kinase inhibitor library, we succeeded in identifying compounds that modulate oncogenic signals and control the ISR. Using these compounds, we further promoted research for establishing a novel therapeutic strategy that induces synthetic lethality through controlling the ISR.

研究分野：がん薬物治療学

キーワード：癌 分子標的治療 微小環境 代謝ストレス 統合ストレス応答(ISR) キナーゼ阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞は大量のグルコースを消費しつつ増殖する。これには、酸素の有無に関係なく、主に解糖系でエネルギーを産生するという、がん細胞の特性が関係している。この解糖に依存した形質は、Warburg 効果と呼ばれ、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の結果として起こる。また近年のがん代謝研究の進展により、種々のアミノ酸の重要性が認識されるようになり、なかでもグルタミンは、ミトコンドリア TCA 回路の中間体を補充する、アナプレロティック経路の炭素源として利用され、がん細胞の生存・増殖に深く係っていることが明らかになってきた。一方で腫瘍内組織では、一般に血管形成不全のため、グルコースやアミノ酸などの栄養素の供給が十分ではない。そのため、腫瘍内環境でのがん細胞の生存・増殖には、栄養欠乏に対するストレス適応機構が重要な役割を果たすと考えられている。

代謝ストレスに対する適応機構において中心的な役割を果たすものとして、ISR (Integrated Stress Response) 経路がある。ISR が活性化されると、翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化を介して、転写因子 ATF4 が発現誘導され、ストレスに適応するための様々な遺伝子の発現が誘導される。この ISR の活性化は、PERK、GCN2、PKR、HRI の 4 つのストレスセンサー分子の活性化を起点として起こり、それぞれが異なるストレスにより活性化される。PERK は小胞体ストレス、GCN2 はアミノ酸欠乏、PKR はウイルス感染、HRI はヘム鉄欠乏により、おもに活性化され、これらは共通して、eIF2 をリン酸化しストレス・シグナルを伝達する。興味深いことに、近年、BRAF<sup>V600E</sup> などのドライバーがん遺伝子に対する分子標的薬が、この ISR を活性化することが明らかになってきた。しかしながら、ISR 活性化がどのような機序で起こるのか、また、どのようなタイプの分子標的薬剤によって起こるのかなど不明な点が多い。加えて、ISR 活性化が常に薬剤耐性化に結びつくわけではなく、治療効果との関係については、現時点では予測は容易でない。

研究代表者らは、グルコース欠乏下のがん細胞に選択的に毒性を示す抗がん化合物群を見出し、ISR や関連するストレス応答との関係について研究を展開してきた。その中で、がん化シグナルの阻害や栄養欠乏に対して、ISR は一様に活性化されるのではなく、各々の薬剤や細胞の特性に応じて異なる機序で活性化されている可能性に気が付いた。そこで本研究では、こうした ISR 活性化機構の多様性に焦点をあて、がん化シグナルと関連づけながら、分子メカニズムの解析を行うとともに、ISR を制御しがん細胞を選択的に死滅させる新しい治療法の考案を目指し、立案した。

## 2. 研究の目的

腫瘍内環境でのがん細胞の生存・増殖には、グルコースやアミノ酸などの栄養素の不足に対するストレス適応機構が重要な役割を果たしている。こうした代謝ストレス応答は、近年、ドライバーがん遺伝子に対する分子標的薬によっても誘導されることが明らかになり、治療効果との関係に興味を持たれている。また、がん化シグナルの多様性と相応し、研究代表者らは、種々のがん細胞株を用いた研究から、グルコース欠乏に対する代謝ストレス応答には一定の多様性があることを見出している。本研究では、こうした代謝ストレス応答の多様な活性化機構の分子メカニズムを解析し、その制御機構を明らかにすることを目的とする。そして、これらの基盤情報を活用し、代謝ストレス応答を制御する、がん選択的な新しい治療法の考案を目指す。

## 3. 研究の方法

代謝ストレス応答は、がんの特徴的な種々の条件下で機能し、がん細胞の生存や増殖に重要な役割を果たしている。本研究では、ISR (Integrated Stress Response) を中心に、がん化シグナル阻害やグルコース欠乏等に対する活性化機構の多様性の分子基盤を明らかにし、がん特異的な治療法開発に向けての研究展開を図る。具体的には、(1) 分子標的薬剤による代謝ストレス応答の誘導とその機序解析、(2) がん細胞の栄養飢餓応答における多様性の分子機序解析の研究を行い、分子レベルで理解するための基盤を築く。そして、これら基盤情報を活用し、(3) 代謝ストレス応答制御による合成致死の探索と機序解析、(4) 多様性を考慮した代謝ストレス応答の治療標的化の研究を推進する。このように 4 つの研究を連携して進めることにより、得られた知見の臨床応用の促進を図る。以下に、項目ごとに研究方法を簡潔に述べる。

「(1) 分子標的薬剤による代謝ストレス応答の誘導とその機序解析」では、BRAF 阻害剤ベムラフェニブ等を用いた予備的検討結果を踏まえ、がん化シグナルを阻害するキナーゼ阻害剤に焦点を絞り、ISR を活性化する薬剤や、逆に、阻害する薬剤をシステムティックに探索し、どのようなキナーゼ阻害剤が ISR の活性化に影響を与えるかを明らかにする。そして、それぞれのキナーゼ阻害剤による ISR 活性化や阻害の機序解析を行い、がん化シグナルによる ISR の

制御機構の解明を目指す。また、「(2) がん細胞の栄養飢餓応答における多様性の分子機序解析」では、ヒトがん細胞 39 株をグルコース欠乏やグルタミン欠乏に曝した際のトランスクリプトーム・データを用い(一部未取得のため、初年度に整備予定) それぞれを欠乏した際に誘導される多様な代謝ストレス応答を分類し、こうした多様性に関与するがん化シグナルについて検討する。「(3) 代謝ストレス応答制御による合成致死の探索と機序解析」では、上記の探索研究で見出した、ベムラフェニブ等の ISR を活性化する薬剤と、逆に、阻害する薬剤を併用することによって、合成致死を誘導できる組合せを同定し、その作用機序解析を行う。さらに、「(4) 多様性を考慮した代謝ストレス応答の治療標的化」では、治療への応用展開に向け、同定された合成致死効果の得られる組合せについて、適切な対象疾患を決定し、細胞レベルならびに動物レベルでの抗腫瘍効果の検討や概念実証のための研究を実施する。

#### 4. 研究成果

成果について、研究項目ごとに分け、以下に簡潔に述べる。

##### (1) 分子標的薬剤による代謝ストレス応答の誘導とその機序解析

BRAF 阻害剤ベムラフェニブを用いた予備的検討結果を踏まえ、がん化シグナルを阻害するキナーゼ阻害剤を中心に、355 のキナーゼ阻害剤について、ISR に伴って細胞核内に蓄積する ATF4 を迅速に検出するアッセイ系を用いて ISR の誘導活性や阻害活性を検索した。具体的には、ISR を活性化するキナーゼ剤としては、ヒト線維肉腫 HT1080 細胞に ATF4 の誘導を促すものを検索し、既に報告のあるソラフェニブを含め、2 種類の ISR 活性化能を有するキナーゼ阻害剤を同定できた。一方、ISR を抑制するキナーゼ阻害剤については、ISR 経路のうち、PERK 経路を活性化するツニカマイシン、GCN2 経路を活性化するハロフギノン、それぞれで HT1080 細胞を刺激し、これらの刺激による ATF4 誘導を抑制するものを検索した。既存の報告と合致して、PERK 経路ならびに GCN2 経路の両者による ATF4 誘導を抑制するものとして、PI3/mTOR 経路を阻害する多くのキナーゼ阻害剤が同定された。また、PERK 経路を選択的に抑制するキナーゼ阻害剤は、今回のキナーゼ阻害剤ライブラリーからは同定できなかったが、GCN2 経路を選択的に抑制するものとして、2 種類のキナーゼ阻害剤を同定することができた。予備的な検討の結果、これらの 2 種類の化合物については、もともとの標的とされているキナーゼへの作用とは関係なく、GCN2 経路の活性化を抑制しているものと考えられた。HT1080 細胞以外にも、BRAF 変異陽性のメラノーマ A375 細胞を用い、BRAF 阻害剤ベムラフェニブによる ATF4 誘導に対し、それを抑制するキナーゼ阻害剤を検索し、様々な刺激による ISR 活性化を抑制する PI3/mTOR 経路阻害剤に加えて、ベムラフェニブによる ISR 活性化を選択的に抑制するものとして 1 種類のキナーゼ阻害剤を見出した。なお本化合物については、研究項目(4)にて抗腫瘍活性の検討を行った。

上記のスクリーニングで見出したキナーゼ阻害剤の作用の確認を進めるとともに、BRAF 阻害剤ベムラフェニブによる ISR 活性化について詳細な検討を行った。当時既に、BRAF 阻害剤ベムラフェニブが ISR を活性化することが報告されていたが、その活性化メカニズムとベムラフェニブの薬理効果における意義についてはあまり明らかにされていなかった。そして本研究において、ベムラフェニブがアミノ酸飢餓ストレスを感知する GCN2 の活性化を介して ISR を誘導することを新たに見出した。A375 などの BRAF 変異型細胞株にベムラフェニブを処理すると、GCN2 の活性化、eIF2 のリン酸化及び ATF4 発現が 4 時間以内に速やかに誘導された。ベムラフェニブによる eIF2 のリン酸化及び ATF4 発現は GCN2 のノックダウンによって抑制され、他の eIF2 上流ストレスセンサー分子である PERK のノックダウンでは抑制されなかった。先行研究においてベムラフェニブは小胞体ストレスによる PERK の活性化を介して ISR を活性化することが提唱されていたが、今回検討したベムラフェニブ短時間処理の条件においては小胞体ストレスの誘導及び PERK の活性化は認められなかった。さらに我々は、BRAF 変異型メラノーマ細胞株において、ATF4 のノックダウンがベムラフェニブによる細胞増殖阻害作用を増強することを見出した。このことから、GCN2 を介した ISR の活性化はベムラフェニブの作用に対して細胞の保護に働き、ベムラフェニブ耐性獲得の新たな機序となり得ることが示唆された。

##### (2) がん細胞の栄養飢餓応答における多様性の分子機序解析

ヒトがん細胞 39 株をグルコース欠乏やグルタミン欠乏に曝した際のトランスクリプトーム・データについて、一部未取得であった細胞株のデータを取得し、全 39 株のデータベースを完成させた。本データベースから、グルコース、グルタミンそれぞれを欠乏した際に誘導されるトランスクリプトーム応答は一定の多様性を示し、それぞれ 3-4 種のパターンが存在し細胞株がクラスター化されることが明らかになった。各クラスターはがん細胞の由来臓器とは関連しないことから、各がん細胞の特性とリンクしているものと考えられた。興味深いことに、この 39 細胞株には、BRAF 変異陽性のがん細胞株が 2 種類含まれているが、2 種類ともグルコース欠乏、グルタミン欠乏のいずれにおいても同一クラスターに入ることが分かった。そこで、メ

メラノーマ細胞を中心に、BRAF 変異陽性のがん細胞株を追加して、同様にグルコース欠乏やグルタミン欠乏に曝した際のトランスクリプトーム・データを取得し、クラスター解析を行ったところ、追加したいずれの BRAF 変異陽性がん細胞株も同一クラスターに入ることが明らかになった。これらの結果から、活性化がん遺伝子 BRAF がグルコース欠乏やグルタミン欠乏における、ISR 制御に関与しトランスクリプトーム応答の多様性に関与する可能性が考えられた。今後、さらに、トランスクリプトーム応答の多様性と、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異との関連付けのための解析を進めていきたいと考えている。

こうしたがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異との関連解析を進めるとともに、発現変動する遺伝子群について、遺伝子発現制御ネットワークの構造解明と、その中で重要な制御分子の同定を可能にする手法の開発に取り組んだ。そして、今回我々は、発現変動遺伝子間の上流・下流の関係を再構築し、そのネットワーク中でハブとして働く遺伝子（ハブ遺伝子）を検出するアルゴリズム InDePTH 法の開発に成功した。InDePTH 法では、発現変動遺伝子間に向きのある関係性を付与するために、遺伝子ノックダウンおよび過剰発現後のトランスクリプトームを網羅的に収録したデータベースから、解析対象の発現変動遺伝子群と関連性の高い情報を抽出する。抗がん剤による発現変動遺伝子を用いて InDePTH 法から得たハブ遺伝子を評価したところ、ハブとして確度の高い転写因子などを期待通り抽出できた。検出されたハブ遺伝子が遺伝子発現制御ネットワークにおいて期待される役割を果たすことは、ノックダウン等の実験によって検証した。非常に興味深いことに、発現変動比による遺伝子選択法や従来のエンリッチメント解析法では、InDePTH 法で検出されたハブ遺伝子を十分に高い優先順位で検出できなかった。以上の検討により、InDePTH 法によるデータ駆動的アプローチによって階層的遺伝子制御ネットワークの理解が進み、機能遺伝子を見つけやすくなることが期待された。また、InDePTH 法は、ミトコンドリア機能と関連する低酸素応答性遺伝子群に対しても、その階層的ネットワークを再構築できることが分かり、一定の汎用性のあることも明らかになった。今後、種々の栄養飢餓応答遺伝子群の解析へ応用していきたいと考えている。

### (3) 代謝ストレス応答制御による合成致死の探索と機序解析

上記の成果に基づき、ISR を活性化する薬剤と、逆に、抑制する薬剤の併用により合成致死効果の得られる組合せを探索した。様々な刺激による ISR 活性化を抑制する PI3/mTOR 経路阻害剤については、いくつかの ISR 活性化キナーゼ阻害剤やハロフギノン等のケミカルストレス剤との組合せを検討したが、顕著な合成致死効果は得られなかった。一方、ベムラフェニブによる ISR 活性化を選択的に抑制するキナーゼ阻害剤は、ベムラフェニブとの併用により、顕著な合成致死効果を認め、研究項目(4)へ進めた。また、複数の ISR 活性化剤と ISR 抑制剤の組合せにおいて合成致死効果が得られることを見出すとともに、1つのキナーゼ阻害剤については、グルタミン欠乏との組合せにおいても合成致死を誘導することが明らかになった。この結果を受け、探索範囲を広げ、キナーゼ阻害剤とグルタミン欠乏等の栄養飢餓との合成致死誘導についても検討を進めるとともに、同定した合成致死誘導については、その分子機序解析にも着手した。これまでに翻訳開始因子の制御機構が合成致死誘導に重要であることを示唆する結果を得ており、今後も分子機序解明に向けて、研究を継続していきたいと考えている。

さらに、研究項目(2)の成果から活性化がん遺伝子が ISR 制御に関与する可能性が考えられたことから、がん遺伝子 BCR-ABL に着目して研究を行った。そして、慢性骨髄性白血病由来のがん細胞においては、BCR-ABL 阻害によって ISR 活性化が抑制され、栄養飢餓などのストレス感受性が増大し、合成致死が誘導されることを見出した。実際、イマチニブやダサチニブなどの BCR-ABL 阻害剤存在下では、ISR を活性化させるストレスによる GCN2 や PERK の活性化、および ATF4 の発現誘導が抑制された。さらに、BCR-ABL 下流の mTORC1 阻害剤処理時においても ATF4 の発現誘導が抑制されたことから、eIF2 キナーゼだけでなく mTORC1 経路の抑制が ATF4 の発現誘導に重要であることが考えられた。BCR-ABL 阻害剤と ISR を活性化するストレス条件下での細胞の生存や増殖について検討したところ、ストレス下で BCR-ABL 阻害剤による細胞死誘導が顕著に増強されることがわかった。以上から、BCR-ABL 陽性の慢性骨髄性白血病細胞においては、ISR は、BCR-ABL の制御下にあり、ストレス条件下での細胞生存に重要な役割を果たしているものと考えられた。

### (4) 多様性を考慮した代謝ストレス応答の治療標的化

研究項目1)で見出した化合物の中で、ベムラフェニブとの併用によって BRAF 変異陽性のメラノーマ細胞に合成致死を誘導するものに焦点を当て、メラノーマを対象疾患として、抗腫瘍効果の検証実験を実施した。この合成致死効果は、ベムラフェニブのみならず他の BRAF 阻害剤 ダブラフェニブを用いても誘導されること、また、A375 細胞や G-361 細胞といった BRAF 変異陽性細胞でのみ認められ、野生型 BRAF のメラノーマ細胞では認められないことが明らかになった。また、合成致死効果の誘導には、顕著なアポトーシス誘導が伴うことが分かった。残念ながら、動物レベルでの抗腫瘍効果については、これまでの検討では相乗効果を得ることができ

ておらず、今後、同様の活性を有する、よりバイオアベイラビリティの高い誘導体の探索や、投与経路・投与スケジュールの検討等を含め、さらに検証を進めていきたいと考えている。

以上のように本研究では、代謝ストレス応答の多様な活性化機構の分子メカニズムを解析し、その制御機構を明らかにすることを目的として研究を行うとともに、これらの基盤情報を活用し、代謝ストレス応答を制御する、がん選択的な新しい治療法の考案を目指し研究を進めた。そして、がん化シグナルを阻害するキナーゼ阻害剤の検索やグルコース欠乏等に対するトランスクリプトーム・データベースの構築を通じ、ISR 活性化機構の多様性を分子レベルで理解するための基盤情報を得ることができた。また、ISR を活性化する薬剤と、逆に、阻害する薬剤の併用により、合成致死が誘導される組合せを発見することができた。今後は、こうした探索的研究で得られた成果に基づいて、合成致死効果の分子機序解析や治療効果についての検証研究へ展開していき、臨床応用を見据えつつさらに研究を発展させていきたいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kato Y, Kunimasa K, Sugimoto Y, Tomida A. BCR-ABL tyrosine kinase inhibition induces metabolic vulnerability by preventing the integrated stress response in K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 504:721-726, 2018.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.032.

Koido M, Tani Y, Tsukahara S, Okamoto Y, Tomida A. InDePTH: detection of hub genes for developing gene expression networks under anticancer drug treatment. *Oncotarget.* 9:29097-29111, 2018.

DOI: 10.18632/oncotarget.25624.

Koido M, Haga N, Furuno A, Tsukahara S, Sakurai J, Tani Y, Sato S, Tomida A. Mitochondrial deficiency impairs hypoxic induction of HIF-1 transcriptional activity and retards tumor growth. *Oncotarget.* 8:11841-11854, 2017.

DOI: 10.18632/oncotarget.14415.

Nagasawa I, Kunimasa K, Tsukahara S, Tomida A. BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem Biophys Res Commun.* 482:1491-1497, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.062.

Koido M, Sakurai J, Tsukahara S, Tani Y, Tomida A. PMEPA1, a TGF- $\beta$  and hypoxia-inducible gene that participates in hypoxic gene expression networks in solid tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 479:615-621, 2016.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.166.

### 〔学会発表〕(計 20 件)

加藤優, 杉本芳一, 富田章弘. BCR-ABL は ER ストレス下における PERK-ATF4 経路の活性化および細胞生存を制御する. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 (大阪)

加藤優, 杉本芳一, 富田章弘. Integrated Stress Response における GCN2 経路選択的な阻害剤の探索. 第 138 年会日本薬学会, 2018 年 (金沢)

国政和宏, 塚原里美, 富田章弘. Her2 阻害剤 mubritinib のグルコース飢餓選択的な殺細胞効果. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年 (横浜)

小井土大, 岡本有加, 富田章弘. 抗がん剤作用において影響力のある遺伝子を推定するための遺伝子発現データの統合解析アルゴリズム. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2017 年 (福岡)

永澤生久子, 国政和宏, 富田章弘. BRAF 阻害剤誘導性ストレス適応応答シグナルを標的とした選択的阻害剤の探索. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016 年 (別府)

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/genome/index.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者：該当なし

(2)研究協力者（計9名）

研究協力者氏名：塚原 里美

ローマ字氏名：(TSUKAHARA, satomi)

研究協力者氏名：櫻井 純子

ローマ字氏名：(SAKURAI, junko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。