

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07189

研究課題名(和文) 肺小細胞がんにおけるPI3K/mTOR経路を介したプリン代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulated mechanism in controlling purine metabolism through PI3K/mTOR pathway in small cell lung cancer

研究代表者

牧野嶋 秀樹 (Makinoshima, Hideki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：30510573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺小細胞がんにおけるPI3K/mTOR経路を介したプリンヌクレオチド代謝制御機構の解明を目指して研究を実施し、当初計画していた目標を概ね達成した。プリンヌクレオチドの生合成経路は新規と再利用経路の2種類存在し、PI3K/mTOR経路が新規合成経路を正に制御しており、PI3K/mTORの阻害剤は再利用経路の活性が高いと思われる肺小細胞がん細胞に効果が乏しかった。本研究の成果で重要なことは、肺小細胞がん細胞を用いて、(1)プリンヌクレオチドの再利用経路に存在する酵素HPRT1遺伝子の欠損細胞株樹立と(2)新規生合成経路あるいは再利用経路由来の生合成比率を測定する実験系の構築である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺小細胞がんは、肺がんの15%程度の症例数であるが、進行が速く、治療抵抗性が臨床問題となっている。近年新たな治療法が開発されず、新規の治療標的の同定が必要である。本研究では、PI3K/mTOR阻害剤の感受性と代謝産物のプロファイルを解析し、PI3K/mTOR阻害剤の臨床研究と並行し、代謝産物由来のバイオマーカー探索も行った。今後、新規治療法の開発に発展する研究が期待できる。さらに、この科研費を用いたことが記載されている論文が少なくとも3報発表することができ、社会的な意義も大きかったと感じている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the metabolic pathway by which PI3K/mTOR regulates purine biosynthesis in small-cell lung carcinoma cell (SCLC), we conducted this research. I almost achieved the initially planned goals. There are two types of purine nucleotide biosynthesis pathways, a de novo pathway and a salvage pathway. The PI3K/mTOR pathway positively regulates the new synthesis pathway, and it seems that the SCLC cell lines which have high salvage pathway activity seems to be resistant to PI3K/mTOR inhibitors. The important outcome of this research is establishment of a defective SCLC cell line of HPRT1 gene, which is an enzyme that exists in the purine nucleotide recycling pathway. Moreover, it is the construction of an experimental system for measuring the biosynthesis ratio derived from either de novo or salvage route using SCLC cells. It is expected that these research results will be useful for research on SCLC.

研究分野：腫瘍生物学、生化学、代謝学

キーワード：肺小細胞がん PI3K/mTOR経路 プリンヌクレオチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本において肺がんはがん死の第一位で、肺小細胞がん (SCLC) は肺がん患者全体の15%程度であるが、増殖・進行が速く、早期に全身転移をきたす予後不良な疾患である。SCLCは薬物療法や放射線療法に対する感受性が比較的高く、少なくとも一度は腫瘍の縮小に成功する症例が多い。しかし、SCLCに対する治療薬の選択数は少なく、新たな分子標的療法を世界中の研究者が開発中であり、治療後の再発や治療抵抗性が未だに大きな課題となっている。我々は、SCLCの網羅的遺伝子変異を解析し、PI3K/mTOR シグナル伝達経路が有望な新規薬剤標的であることを見出した。研究開始時には、遺伝子変異スクリーニングとPI3K 経路に関連する遺伝子変異陽性患者に対する新規PI3K/mTOR 分子標的治療薬ゲダトリシブの第II 相臨床試験が当院を中心に進行中であった (EAGLE-PAT)。

(2) SCLCの代謝を研究する基礎データとして、SCLC患者由来腫瘍組織および血漿を用いて、定量的メタボローム解析を行った。その結果、非腫瘍組織と比較してSCLC組織でプリンヌクレオチドを含む代謝産物が高濃度に存在することを見出していた。加えて、SCLC担癌患者および非担癌患者の血漿をメタボローム解析して比較した結果、プリン関連代謝産物が優位にSCLC担癌患者由来血漿中で高いことを発見した。さらに、SCLC細胞株を用いて、臨床試験中のゲダトリシブに対する感受性 (IC_{50} 値) と細胞内の絶対的代謝産物量の相関を調べた結果、この薬剤に対する感受性が高い、つまり IC_{50} 値が低くなる細胞株において、プリンを含有した代謝産物が優位に高い傾向となることを見出していた。研究開始当初に得られていた結果は、SCLCにおいて、PI3K/mTOR シグナル伝達経路の下流で制御される分子が、プリンヌクレオチドの生合成経路維持に重要であること示唆していた。

2. 研究の目的

肺小細胞がんの患者由来腫瘍組織および血漿中でプリン環を含む代謝産物が高濃度に存在し、高レベルのプリン関連化合物が肺小細胞がん細胞株のPI3K/mTOR 阻害剤耐性化に寄与することを見出した。PI3K/mTOR経路がプリンヌクレオチドの新規生合成経路を正に制御していることが研究の初期段階で判明し、プリンヌクレオチド再利用経路の機能を明らかにすることを研究目的とした。

(1) プリンヌクレオチド生合成における再利用経路に存在するHPRT1を欠失する細胞株を樹立し、新規生合成を阻害する葉酸代謝拮抗薬等の薬剤感受性を調べる。

(2) 高レベルのプリン関連代謝産物が、新規生合成あるいは再利用経路、肺小細胞がん細胞ではどちらのプリン生合成経路を主に経由しているのか、同位体を用いて定量的に決定する。

本研究では、上記2点を中心に、PI3K 経路とプリン代謝経路の交差点を見出し、プリンの代謝制御機構を解明し、肺小細胞がん発生・進展におけるプリン関連分子の生物学的な機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまでの発現解析あるいはメタボローム解析により、プリンの代謝を制御する候補酵素HPRT1を同定した。CRISPR-Cas9の系を用いてHPRT1遺伝子をノックアウトした肺小細胞がん細胞株を樹立し、葉酸代謝拮抗薬の一種であるLometrexol (LMX) の感受性試験を行った。LMXは、プリンヌクレオチド新規生合成経路の阻害剤として用いられている。さらに、プリンヌクレオチドの量を

定量することにより、肺小細胞がんにおけるプリン代謝で重要な責任酵素の機能の解析を行った。

(2) 肺小細胞がん臨床検体で、隣接する非腫瘍部に比較して、高レベルのプリン関連代謝産物が、新規生合成経路あるいは再利用経路、どちらのプリン生合成経路を主に経由しているのか、同位体を用いて決定した。肺小細胞がん細胞株を用いて、新規生合成経路由来であればアミノ酸グリシン (M+3)、サルベージ経路であればヒポキサンチン (M+9) の同位体を含む細胞培養液を用いて、細胞内の核酸に取り込まれる量を定量した。

4. 研究成果

(1) HPRT1 ノックアウト細胞を樹立する目的で、CRISPR-Cas9 と gRNA を肺小細胞がん細胞にトランスフェクションした。薬剤耐性マーカーでスクリーニングし、複数の候補細胞株をクローニングした。それら

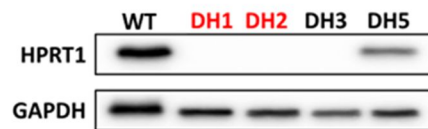


図1 HPRT1ノックアウト細胞作製

のクローン細胞からタンパク質を抽出し、HPRT1 の存在をイムノブロット法で確認した (図1)。親株の WT に比較して、DH1, DH2, DH3 の細胞では、HPRT1 遺伝子の欠失が成功していることが明らかになった (図1)。

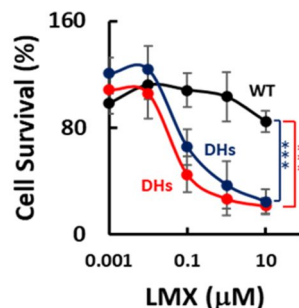


図2 HPRT1KO細胞の薬剤感受性

(2) 樹立した HPRT1 欠失細胞で、葉酸代謝拮抗薬の感受性を調べた (図2)。親株の WT では、LMX の濃度を高くしても肺小細胞がん細胞の生存率が低下しなかった。その一方で、HPRT1 欠失細胞では LMX に感受性を示した。この結果は、HPRT1 がプリンヌクレオチドの再利用経路で重要な酵素であり、新規生合成経路と再利用経路を同時に阻害する新たな治療法開発に発展する可能性を示唆した。

(3) グリシンの同位体 (M+3) とヒポキサンチンの同位体 (M+9) を細胞培養液に添加し、新規生合成経路 (de novo) と再利用経路 (salvage) のどちらを経由して Inosine Monophosphate (IMP) が生合成されるか、メタボローム解析を用いて定量的に解析を行った (図3)。

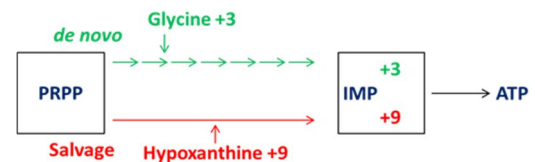


図3 同位体ラベルの実験

IMP 由来の多くのプリン関連代謝産物に違いが観察されたが、ATP を一例として示す (図4)。

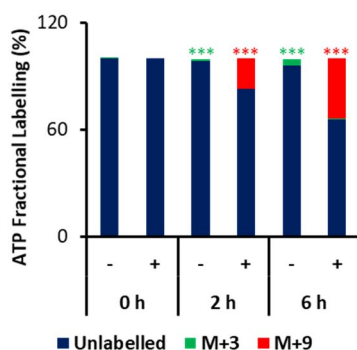


図4 生合成されたATP量の定量

グリシンとヒポキサンチンの同位体を用いて標識開始時には、同位体が確認されなかった。2、6時間後には、ヒポキサンチン由来 (M+9) の ATP が、HPRT1 が存在する細胞 (HPRT1+) で検出された (図4)。その一方で、グリシン由来 (M+3) の ATP は、HPRT1 が発現していない細胞 (HPRT1-) 内で、統計学的に優位に検出された (図4)。これらの結果は、HPRT1 が存在する多くのがん細胞では、プリン生合成のために再利用経路を使用し、再利用経路が使用できない場合には新規生合成経路を活性化させていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ami Maruyama, Kenjiro Kami, Kazunori Sasaki, Hajime Sato, Yuzo Sato, Katsuya Tsuchihara and Hideki Makinoshima	4. 巻 148
2. 論文標題 Extraction of aqueous metabolites from cultured adherent cells for metabolomic analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Exp. Vis.	6. 最初と最後の頁 59551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Sato Y, Matsuda S, Maruyama A, Nakayama J, Miyashita T, Udagawa H, Umemura S, Yanagihara K, Ochiai A, Tomita M, Soga T, Tsuchihara K, Makinoshima H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolic Characterization of Antifolate Responsiveness and Non-responsiveness in Malignant Pleural Mesothelioma Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Makinoshima H, Umemura S, Suzuki A, Nakanishi H, Maruyama A, Udagawa H, Mimaki S, Matsumoto S, Niho S, Ishii G, Tsuboi M, Ochiai A, Esumi H, Sasaki T, Goto K, Tsuchihara K.	4. 巻 78
2. 論文標題 Metabolic Determinants of Sensitivity to Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Inhibitor in Small-Cell Lung Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 2179-2190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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

〔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
研究協力者	丸山 亜美 (Maruyama Ami)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐藤 雄三 (Sato Yuzo)		