

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15020

研究課題名(和文)肺扁平上皮癌におけるグルタミンを標的とする治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a glutamine-targeted therapy for lung squamous cell carcinoma

研究代表者

松本 吉史 (MATSUMOTO, YOSHIFUMI)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：60770211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミノーリシスは固形癌の治療になると報告されている。我々は肺扁平上皮癌におけるグルタミノーリシスの影響及び抗癌剤治療戦略におけるグルタミノーリシスの可能性を探索した。グルタミン依存性は6つの肺扁平上皮癌のセルラインで確認された。mTORC1活性とオートファジーの誘導はグルタミン除去やグルタミナーゼ阻害薬を介したグルタミノーリシス阻害後に確認された。5つの肺扁平上皮癌のセルラインではグルタミン依存性を示し、その依存性はGLS1/GLS2のmRNA発現レベルと相関していた。このことからグルタミノーリシス阻害はmTORC1シグナルのダウンレギュレートとオートファジーの誘導により細胞増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺扁平上皮癌細胞株の多くはグルタミン代謝依存性で、GLS1阻害剤による治療効果が十分期待できる。よって、分子標的治療薬が存在しない肺扁平上皮癌に対する新たな分子標的治療になる可能性が十分ある。一方、グルタミン代謝依存性に関わる遺伝子異常は、TP53, c-myc, Nrf2がある。更には、神経膠芽腫や急性白血病にみられるIDH1遺伝子異常においてもグルタミン依存性が示されている。よってグルタミン代謝酵素であるグルタミナーゼをターゲットとした分子標的薬を開発する端緒となれば、これら遺伝子異常を持つ様々ながん腫に効果を発揮する可能性が高く、多くの患者の福音となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Inhibition of glutaminolysis has been reported as a promising therapeutic strategy to target several solid carcinomas. We aimed to investigate the effects of glutaminolysis on cell proliferation in lung squamous cell carcinoma cell lines and to explore the potential of targeting glutaminolysis as an anticancer strategy. Glutamine (Gln) dependence was assessed in six lung squamous cell carcinoma cell lines. Cell proliferation, mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity and the induction of autophagy were assessed after inhibition of glutaminolysis via Gln depletion or glutaminase (GLS) inhibition. Five of six lung squamous cell carcinoma cell lines exhibited glutamine-dependence. The extent of dependence was correlated with the mRNA levels of GLS1/GLS2. Inhibition of glutaminolysis inhibited cell proliferation by down-regulating of mTORC1 signaling and inducing autophagy in Gln-dependent lung squamous cell carcinoma cell lines.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：肺扁平上皮癌 グルタミン 分子標的治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) **がん細胞におけるグルタミン代謝**：がん細胞は解糖系を亢進させ増殖や転移に必要なエネルギーを産生している (Warburg 効果) 一方で グルタミンの選択的消費の亢進が報告されている。グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素には腎に発現する腎型グルタミナーゼ：グルタミナーゼ 1 (Gls1) と肝に発現する肝型グルタミナーゼ：グルタミナーゼ 2(Gls2)がある。近年、Gls1 発現亢進が Gls1 に抑制的に作用する miR23a/b を抑制する c-myc により (Nature 458:762-765, 2010) Gls2 が p53 により発現誘導され(PNAS 107:7461-7466,2010)、がん細胞において対照的な作用をすることが明らかとなった。また、Gls1 が多くの癌腫においてグルタミン代謝のカギ酵素であることが示されている (Cancer Biology & Therapy. 13 (12): 1185-94, 2012; Blood. 126 (11): 1346-56, 2015.)。一方、がん細胞において酸化ストレスに反応する keap1/Nrf2 システムの活性化が、糖やグルタミンの代謝を変化させ、増殖シグナルの増強をもたらすことが明らかとなった (Cancer Cell 22:66-79, 2012) 。また、mTORC1 活性化とグルタミン代謝との関連も注目されている (Molecular Cell 47, 349-358, 2012) 。また、生体においてグルタミンは mTOR 複合体を介してオートファジーを制御している(Autophagy. 2012 Dec 1; 8(12): 1862-1864.)。

(2) **肺扁平上皮癌と遺伝子異常についての背景**：肺扁平上皮癌は、肺腺癌と異なり driver gene mutation が同定されず、また、免疫チェックポイント阻害薬の有効性は認められているものの奏効率は 20%程度^{の報告が多く、治療成績は停滞している。}このため、新規分子標的の同定は新たな制がんの手掛かりとして極めて重要である。The Cancer Genome Project による肺扁平上皮癌の解析結果から (Nature 489:519-525,2012) 、TP53 異常が 80%以上、分化に関わる SOX2・TP63 増幅が 44%、keap1/Nrf2 の異常活性化が 34%に認められている。一方、従来の分子標的治療薬は、過剰発現分子や、がん遺伝子活性化及びその下流のシグナル伝達に関わる分子の阻害剤として開発されたものが殆どである。

(3) **グルタミン代謝酵素阻害薬**：グルタミンは非必須アミノ酸であり、がんにおいてグルタミン代謝の阻害を標的とした場合、生体に深刻な障害を生む可能性が低いという長所がある。グルタミン依存性の腫瘍の存在が明らかとなりつつある現在、その代謝に強く依存する癌の特徴的な遺伝子異常を同定し、その結果に基づいて同代謝関連酵素を多様な手法で阻害することによる抗腫瘍効果の解析研究は、分子標的治療の有効性を判定する大きな手掛かりとなりえる。

先述のように The Cancer Genome Project による肺扁平上皮癌の遺伝子異常についての解析結果が 2012 年に報告され (Nature 489:519-525,2012) また PI(3)TK/RTK/RAS シグナル異常が 69% と高頻度であることが報告されているが、増幅や遺伝子異常は多岐に渡り、従来の発想による創薬の開発は困難が予想される。応募者は肺扁平上皮癌におけるグルタミン代謝依存性の有無の解析を新たな観点からのアプローチとして重要視し、基礎準備研究を重ねることにより、同代謝系をターゲットとする治療開発の可能性を着想するに至った。肺扁平上皮癌 6 株の予備解析において、グルタミン依存性の細胞株が存在し、グルタミン代謝阻害により細胞増殖の抑制が確認された (左下図)。また Gls1、Gls2 mRNA レベルを確認したところ Gls1 mRNA /Gls2 mRNA 比が グルタミン依存性と正相関していることが判明した (右下図)。このことから、その代謝阻害が有効な治療標的となる可能性があることを確認した。このことから本研究を提案して推進することにした。

2. 研究の目的

扁平上皮癌における新たな制がん標的分子の創出を目的として、われわれが準備研

究にて確認したグルタミン酸代謝経路に注目した扁平上皮癌の基礎分子学的解析を提案する。予備実験結果では、グルタミン代謝活性の変化に同系統のがんが高感受性であることから、本研究では、グルタミン代謝酵素を阻害による抗腫瘍効果を主眼に、以下の3点を明らかにすることを目的とする。

グルタミン代謝活性亢進・依存性におけるグルタミナーゼおよび関連遺伝子変異の役割

グルタミン代謝阻害による抗腫瘍効果とその分子機序の解析

臨床検体を用いたグルタミン代謝活性の評価と臨床病理学的層別化

3. 研究の方法

肺扁平上皮癌 6 株における TP53、c-myc, Nrf2 遺伝子変異と Gls1 および Gls2 発現

これまで、グルタミン欠乏実験により QG56 株を除く 5 株においてグルタミン依存性を確認されている。Gls1 および Gls2 の発現を real-time PCR で検討したところ、QG56 株を除く 5 株において、既報と同様 Gls1 の高発現が確認された。また、グルタミン依存性と Gls1 mRNA/Gls2 mRNA が相関することを明らかにした。今後、TP53 および Nrf2 遺伝子異常の有無や、c-myc 遺伝子増幅や発現増強について解析する。

また、Gls1 と Gls2 のタンパク発現レベルを western blotting で解析した上に、さらに Gls1 と Gls2 のグルタミン依存性における役割を解明するため、遺伝子工学の手法を用いて詳しく検討する。具体的に、

グルタミン非依存性の肺扁平上皮癌株 QG56 において、Gls1 ノックイン或いは Gls2 ノックダウンにより、グルタミン欠乏による増殖抑制が促進されるか？

グルタミン依存性の肺扁平上皮癌株において、Gls1 ノックダウン或いは Gls2 ノックインによるそのグルタミン依存が解除できるか？

Gls1 特異的阻害剤による増殖抑制効果 (in vitro)

Gls1 阻害剤である BPTES を各種濃度で細胞に加えることより、その増殖抑制効果を評価する。グルタミン依存性の肺癌は BPTES に対して感受性が高いことが in vitro で確認されている(右図)。最近 GLS1 特異的阻害剤である compound 968 及び CB-839 のグルタミン代謝阻害による抗腫瘍効果が注目されている (J Clin Invest. 125(6): 2293-06, 2015; ACS Med. Chem. Lett. 2016.)。今後はさらにこれらの阻害剤を用いて肺扁平上皮癌における増殖抑制効果を検証する。

グルタミン代謝依存性と mTORC1 シグナルの関連

グルタミン非依存細胞株 QG56 とグルタミン依存性細胞株 におけるグルタミン代謝阻害による mTORC1 活性の低下の有無を下流タンパク (S6、p70 S6K 等) のリン酸化で検討する。細胞培地からグルタミン除去後、グルタミン依存性細胞において mTORC1 シグナルが抑制されていることを明らかにした(右図)。今後、外の下流タンパク (p70 S6K 等) のリン酸化レベルを測定し検証する。また、上記 Gls1 阻害剤によりグルタミン代謝を阻害した後に、グルタミン依存性及び非依存性細胞株において mTORC1 シグナル活性を検討する。

グルタミン代謝阻害によるオートファジー誘導

グルタミン除去により、オートファジーが誘導されることが示されている。グルタミン非依存細胞株 QG56 とグルタミン依存性の RERF-LC-1 におけるグルタミン除去または Gls1 特異的阻害剤投与後にオートファジーが誘導されるか検討する。

具体的には E-16-d と pepstatin A を加えた後、蛋白質を抽出し、western-blotting で LC3-II の発現を評価し、LC3-II の発現増強を認めるか検討する。

GLS1 特異的阻害剤による増殖抑制効果 (in vivo) と組織学的評価

グルタミン依存性の肺扁平上皮癌 (RERF-LC-A1) と非依存性細胞株 (QG56) をスキッドマウスの皮下に移植する。皮下腫瘍が約 100mm³ まで成長した時に GLS1 特異的阻害剤 (BPTES、CB-839 等) を腹腔内注射を行い、飼育をさらに 10 日間続ける。3 日間に 1 回腫瘍のサイズを測定し、腫瘍ボリューム変化を評価する。日数をカウントした後には処分し、腫瘍組織を剥離し、組織学的に評価する。具体的は、HE 染色の他に、抗リン酸化 S6 抗体で mTORC1 のシグナル抑制の有無やオートファジー誘導の有無を検討する。

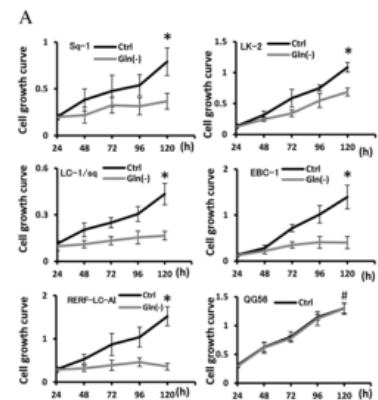
臨床検体を用いたグルタミン依存性に関与する分子の mRNA およびタンパク発現の解析

2001 年から 2013 年までの間に当院において外科的切除された肺扁平上皮癌は 130 例を超える。全例、新鮮凍結検体およびパラフィンブロックは残っており、分化の違う検体を 5-10 例程度それぞれ用いて、GLS1 (KGA と GAC)、GLS2 の mRNA 発現量、および抗 GLS1 抗体 (Novus biologicals より購入可能) 抗 GLS2 抗体 (Atlas Antibodies より購入可能) を用いて免疫染色にてタンパク発現を評価する。それにより、扁平上皮癌の分化度によりグルタミン代謝依存性の高い entity が層別化できる可能性がある。

4. 研究成果

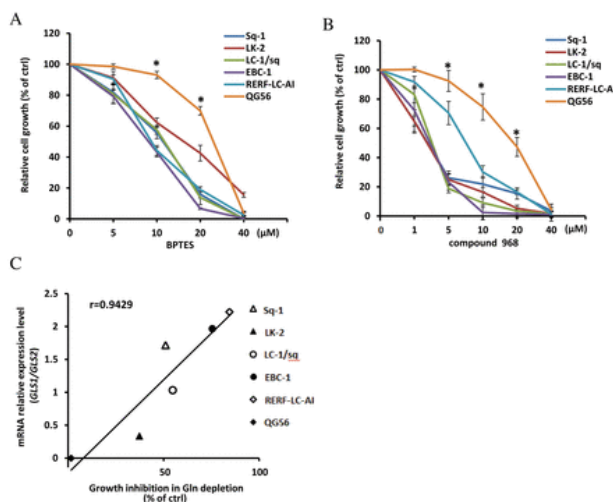
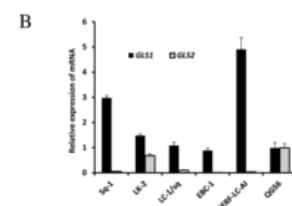
肺扁平上皮癌 6 株における グルタミン依存性の確認

肺扁平上皮癌 6 株 Sq-1, LK-2, LC-1/sq, EBC-1 と RERF-LC-A1 をグルタミン除去培地で培養したところ細胞増殖が抑制されることが確認でき、肺扁平上皮癌 6 株におけるグルタミン依存性を確認した。一方で QG56 はグルタミン除去でも増殖の抑制は確認できなかった。



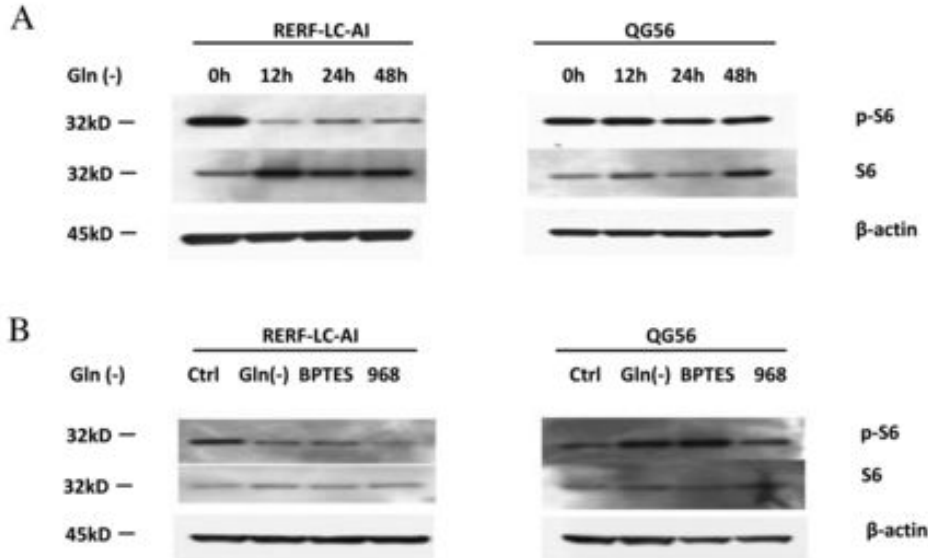
GLS1 特異的阻害剤による増殖抑制効果 (in vitro)

GLS1 阻害剤である BPTES を各種濃度で細胞に加えることにより、その増殖抑制効果の評価した。グルタミン依存性の肺癌は BPTES に対して感受性が高いことが in vitro で確認されていることから、GLS1 特異的阻害剤である compound 968 のグルタミン代謝阻害剤を用いて肺扁平上皮癌における増殖抑制効果を検証した。



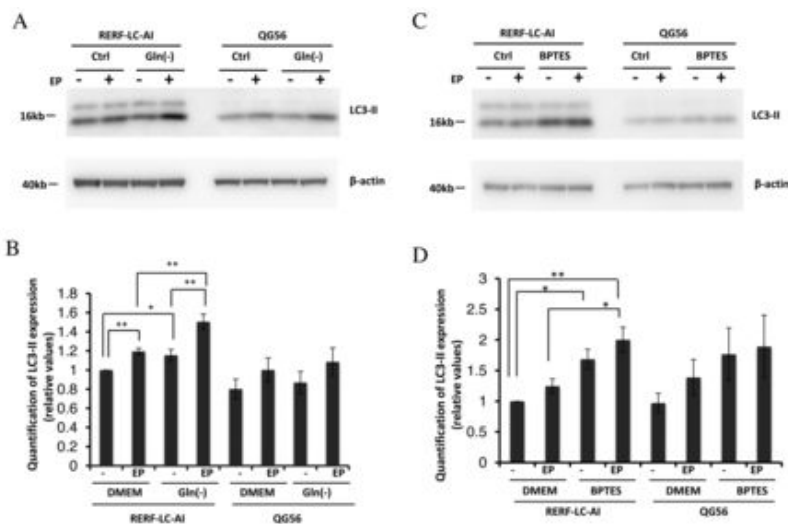
グルタミン代謝依存性と mTORC1 シグナルの関連

グルタミン非依存細胞株 QG56 とグルタミン依存性細胞株 RERF-LC-A1 におけるグルタミン代謝阻害による mTORC1 活性の低下の有無を下流タンパク (S6, p70 S6K 等) のリン酸化で検討した。細胞培地からグルタミン除去後、グルタミン依存性細胞において mTORC1 シグナルが抑制されているのが判明した。他の下流タンパク (p70 S6K 等) のリン酸化レベルを測定し検証した。また、上記 Glis1 阻害剤によりグルタミン代謝を阻害した後に、グルタミン依存性及び非依存性細胞株において mTORC1 シグナル活性を検討した。



グルタミン代謝阻害によるオートファジー誘導

グルタミン除去培地でグルタミン依存性細胞において mTOR1 シグナルが抑制されることが判明した。QG56 とグルタミン依存性細胞株の RERF-LC-1 において E-16-d と pepstainA を加え蛋白を抽出し、western-blotting で LC3-II の発現の増強を検討し、グルタミン除去または Glis1 特異的阻害薬投与によりオートファジーが誘導されることを確認した。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Anticancer Res. 2016 Nov;36(11):6021-6029. Ye X, Zhou Q, Matsumoto Y, Moriyama M, Kageyama S, Komatsu M, Satoh S, Tsuchida M, Saijo Y.

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。