

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09217

研究課題名（和文）再発卵巣癌の抗癌剤耐性克服にむけたメタボローム解析に基づく新規治療開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic development based on metabolomic analysis to overcome the recurrent ovarian cancer with anti-cancer drug resistance

研究代表者

永瀬 智（Nagase, Satoru）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：00292326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：卵巣癌細胞株にパクリタキセルを長期暴露して得られた細胞株においてメタボローム解析を行ったところ、アスパラギン代謝経路が亢進していることを明らかにした。アスパラギン代謝経路の亢進は、卵巣癌細胞の細胞増殖を活性化し、アスパラギン代謝経路を抑制することでパクリタキセルの感受性を増強させた。この研究成果により、卵巣癌におけるタキサン製剤の耐性化機序の一つとしてアスパラギン代謝経路があることが示された。生体に近い環境で検証を行うため、卵巣癌患者から腫瘍組織を摘出し、マウスへ移植する patient-derived xenograft (PDX) を作成したが、細胞の継代に課題を残した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌の化学療法としてはプラチナ製剤とタキサン製剤の併用による化学療法が標準治療として確立されている。しかし、再発時は化学療法に対して耐性を示し治療困難となることが臨床問題となる。卵巣癌におけるタキサン製剤に対する耐性機序を代謝経路・産物の観点から分析したところ、その機序の一つとしてアスパラギン代謝経路の関与が示唆された。卵巣癌の再発時には2nd lineの治療としてタキサン製剤が長期投与される場合がある。そのような治療状況下ではアスパラギン代謝経路を抑制する薬剤を併用することで、タキサン製剤耐性と卵巣癌患者の病勢増悪を防ぎ、長期生存に寄与する新しい治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Metabolomic analysis in ovarian cell lines obtained by long-term exposure of paclitaxel showed an enhanced asparagine metabolic pathway. Enhanced asparagine metabolic pathway activated cell proliferation, and suppressing asparagine metabolic pathway increased the sensitivity of paclitaxel in ovarian cancer cells. Our results showed that the asparagine metabolism pathway was associated with taxane resistance in the ovarian cancer. We created a patient-derived xenograft (PDXs) in which tumor tissues were removed from ovarian cancer patients and transplanted into mice in order to validate it in practical environment, but it remained a problem in the passage of the cell.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 抗がん剤 パクリタキセル耐性 メタボローム解析

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌では可及的腫瘍減量術とそれに引き続く化学療法（プラチナ製剤とタキサン製剤による併用療法）が標準治療として確立されている。しかし、抗癌剤に感受性を示し寛解が得られた進行例では高頻度に再発し、再発時は化学療法に対して耐性を示し治療困難となることが臨床上問題となる。

これまで多くの研究により卵巣癌抗癌剤耐性機序に関する遺伝子やタンパク質が同定され、それらを標的とした分子標的治療が行われたが、臨床で十分な効果を示した例は少ない。これは、①薬剤耐性となった再発卵巣癌患者を正確に反映した動物実験モデルが確立されていないため *in vitro*, *in vivo* における研究（前臨床試験）結果と臨床試験における研究結果に乖離があること、②治療標的となる遺伝子やタンパク質の発現を抑制しても、代謝経路などの何らかの代償的機構が働くことで新たな薬剤耐性経路が活性化されることなどが理由として考えられる。

近年、前臨床試験と臨床試験の結果における乖離 (Johnson JJ, Br J Cancer 2001) をうめるため、これまでの *in vitro* 試験で効果を認めた細胞株系を免疫不全マウスに移植する cell line-derived xenograft (CDX) モデルではなく、癌患者由来の組織をマウスに移植する patient-derived xenograft (PDX) が様々な癌種で行われるようになってきた。卵巣癌でも PDX によって抗癌剤 (Ricci F, Mol Cancer 2017) や PARP 阻害剤などの分子標的薬 (Aihilli MM, Gynecol Oncol 2016) の効果が検討されている。一方、酵素などによって作り出された細胞内の低分子化合物群（メタボローム）が近年注目されるようになり、癌に特異的な代謝経路や抗癌剤耐性機序に関する代謝経路も報告されている (Chaneton B, Nature 2012, Yamamoto T, Nat Commun, 2014)。細胞の代謝産物は様々な細胞シグナルを経た最終産物であり、がんの診断・バイオマーカーに用いられるだけでなく治療にも応用できる可能性が指摘されている (Vermeersch KA, J Carcinog, 2013)。卵巣癌治療で大きな問題とされているプラチナ耐性に関連した代謝経路については *in vitro* での研究が報告されているが (Poisson LM, J Ovarian Res, 2015)、*in vivo* における薬剤耐性と代謝経路および代謝因子の関連を検討した報告は未だない。卵巣癌患者由来の検体を用いて、代謝経路・代謝産物の観点から *in vivo* における薬剤耐性のメカニズムを解析することは非常に新規性に富み、これまでとは異なる卵巣癌薬剤耐性を克服するための新規治療法を開発できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

研究開始当初より卵巣癌患者から腫瘍組織を採取し、マウスへ移植する PDX の作成に取り組んできたが、PDX を作成できたのは卵巣小細胞癌の 1 例のみであった。オルガノイド培養を用いて PDX で形成された腫瘍細胞を *in vitro* での培養することが可能となったが、オルガノイド培養によっても細胞の継代が困難であったため、実験および解析に用いる細胞株の樹立までには至らなかった。当初の計画では、前臨床試験と臨床試験の乖離をうめるため、治療経過を反映した再発卵巣癌動物モデルを構築し、そこから得られた検体を用いて、薬剤耐性メカニズムに関連した代謝経路・代謝因子をメタボローム解析によって明らかにする予定であったが、その計画の完遂は困難であった。そこで我々は、PDX ではなく既に樹立されている卵巣癌細胞株の薬剤耐性株を樹立し研究を行うことにした。卵巣癌では再発時プラチナ製剤耐性となった症例では、タキサン製剤が治療薬として使用されることが多いためタキサン製剤耐性獲得機序に着目し、メタボローム解析を用いて代謝経路・代謝産物の観点から卵巣癌のタキサン製剤耐性機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Patient-derived xenograft (PDX) の作成

卵巣癌患者から腫瘍組織を摘出し、腫瘍組織を滅菌 PBS で 2 回洗浄後、ハサミで細片し、トリプシンで 37 度 30 分反応させて 75  $\mu$ m フィルターを通し細胞を回収した。次に、赤血球を red blood cell lysis solution を用いて除去し、回収した腫瘍細胞を培養液で希釈したマトリゲルと混合して 5~6 週齢メス hairless SCID マウス (Cr1j:SH0-PrkdcscidHrhr) の皮下に移植した。

#### (2) オルガノイド培養による PDX 細胞株の樹立

PDX で得られた腫瘍組織を PBS で 5 回洗浄後、ハサミで細片し、dispase と collagenase で 37 度 50 分反応させて細胞を回収した。マトリゲルを重層させた dish へオルガノイド培養液で希釈した腫瘍細胞を播種した。

(3) タキサン製剤耐性卵巣癌細胞株の樹立とメタボローム解析によるタキサン製剤耐性機序に関連した代謝経路・代謝産物の同定

卵巣癌細胞株 A2780 に低濃度のパクリタキセルを 3 か月暴露させ A-PM3 細胞株を樹立した。A2780 と A-PM3 において薬剤非投与をコントロールとし、10nM パクリタキセルを 24 時間投与して A2780(control), A2780(paclitaxel 投与), A-PM3(control), A-PM3(paclitaxel 投与) の 4

検体でメタボローム解析を行った。

#### (4) 卵巣癌細胞におけるアスパラギン代謝経路の機能解析

上記(3)の検討によってタキサン製剤耐性に関連した代謝産物としてアスパラギンが同定された。アスパラギンの合成律速酵素はアスパラギン合成酵素(ASNS)であるため、その発現をA2780とA-PM3および卵巣癌細胞株でwestern blotting法で検討した。また、A2780とA-PM3における細胞増殖能をMTS assay法で検討した。さらにアスパラギン産生を阻害するL-アスパラキナーゼ(LA)を投与して細胞増殖能をA2780, ES-2で検討した。ES-2では薬剤非投与(control)、paclitaxel, LA, paclitaxel+LAにおける細胞増殖能を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) PDXの作成

卵巣小細胞癌患者から採取した組織をhairless SCIDマウスの皮下に投与して形成した腫瘍は、組織を採取した卵巣癌組織と同様の組織像を示した(図1)。

#### (2) オルガノイド培養によるPDX細胞株の樹立

上記(1)の実験で形成された腫瘍の細胞株を樹立するためオルガノイド培養を行ったところ、in vitroでの培養が可能であった(図2)。しかしながら、細胞の継代が困難であったため細胞株の樹立には至らなかった。PDXに由来した細胞株を樹立し、再発卵巣癌モデルを作成することが難しいことは、実験系を計画した時点でも予想されたことであったため、我々は、既存の卵巣癌細胞株を用いて再発治療時の重要な治療薬であるタキサン製剤に焦点をあて、その耐性化機序をメタボローム解析によって代謝経路・代謝産物の観点から研究を行うこととした。

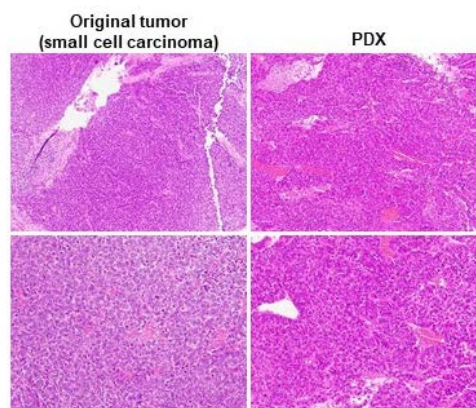


図1

#### (3) タキサン製剤耐性卵巣癌細胞株の樹立とメタボローム解析によるタキサン製剤耐性機序に関連した代謝経路・代謝産物の同定

A2780とパクリタキセル耐性A-PM3に薬剤非添加とパクリタキセル10nMを24時間添加してメタボローム解析を行ったところ、A2780薬剤非添加(control)に比較してA-PM3薬剤非添加(control)ではアスパラギン(Asp)とアスパラギン酸(Asn)の産生が有意に亢進していた(図3)。しかしながら、両細胞株とも薬剤非添加(control)と薬剤添加(paclitaxel)ではAspとAsnの産生に有意差は認められなかった。また、オキサロ酢酸関連アミノ酸(Asp+Asn)の産生は、A2780

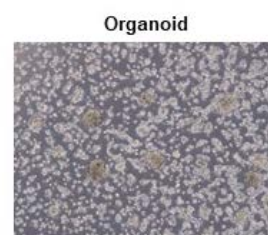


図2

薬剤非添加(control)に比較してA-PM3薬剤非添加(control)で有意に亢進していた。これらの結果からパクリタキセルの短期投

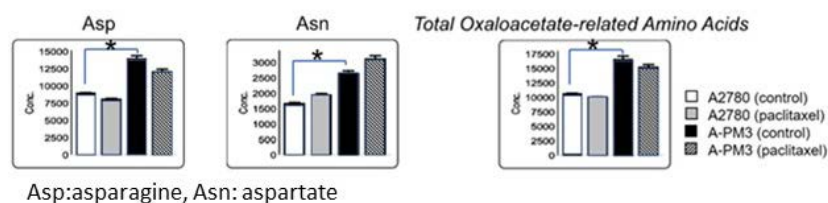


図3

与ではアスパラギン代謝経路の変化はないが、パクリタキセルの長期暴露によりアスパラギン代謝経路が亢進し、パクリタキセルに対して耐性を示すようになる可能性が示唆された。

#### (4) 卵巣癌細胞におけるアスパラギン合成酵素(ASNS)の発現の検討

上記上記 (3) の検討によってタキサン製剤耐性に関連した代謝産物としてアスパラギンが同定された。アスパラギンの合成律速酵素はアスパラギン合成酵素 (ASNS) であるため、その発現を A2780 と A-PM3 で検討したところ、A2780 に比較して A-PM3 では ASNS の発現が亢進していた (図 4 A)。さらに、卵巣

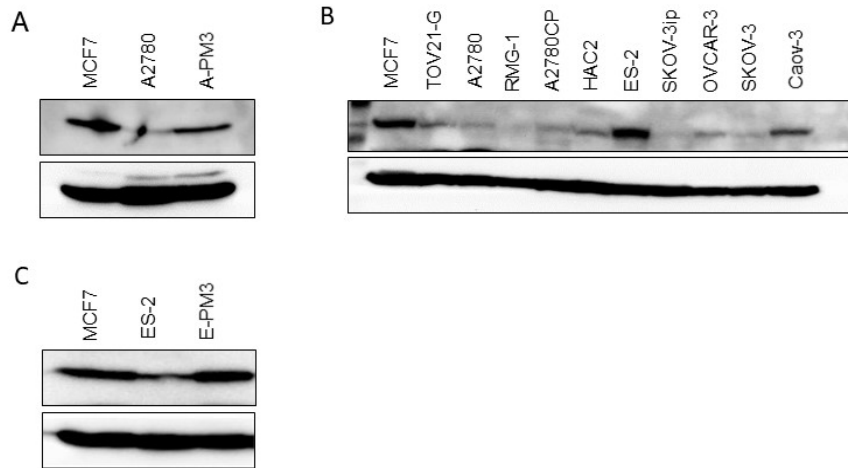


図4

癌細胞株 10 種において ASNS の発現を検討したところ、ES-2 と Caov3 で ASNS の発現亢進を認めた (図 4 B)。そこで我々は ASNS の発現が高発現している ES-2 に低濃度のパクリタキセルを 3 か月暴露させ E-PM3 細胞株を樹立し、ES-2 と E-PM3 において ASNS の発現を検討したところ、ES-2 に比較して E-PM3 では ASNS の発現が亢進していた (図 4C)。

(5) 卵巣癌細胞におけるアスパラギン代謝経路の細胞増殖能に対する影響についての検討

卵巣癌細胞においてアスパラギン代謝経路の亢進が細胞増殖能に対してどのような影響を与えるかを検討するため A2780 と A-PM3 または ES-2 と E-PM3 における細胞増殖能を MTS assay で検討した。A2780 と比較して A-PM3 では細胞増殖能が有意に亢進し、ES-2 と E-PM3 でも同様に E-PM3 で ES-2 と比較して細胞増殖能の有意な亢進を認めた (図 5)。

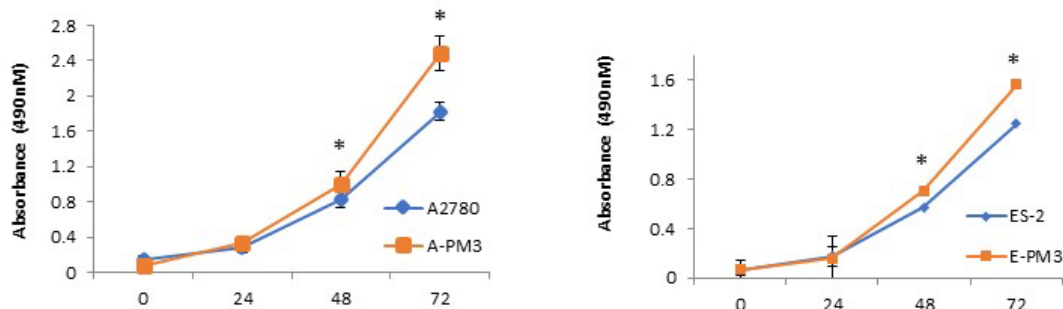


図5

(6) アスパラギン産生阻害による細胞増殖能に対する影響についての検討

アスパラギン産生を阻害する L-アスパラキナーゼ (LA) を投与して細胞増殖能を A2780, ES-2 で検討したところ、A2780 では LA 1 unit でコントロール (薬剤非添加) と比較して有意な細胞増殖抑制効果を認めたのに対して、ES-2 では LA 0.2 unit でコントロール (薬剤非添加) と比較して有意な細胞増殖抑制効果を認め、さらに LA の濃度依存性に細胞増殖抑制効果が高くなった (図 6)。A2780 と比較して ES-2 では ASNS の発現が高く、アスパラギン代謝経路が亢進しているため、A2780 と比較してより低濃度の LA でアスパラギン代謝経路が抑制されることが明らかになった。さらに、ES-2 において薬剤非投与 (control)、paclitaxel, LA, paclitaxel+LA における細胞増殖能を検討したところ、paclitaxel 単剤投与に比較して paclitaxel+LA 併用投与では細胞増殖が有意に低下し、アスパラギン代謝経路を抑制することで paclitaxel の感受性を増強する可能性が示唆された (図 7)。

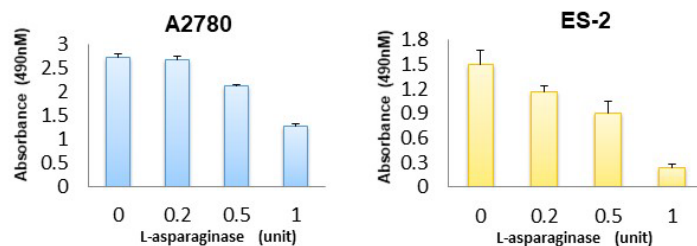


図6

これらの結果から、卵巣癌ではパクリタキセルの耐性機序の一つとしてアスパラギン代謝経路が関連している可能性があり、アスパラギン代謝経路を阻害することで再発時の重要な薬剤であるパクリタキセルの効果を増強またはパクリタキセル耐性であればその耐性を解除する新たな治療法となる可能性が示唆された。

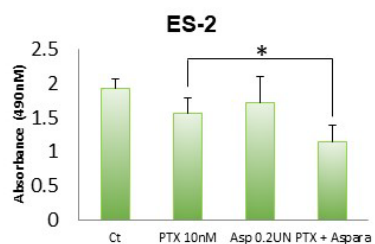


図7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sugiyama A, Ohta T, Obata M, Takahashi K, Seino M, Nagase S.	4. 巻 20 (3)
2. 論文標題 xCT inhibitor sulfasalazine depletes paclitaxel-resistant tumor cells through ferroptosis in uterine serous carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OncoI Lett.	6. 最初と最後の頁 2689-2700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11813	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Seino M, Ohta T, Okui Y, Suzuki Y, Sakaki H, Sudo T, Nagase S
2. 発表標題 Metabolome analysis for discovering new therapeutic target of ovarian cancer cells treated with paclitaxel.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seino M, Ohta T, Okui Y, Suzuki, Y Sudou T, Nagase S
2. 発表標題 Low-dose paclitaxel induces asparagine synthetase expression and increases cell proliferation in ovarian cancer cells
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi K, Seino M, Idei U, Ohta T, Nagase S
2. 発表標題 xCT inhibitor sulfasalazine enhances the efficacy of cisplatin in human uterine serous carcinoma
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋可菜子、太田剛、清野学、永瀬智
2. 発表標題 子宮体癌細胞株に対するスルファサラジンおよびシスプラチンの併用効果の検討
3. 学会等名 第19回日本婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木百合子、清野学、太田剛、永瀬智
2. 発表標題 バクリタキセル長期暴露卵巣癌細胞におけるアスパラギン代謝経路に関する研究
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
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
研究分担者	清野 学 (Seino Manabu)  (40594320)	山形大学・医学部・助教  (11501)	
研究分担者	太田 剛 (Ohta Tsuyoshi)  (50375341)	山形大学・医学部・講師  (11501)	
研究分担者	榊 宏諭 (Sakaki Hirotsugu)  (80744458)	山形大学・医学部・客員研究員  (11501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高橋 可菜子  (Takahashi Kanako)	山形大学・医学部・助教    (11501)	

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