

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07711

研究課題名（和文）難治性神経芽腫治療に直結する代謝拮抗剤の利用法とその作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Utilization of antimetabolite drugs for the treatment of high-risk neuroblastoma

研究代表者

清成 信一（Kiyonari, Shinichi）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70570836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：チミジル酸合成に関わる酵素群に対する阻害剤は肺がんや大腸がんなどの成人がんの治療に広く用いられているが、小児がんである神経芽腫に対する有効性は十分に検討されていない。そこで本研究では国内外で承認済みの葉酸代謝拮抗剤3種の抗腫瘍効果を測定し、その分子メカニズムの解明を行った。その結果、ラルチトレキセドはMYCN増幅型の神経芽腫細胞株に対して選択的に増殖阻害効果を示した。薬剤処理時に細胞内で誘起されるDNA損傷応答の速さと程度に大きな差が見られたことから、MYCN増幅型の神経芽腫細胞内で亢進したDNA複製が各種の葉酸代謝拮抗剤に対する感受性を高めている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少な小児がんである神経芽腫の治療には成人がん用の抗がん剤が用いられている。そのため、小児がんの特性を踏まえた安全かつ治療効果の高い新規治療法の開発が望まれている。本研究により、特に悪性度の高いMYCN遺伝子増幅タイプの神経芽腫細胞が既存の葉酸代謝拮抗剤に対して高い感受性を示すことが明らかとなった。MYCN遺伝子の増幅がみられる患者さんに対しては低用量の葉酸代謝拮抗剤で治療効果が得られる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Conventional anticancer drugs (e.g., platinum compounds) are used for the treatment of neuroblastoma patients with MYCN-amplification, and therefore, the development of a safe and effective therapeutic agent is desired. Thymidylate synthase inhibitors are widely used for colorectal cancers, however, their usefulness in neuroblastoma has not been well examined. Here, we investigated the efficacies of approved antifolates, methotrexate, pemetrexed, and raltitrexed (RTX), on neuroblastoma cell lines. Cell growth-inhibitory assay revealed that RTX showed a superior inhibitory activity against MYCN-amplified cell lines. Interestingly, RTX treatments induced DNA damage response in MYCN-amplified cells to a greater extent. We propose that the high DNA replication stress and elevated levels of DNA damage due to aberrant MYCN expression would be the cause of increased sensitivity to RTX.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：神経芽腫 合成致死 MYCN

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 (以降、MYCN 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、現状では MYCN 増幅の有無に関わらず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の頭打ち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する。一般に転写因子の機能を低分子量の有機化合物で阻害することは難しいとされているため、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機能阻害が致命的に働く遺伝子、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

研究開始までに研究代表者は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の「弱点」とな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 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 に導入して同一条件で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、定量した。ここで IMR-32 において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。結果的に既報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。新規に治療標的分子として注目した細胞分裂期キナーゼに対する阻害剤探索は別の研究課題として遂行する一方、本研究では dTTP 生合成経路に関与する酵素群の治療標的としての評価と実証実験を行う。例えば、チミジル酸シンターゼ (TS) 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 (DHFR) を標的とするメトトレキサートは各種の成人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十分に検証されていない。これら核酸代謝阻害剤のドラッグリポジショニングを念頭に置き、極めて難治性である MYCN 増幅型神経芽腫の新規治療法開発につながる分子基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

国内外で成人がんの治療に用いられている葉酸代謝拮抗剤であるメトトレキサート (MTX)、ペメトトレキサド (PTX)、ラルチトレキサド (RTX) の 3 剤を用いて検証実験を行った。各種の葉酸代謝拮抗剤の作用点を図 1 に示す。これらの薬剤は葉酸と構造上の類似点を有しており、神経芽腫細胞では主に細胞膜上の還元型葉酸輸送体 (RFC) を介して取り込まれる。細胞内で代謝を受けたのちに dTTP 生合成経路に関与する酵素群の阻害を行うが、その作用点は薬剤によって異なる。まず、MYCN 増幅型の神経芽腫細胞株 6 株と MYCN 正常型の細胞株 4 株に対する細胞増殖阻害活性を測定した。その結果、いずれの葉酸代謝拮抗剤も MYCN 増幅型の神経芽腫細胞株に対して強い細胞増殖阻害効果が確認されたため、その分子メカニズムの解明に着手した。一般的な薬剤耐性のメカニズムに従って仮説を立て、細胞内への薬剤の取り込みと排出の状態を観察した。薬剤取り込みにおいて重要な RFC の発現量はウエスタンブロッティングにより解析し、薬剤の排出については蛍光ラベルで標識した MTX の細胞内存在量をフローサイトメーターにより解析した。各薬剤の標的酵素の細胞内発現量は薬剤の感受性に影響を与えるため、RFC と同様にウエスタンブロッティングにより発現量の比較を行った。細胞増殖阻害の原因を精査する中で、アポトーシス性の細胞死の発現がみられたため、経時的な DNA 損傷応答の変化をウエスタンブロッティングにより観察した。

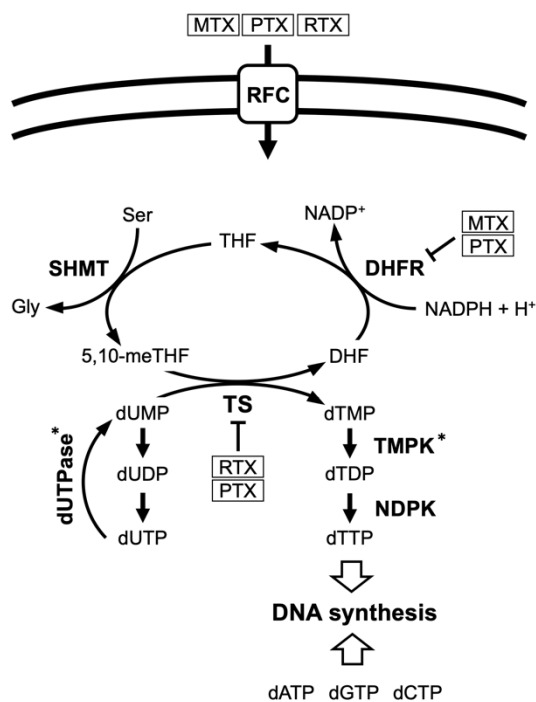


図 1 葉酸代謝阻害剤の作用点

#### 4. 研究成果

代表的な *MYCN* 増幅型の神経芽腫細胞株 6 種と *MYCN* 正常型の細胞株 4 種に対する葉酸代謝拮抗剤の細胞増殖阻害活性を測定した。様々な濃度の薬剤で 3 日間処理したのちに細胞生存率を測定した。MTX、PTX、RTX のいずれの 3 剤も *MYCN* 増幅型の神経芽腫細胞株に対して強い細胞増殖阻害効果を示した。代表的なものとして MTX の結果を図 2 に示す。この選択性が葉酸代謝拮抗剤に特徴的であることを検証するため、一般的な抗がん剤であるエトポシド、シスプラチン、カルボプラチンについても同様の試験を行ったところ、*MYCN* 増幅の有無によって明確な感受性の差は観察されなかった (data not shown)。

一般的な薬剤耐性のメカニズムとして、①薬剤の細胞内取り込み、あるいは排出の差、②薬剤の標的酵素の発現量の差などが挙げられる。まず、葉酸代謝拮抗剤の細胞内取り込みが *MYCN* 増幅の有無により変わらないことを検証した。ウエスタンブロッティングにより、薬剤取り込みに関与する RFC 蛋白質の発現量を比較したところ有意な差は観察されなかった (data not shown)。更に、*MYCN* 増幅型の神経芽腫細胞株 2 種と *MYCN* 正常型の細胞株 2 種を蛍光標識された MTX (F-MTX) で短時間処理したのちに洗浄を行い、フローサイトメーターにより細胞内の薬剤存在量を蛍光強度により定量したところ、いずれの細胞でも F-MTX 濃度依存的に細胞内取り込み量が増加し、*MYCN* 増幅の有無によって差が無いことが確認された (図 3)。

次に葉酸代謝拮抗剤の標的酵素である TS や DHFR の細胞内発現量をウエスタンブロッティングにより観察したところ、*MYCN* 増幅の有無と薬剤の感受性を関連づける結果は得られなかった。従って、MTX などの葉酸代謝拮抗剤は *MYCN* 増幅の有無に関わらず細胞内に効率的に取り込まれて維持されることがわかり、標的となる酵素分子の発現量にも明確な差が無いことから、一般的な薬剤耐性メカニズムでは本現象を説明できないことが明らかとなった。

*MYCN* 増幅は神経芽腫や小細胞肺がんなどでみられ、転写因子として働く N-Myc の標的遺伝子の発

現量が大幅に増加していることがわかっている。標的遺伝子には細胞内の代謝や細胞周期の進行、DNA 複製と修復に関するものが多く、*MYCN* 増幅が起きているがん細胞では DNA 複製ストレスが高い状態にあると考えられている。そこで、葉酸代謝拮抗剤に対する DNA 損傷応答の違いを *MYCN* 増幅型の細胞株・IMR-32 と *MYCN* 正常型の細胞株・SH-SY5Y の 2 株で比較した。最も強力な細胞増殖阻害効果を持つ RTX を用い、低濃度 (10 nM) で 12、24、48、72 時間処理した細胞を回収し、アポトーシス死のマーカールと合わせて DNA 損傷応答に関わる蛋白質群 (chk1、リン酸化 chk1、chk2、リン酸化 chk2、RPA2、リン酸化 RPA2、p53、p21) の存在量の変化をウエスタンブロッティングにより観察した。その結果、IMR-32 では 48 時間後からリン酸化 chk1 とリン酸化 RPA2 の存在量に明確な上昇が確認された。その一方で、SH-SY5Y では 72 時間後に微弱な上昇が確認されたのみであった。アポトーシス死のマーカールである cleaved-PARP も IMR-32 では 48 時間後から観察され、72 時間後にピークを迎えた。これらの結果から、葉酸代謝拮抗剤により細胞内 dTTP 濃度が低下しつつある状況下において、*MYCN* 増幅型の神経芽腫細胞では亢進した DNA 複製ストレスにより生じる DNA 損傷とその修復が完全に行われず、一本鎖 DNA の露出を伴う DNA 損傷と細胞死が生じやすいことが推測された (図 4)。

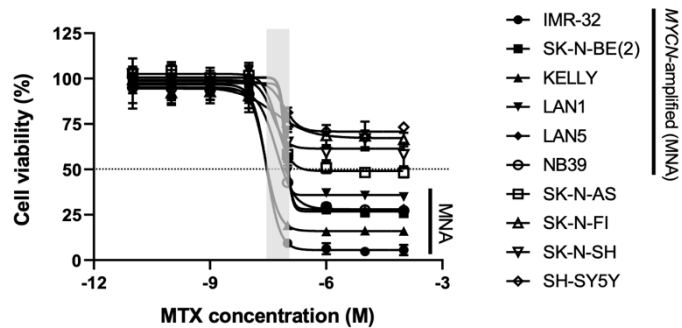


図 2 MTX による細胞増殖阻害

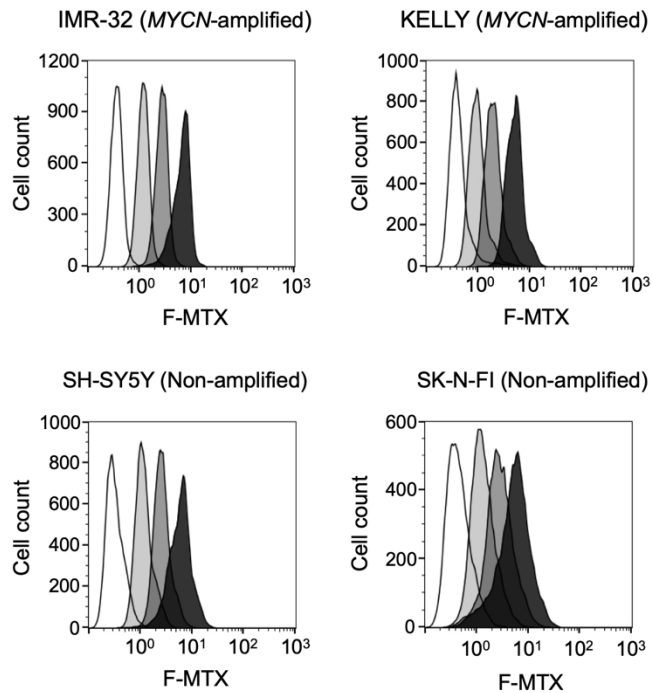


図 3 F-MTX の細胞内取り込みと維持

本研究では葉酸代謝拮抗剤の高次薬効評価系として患者由来腫瘍異種移植 (PDX) モデルの作成を行った。名古屋大学病院において本研究への協力に同意された患者さんから提供を受けた腫瘍組織の一部を超免疫不全マウス (NSG マウス) の皮下に移植し、腫瘍を長期的に維持することを試みた。最終年度までに 8 系統の樹立に成功した(うち、*MYCN*増幅型が 1 系統)。神経芽腫は希少な小児がんであるため、検体の提供数は少なく、また NSG マウスへの生着率も低かった。薬効評価の試験群を組むために NSG マウスよりも安価な免疫不全マウス (BALB/c-nu) へ腫瘍を移植する際にも生着率の低さとマウス皮下における腫瘍増殖の不均一性が問題となった。これらの技術的課題を解決し、貴重な PDX モデルを用いた代謝拮抗剤の治療コンセプト実証を目指して予備試験を継続中である。

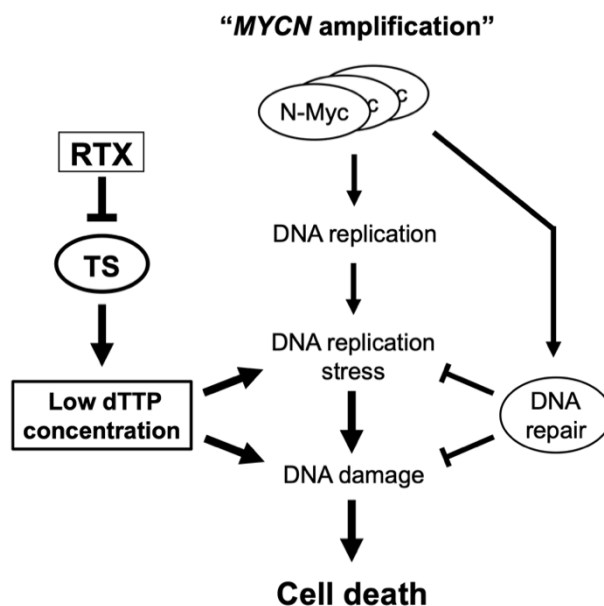


図 4 *MYCN* 増幅と DNA 複製ストレス

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<br>Yamashita Ken, Kiyonari Shinichi, Tsubota Shoma, Kishida Satoshi, Sakai Ryuichi, Kadomatsu Kenji                       | 4. 巻<br>111               |
| 2. 論文標題<br>Thymidylate synthase inhibitor raltitrexed can induce high levels of DNA damage in MYCN amplified neuroblastoma cells | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science   | 6. 最初と最後の頁<br>2431 ~ 2439 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.14485   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Shinichi Kiyonari, Ryuichi Sakai, Kenji Kadomatsu  |
| 2. 発表標題<br>The mechanisms underlying the sensitivity to thymidylate synthase inhibitors in MYCN-amplified neuroblastoma cells |
| 3. 学会等名<br>第80回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kiyonari Shinichi, Sakai Ryuichi, Kadomatsu Kenji  |
| 2. 発表標題<br>Thymidylate synthase inhibitor can promote endogenous DNA damage in MYCN-amplified neuroblastoma cells |
| 3. 学会等名<br>第79回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kiyonari Shinichi, Kadomatsu Kenji  |
| 2. 発表標題<br>Mitotic kinases as synthetic lethal genes in MYCN-amplified neuroblastoma cells |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会学術総会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 西尾 信博<br><br>(Nishio Nobuhiro)<br><br>(00586430) | 名古屋大学・医学部附属病院・特任講師<br><br><br><br>(13901) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|