

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06235・19K21334

研究課題名(和文) がん特異的代謝産物2-HGによるがん細胞代謝変化とがん化のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Understanding metabolic impacts by IDH mutations and validating the efficacy of therapeutic targeting of BCAT1

研究代表者

服部 鮎奈 (Hattori, Ayuna)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：60820420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍や急性骨髄性白血病などの難治性がんにも共通して見つかるIDH遺伝子変異は、オンコメタボライト2-HGを産生することでがん促進的な効果を示すと考えられる。一方で、2-HGは細胞内で働く広範な酵素に影響を及ぼすことから、IDH遺伝子変異がどのようにがんの増殖・維持に機能しているか未解明な部分が残る。本研究では、白血病細胞でがん促進的に働くアミノ基転移酵素BCAT1が2-HGにより阻害されることを発見し、2-HGの持つがん抑制的な側面を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性がんにも共通して見つかるイソクエン酸脱水素酵素IDH遺伝子変異は、がん細胞特異的に変異型IDH(mutIDH)タンパク質を発現させることから、有効な治療標的である。しかし、実際のIDH阻害薬を用いた治療では再発の問題が残る。今回、2-HGの標的因子として新たにがん促進因子であるBCAT1を同定した。今後、IDH阻害薬使用時にBCAT1再活性化が引き起こされるか調べることで、再発を防ぐ治療戦略に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Mutations in IDHs are frequently found in malignant tumors. The mutant IDH (mIDH) lost its normal enzymatic activity and instead gained a new function of catalyzing the conversion of α-KG to D-2-hydroxyglutarate(2-HG). Due to the cancer-specific expression of mIDH, it is regarded as an ideal therapeutic target. However, it is still unclear how IDH mutations maintain tumors. Recent studies have demonstrated that 2-HG not only inhibits many types of α-KG-dependent enzymes. In this study, we identified BCAT1 as a novel target of 2-HG. BCAT1 encodes an intracellular aminotransferase for the branched-chain amino acids (BCAAs). We have recently shown that BCAT1 is functionally essential for leukemia stem cell maintenance. That is, by inhibiting BCAT1, 2-HG has an important aspect of inhibiting cancer growth.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：がん代謝 白血病 アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍や急性骨髄性白血病、軟骨肉腫などの難治性がんが共通して見つかるイソクエン酸脱水素酵素 IDH 遺伝子変異は、がん細胞特異的に変異型 IDH タンパク質を発現させることから、有効な治療標的である。実際に FDA に認可された変異型 IDH 阻害薬は AML に著効する。一方で、変異型 IDH 阻害薬を使用した治療ではしばしば再発が引き起こることが問題となっている。

野生型 IDH はイソクエン酸から ケトグルタル酸 (  $\alpha$ -KG ) を産生する酵素だが、変異型 IDH は  $\alpha$ -KG を 2-ヒドロキシグルタル酸 ( 2-HG ) に変換する新たな酵素活性を獲得する。がん特異的代謝産物である 2-HG は、TET2 や KDM4 などのエピゲノム因子を抑制することで悪性腫瘍への形質転換を促すと考えられている。しかし、一部のがんでは 2-HG ががん抑制的に作用する報告もある。2-HG は  $\alpha$ -KG を用いる多様な酵素に影響を与えることから、促進と抑制という、相反する二つの効果のがん組織に対して示すと考えられるが、2-HG が阻害する標的因子や、それらが腫瘍細胞や周辺組織に及ぼす影響には不明な点が多く残っている。我々の予備的研究から、2-HG は BCAT1 の酵素活性を阻害する可能性が示唆された。分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 BCAT1 は、グルタミン酸と分岐鎖ケト酸 ( BCKA ) から、パリン・ロイシン・イソロイシンを含む分岐鎖アミノ酸 ( BCAA ) と  $\alpha$ -KG を産生する反応を両方向に触媒する酵素である。最近我々は、慢性骨髄性白血病において病期の進展に伴い、BCAT1 の発現量が増大していること、BCAT1 は BCAA 産生を介して白血病幹細胞性の維持に寄与していることを明らかにした。興味深いことに、BCAT1 の発現量は IDH 遺伝子変異がない時には、患者の予後と相関するが、IDH 遺伝子変異がある時には相関しなかった。

## 2. 研究の目的

これらの知見から、本研究では以下の解明を目標として研究を行なった。第一に、変異型 IDH と BCAT1 との関連を明らかにすることで、変異型 IDH によるがん抑制的な効果の作用機序を明らかにする。第二に、IDH 遺伝子変異ががん細胞に及ぼす代謝変化を解明し、この変異が細胞に及ぼす影響を明らかにすることで、再発を防止する新たな治療戦略の足がかりとすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病の細胞は株化できない。したがって、IDH 野生型のヒト白血病細胞株に変異型 IDH 遺伝子を、レトロウイルスを用いて導入し、表現型を解析した。遺伝子導入効率は、IRES を挟んで同時に発現させた hNGFR を FACS により解析した。

(2) リコンビナント BCAT1/2 タンパク質の精製、および活性測定は、ジョージア大学の Bioexpression & Fermentation Facility において行なった。また、高分解能 NMR を用いた測定および解析は、ジョージア大学複合糖鎖研究センターの Dr.Edison 研究室との共同研究において行なった。がん細胞内アミノ酸、ケト酸の測定は、東京大学薬学部整体分析化学教室において行なった。

#### 4 . 研究成果

(1)2-HG が阻害する標的因子としてアミノ基転移酵素 BCAT1 を同定した。

第一に、変異型 IDH の産生する 2-HG が BCAT1 酵素活性を直接阻害するか検討するため、in vitro 酵素アッセイ系を構築した。ヒト BCAT1 および BCAT2 を発現する遺伝子発現コンストラクトを形質転換により導入した大腸菌からリコンビナント BCAT1 タンパク質または BCAT2 タンパク質を生成した。BCAT タンパク質と基質となる分岐鎖ケト産およびグルタミン酸を試験管内で混ぜ、産生された  $\alpha$ -KG を、液体クロマトグラフィーを用いて定量した。その結果、2-HG の濃度依存的に、 $\alpha$ -KG の産生量が減少することが明らかになった。

そこで、この阻害作用が細胞内でも起こっているか調べるため、High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS) NMR を用いて安定同位体ラベルした  $^{13}\text{C}$ -分岐鎖ケト酸から  $^{13}\text{C}$ -分岐鎖アミノ酸が産生される反応を観察した。この方法では、細胞と  $^{13}\text{C}$ -分岐鎖ケト酸をチューブ内で混合し、直ちに、 $^{13}\text{C}$  を持つ代謝産物のみを特異的に検出する HSQC 法を適用した高分解能 NMR を用いて計測した。その結果、コントロール細胞では添加した  $^{13}\text{C}$ -分岐鎖ケト酸から分岐鎖アミノ酸が産生されていたのに対し、2-HG を加えた条件では  $^{13}\text{C}$ -分岐鎖アミノ酸の産生が阻害されていた。さらに、変異型 IDH を過剰発現させた場合にも同様に、 $^{13}\text{C}$ -分岐鎖アミノ酸が観察された。一方で、 $^{13}\text{C}$  ラベルされた分岐鎖アミノ酸を加えた場合には、 $^{13}\text{C}$ -分岐鎖ケト酸の産生は認められなかった。このことは、白血病細胞において、BCAT1 は分岐鎖ケト酸から分岐鎖アミノ酸を産生していることを示している。これらの結果から、変異型 IDH の産生する 2-HG は分岐鎖アミノ酸を産生する BCAT1 の酵素活性を直接阻害することが明らかになった。

(2)変異型 IDH は、BCAT1 の阻害を介して、がん細胞内のアミノ酸代謝を変化させることで、がん抑制的な効果を示す。

BCAT1 が 2-HG の標的因子であることが明らかになったため、この阻害が細胞増殖に与える影響について調べた。IDH 遺伝子変異を持たないがん細胞において、細胞透過性の 2-HG を培地中に添加するか、または、レトロウイルスを用いて導入した変異型 IDH タンパク質を発現させると、半固形培地上でのコロニー形性能が低下した。この低下は BCAT1 の過剰発現により部分的に回復した。一方で、BCAT2 の過剰発現では回復しなかった。この結果から、2-HG による増殖抑制は BCAT1 を介していることが明らかになった。さらに、変異型 IDH を過剰発現させた細胞とさせていない細胞を混合して培養すると、変異型 IDH を発現する細胞の割合が減少した。野生型 IDH の過剰発現では割合の減少は起こらなかった。変異型 IDH 過剰発現細胞の減少は、変異型 IDH 阻害剤の添加で抑えられたことから、変異型 IDH が発現している細胞は周囲の細胞との競合に負け、淘汰される可能性を示唆している。

さらに、RNA-seq 解析および定量的 PCR 法を用いて、変異型 IDH を過剰発現させた細胞の表現型を調べると、細胞周期を制御する遺伝子や炎症性サイトカインの発現が増加することが明らかになった。また、メイギムザ染色により細胞像を観察すると、変異型 IDH の過剰発現によりがん細胞が分化することがわかった。BCAT1 の機能阻害を行なった場合にもがん細胞の分化が誘導されることがわかっている。以上の結果から、変異型 IDH の産生する 2-HG は、BCAT1

の阻害を介して、細胞分化を誘導することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Michael T. Judge, Yue Wu, Fariba Tayyari, Ayuna Hattori, John Glushka, Takahiro Ito, Jonathan Arnold and Arthur S. Edison	4. 巻 -
2. 論文標題 Continuous in vivo Metabolism by NMR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2019.00026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Makoto Nakagawa, Shuhei Fujita, Takuo Katsumoto, Kazutsune Yamagata, Yoko Ogawara, Ayuna Hattori, Yuki Kagiyama, Daisuke Honma, Kazushi Araki, Tatsuya Inoue, Ayako Kato, Koichiro Inaki, Chisa Wada, Yoshimasa Ono, Masahide Yamamoto, Osamu Miura, Yasuharu Nakashima, Issay Kitabayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Dual inhibition of enhancer of zeste homolog 1/2 overactivates WNT signaling to deplete cancer stem cells in multiple myeloma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Machida Y, Nakagawa M, Matsunaga H, Yamaguchi M, Ogawara Y, Shima Y, Yamagata K, Katsumoto T, Hattori A, Itoh M, Seki T, Nishiya Y, Nakamura K, Suzuki K, Imaoka T, Baba D, Suzuki M, Sampetean O, Saya H, Ichimura K, Kitabayashi I	4. 巻 19
2. 論文標題 A Potent Blood-Brain Barrier-Permeable Mutant IDH1 Inhibitor Suppresses the Growth of Glioblastoma with IDH1 Mutation in a Patient-Derived Orthotopic Xenograft Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-18-1349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa M, Nakatani F, Matsunaga H, Seki T, Endo M, Ogawara Y, Machida Y, Katsumoto T, Yamagata K, Hattori A, Fujita S, Aikawa Y, Ishikawa T, Soga T, Kawai A, Chuman H, Yokoyama N, Fukushima S, Yahiro K, Kimura A, Shimada E, Hirose T, Fujiwara T, Setsu N, Matsumoto Y, Iwamoto Y, Nakashima Y, Kitabayashi I	4. 巻 38
2. 論文標題 Selective inhibition of mutant IDH1 by DS-1001b ameliorates aberrant histone modifications and impairs tumor activity in chondrosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 6835 ~ 6849
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-019-0929-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayuna Hattori, Takahiro Ito and Issay Kitabayashi
2. 発表標題 Disease progression by reprogrammed amino acid metabolism in myeloid leukemia
3. 学会等名 The 9th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部鮎奈、伊藤貴浩、北林一生
2. 発表標題 分岐鎖アミノ酸産生によるがん進展の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部鮎奈、伊藤貴浩、北林一生
2. 発表標題 アミノ酸代謝リプログラミングによるがん進展の制御
3. 学会等名 第5回 生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部鮎奈、伊藤貴浩、北林一生
2. 発表標題 がん細胞内における分岐鎖アミノ酸産生のダイナミクス
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----