

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07627

研究課題名（和文）肺小細胞がんにおけるプリン塩基サルベージ経路を介した細胞増殖制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of cell growth control mechanism via purine salvage pathway in small cell lung carcinoma

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肺小細胞がんにおけるプリン塩基サルベージ経路を介した細胞増殖制御機構の解明を目指して研究を行った。プリン塩基の生合成経路には、新規生合成経路とサルベージ経路の2種類があるが、HPRT1というサルベージ経路の重要酵素の遺伝子を欠失させたヒト肺小細胞がん細胞株（KO株）を樹立した。そのKO株を用いて、1．葉酸代謝拮抗薬に対する感受性、2．免疫不全マウスに皮下腫瘍を形成して腫瘍進展への寄与、3．同位体ラベルを用いた新規生合成経路とサルベージ経路の利用割合、これら3点の実験を主に行い結果を得た。その結果、一部の肺小細胞がん細胞株において、サルベージ経路が細胞増殖に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺がんの15%程度を占める肺小細胞がんは、予後の悪いがんであり、新たな治療法開発が要望されているがんの一つである。肺小細胞がんは細胞増殖が盛んであり、そのため進行が速く、細胞分裂像が確認される点からも核酸の生合成を抑制する抗がん剤が今後も有効であると考えられる。本研究では、その核酸生合成の制御機構の研究であり、肺小細胞がんを理解する上で重要な研究である。今回、サルベージ経路だけを阻害するだけでは増殖を抑制することができず、阻害剤単剤を用いる治療は難しいことがわかり、今後も引き続き核酸の生合成機構の解明が必要であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of cell growth control via the purine salvage pathway in small cell lung cancer (SCLC). There are two biosynthetic pathways for purine bases, the de novo biosynthetic pathway and the salvage pathway. I established the SCLC cell lines which deleted HPRT1 (KO cell), that is the enzyme in the purine salvage pathway, and then characterized the KO cells. Using the KO strain, the results were obtained mainly by conducting experiments on these three points, 1. sensitivity to antifolates; 2. measurement of tumor development by forming subcutaneous tumors in immunodeficient mice, 3. the usage ratio of the new biosynthetic pathway using isotope labeling and the salvage pathway. The results suggest that the salvage pathway is important for cell proliferation in some SCLC cell lines.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺小細胞がん 核酸生合成経路 プリン塩基 サルベージ経路

1. 研究開始当初の背景

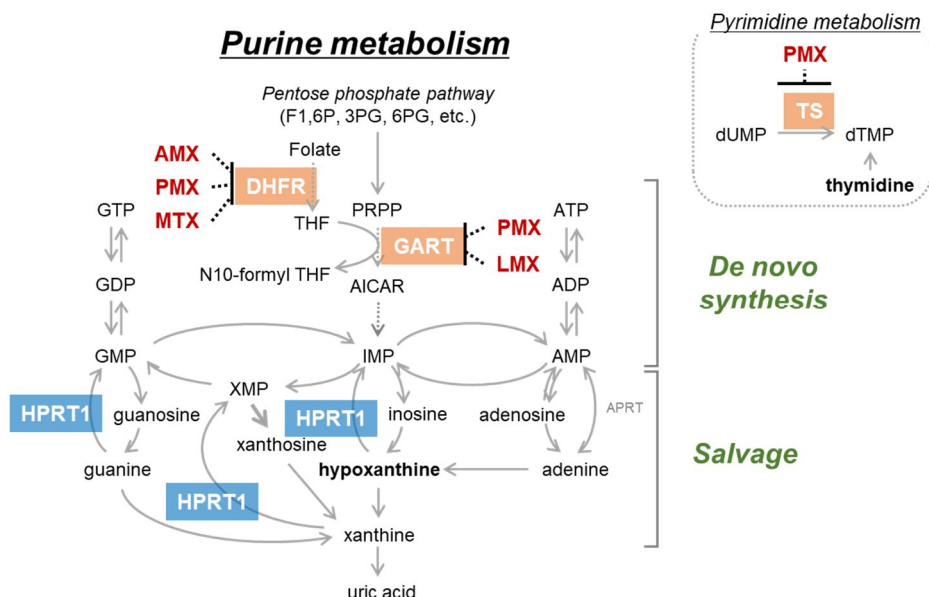
肺がんは、日本においてがん死の第一位（年間約8万人）で、肺小細胞がん（SCLC）は肺がん患者全体の15%程度であるが、増殖・進行が速く、早期に全身転移をきたす予後不良な疾患である。肺小細胞がんに対する治療薬の選択数は少なく、新たな分子標的療法を世界中の研究者が開発中であり、治療後の再発や治療抵抗性が未だに大きな課題となっている。肺小細胞がんの網羅的遺伝子変異を解析し、PI3K/mTOR シグナル伝達経路が有望な新規薬剤標的であることを見出した(Umemura, 2014)。遺伝子変異スクリーニングとPI3Kシグナル伝達経路に関連する遺伝子変異陽性患者に対する新規PI3K/mTOR分子標的治療薬ゲダトリシブの第II相臨床試験が当院を中心に進行中である（EAGLE-PAT）。このゲダトリシブの臨床試験と並行し、PI3K 経路はインスリンシグナル伝達経路に含まれるため、がん代謝との関連が示唆された。そこで、メタボローム解析を用いて肺小細胞がんの網羅的な生体内に存在する代謝産物の解析を行った。肺小細胞がん細胞株と肺腺がん細胞株の代謝産物プロファイルを比較した結果、肺小細胞がん細胞内にプリン代謝産物が特異的に存在することを同定していた。さらに、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塩基を含む核酸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ていた。プリン核酸の生合成経路では、ヌクレオチド構造を持つ Inosine monophosphate (IMP) が最初に合成される。*de novo*（新規合成）経路は低分子物質とATPを使用して多段階の化学反応を経てプリンヌクレオチドを生合成するが、その一方で、サルベージ（再利用）経路は一つの化学反応によりIMPの生合成が可能である。肺小細胞がんに高レベルに含有されるプリン関連代謝産物が、サルベージ経路を介して再利用され、核酸が盛んに生合成されることが肺小細胞がんの速い細胞増殖を可能にする、と仮説を立てた。

2. 研究の目的

肺小細胞がん患者由来腫瘍組織および血漿中でプリン塩基を含む核酸代謝産物が高濃度に存在し、プリン塩基をサルベージ（再利用）する核酸生合成経路が肺小細胞がん細胞の増殖に重要であることを見出した。*de novo*（新規合成）経路は低分子物質とATPを使用して多段階の化学反応を経てプリンヌクレオチドを生合成するが、その一方で、サルベージ経路は一つの酵素により生合成が可能である。がん細胞の特徴は無限な細胞増殖であり、プリン塩基を含む核酸の生合成はがん細胞の増殖に必須であり、肺小細胞がんにおけるプリン塩基サルベージ経路と細胞増殖制御の関連は明らかになっていない。

そこで、本研究は、肺小細胞がんにおけるプリン塩基サルベージ経路を介した核酸の生合成機構を解明し、がん細胞の増殖を制御する分子機序の解明を研究目的とした。この制御機構を明らかにすることにより、がん細胞の増殖に必要なプリン塩基サルベージ経路を阻害する分子標的薬を開発することが可能となる。さらに、葉酸代謝拮抗薬を含む *de novo* 経路の阻害剤と併用することにより、これまでにない新たな肺小細胞がんに対する分子標的療法開発に発展することが期待される。

3. 研究の方法



プリンヌクレオチドの生合成経路には、*De novo* 経路と *Salvage* 経路の2種類が存在する。*De novo* 経路を阻害する薬剤として葉酸代謝拮抗薬があり、DHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) が標的の薬剤としてアミノプテリン (AMX)、ペメトレキセド (PMX)、メトトレキサート (MTX)、GART (ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ) が標的のロメトレゾール (LMX)、PMX、TS (チミジル酸合成酵素) が標的の PMX を本研究では薬剤感受性試験に用いた。*Salvage* 経路の機能を解明する目的で、肺小細胞がん細胞株で、CRISPR/Cas9 システムを用いて、HPRT1 欠失細胞株 (KO 株) を樹立した。KO 株にコントロールのベクターのみあるいは HPRT1 発現プラスミドを、レトロウィルスを介して感染させ、KO 株+ベクター (KO+V) と KO 株+HPRT1 (KO+H) の細胞を作製した。これらの KO+V と KO+H 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、*in vivo* で腫瘍形成および増殖能を評価した。さらに、グリシンの同位体 ($m+3$) で *De novo* 経路由来のプリンヌクレオチド、ヒポキサンチン (hypoxanthine) の同位体 ($m+9$) で *Salvage* 経路由来のプリンヌクレオチドと区別することが可能であり、核酸の生合成がどちらの経路を主に使用しているのか測定した。

4. 研究成果

4-1. 肺小細胞がんの HPRT1 KO 株では、野生株と比較して、葉酸代謝拮抗薬に対する感受性が高かった。同じ傾向で、KO+H 株と比較して、KO+V 株は葉酸代謝拮抗薬に対する薬剤感受性が高かった。代謝産物を加えるレスキュー実験で、薬剤と代謝産物の組み合わせにより異なったが、HPRT1 欠失により LMX に対する感受性が高くなり、HPRT1+ の細胞ではヒポキサンチンの添加により LMX の薬効が消失した。

4-2. 肺小細胞がん細胞株の HPRT1 +/- により、腫瘍の進展が遅くなる細胞株と遅くならない細胞株が存在した。HPRT1 の欠失により、代償的に *De novo* 経路が活性化し、細胞の増殖に必要な核酸の生合成を行っているようである。腫瘍の進展が遅くなる肺小細胞がん細胞株は、細胞増殖が速く、おそらく細胞分裂に必要な核酸量が高いレベルで必要なために、*Salvage* 経路由来のプリンヌクレオチドも必要である。その一方で、HPRT1 が欠失しても、*De novo* 経路で細胞増殖に必要な核酸量を供給できる肺小細胞がん細胞株であることが示唆された。引き続き、*De novo* 経路と *Salvage* 経路を使い分けるメカニズムが肺小細胞がん細胞株に存在すると仮定し、研究を継続している。

4-3. 同位体のグリシンとヒポキサンチンを用い、*De novo* 経路あるいは *Salvage* 経路、どちらの生合成経路を主に用いているか検証した。その結果、ヒポキサンチンの存在下では、*Salvage* 経路を介してプリンヌクレオチドを主に生合成していることが判明した。HPRT1- の条件下のみで、グリシン由来のプリンヌクレオチドが検出された。がん組織を含む生体内ではヒポキサンチンは存在するため、肺小細胞がんは *Salvage* 経路を介して、プリンヌクレオチドを生合成していることが示唆された。

これまでの抗がん剤開発では、*Salvage* 経路を特異的に阻害する薬剤が開発されてこなかった。報告書作成時点では、論文を投稿中であり、成果に関しては詳細を割愛した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ami Maruyama, Yuzo Sato, Joji Nakayama, Junko Murai, Takamasa Ishikawa, Tomoyoshi Soga, Hideki Makinoshima	4. 巻 11
2. 論文標題 De novo deoxyribonucleotide biosynthesis regulates cell growth and tumor progression in small-cell lung carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92948-9	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 Yuzo Sato, Masaru Tomita, Tomoyoshi Soga, Atsushi Ochiai, Hideki Makinoshima	4. 巻 12
2. 論文標題 Upregulation of Thymidylate Synthase Induces Pemetrexed Resistance in Malignant Pleural Mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Pharmacol	6. 最初と最後の頁 718675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.718675	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 牧野嶋秀樹	4. 巻 12
2. 論文標題 メタボロミクスの臨床応用への挑戦	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1
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 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野嶋秀樹
2. 発表標題 がんにおける核酸代謝制御機構の解明
3. 学会等名 第15回メタボロームシンポジウム
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------