

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07689

研究課題名（和文）がん代謝阻害時に誘導される相同組換え修復不全の治療標的化に向けた機序解析

研究課題名（英文）Analysis of mechanisms underlying homologous recombination deficiency induced by cancer metabolism inhibition

研究代表者

岡本 有加（OKAMOTO, Yuka）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：50625217

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）：がん細胞は、解糖系の亢進やグルタミン代謝経路の亢進と言った、正常細胞とは異なる代謝に依存して生存・増殖しており、こういった異常ながん代謝を標的とした治療法の開発が進められている。しかし、がん細胞の代謝経路は可塑性が高く、特定の経路の阻害時に、代替経路の活性化等の適応応答によって生存が可能となることも知られている。従って、がん細胞の代謝を多角的に理解・制御することは特異性および確度の高い治療法開発にとって不可欠である。本研究では、グルタミン代謝に着目し、グルタミン代謝阻害時におけるシスプラチンによる細胞選択的な合成致死誘導の治療応用に向けて、メカニズム解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いた、グルタミナーゼ（GLS）阻害薬は、固形がんを中心に臨床試験が実施され、臨床開発が試みられている。興味深いことに、申請者らの検討から、このGLS阻害薬が、固形がんでも広く用いられる抗がん剤シスプラチンの感受性を細胞選択的に誘導することが明らかとなった。また、合成致死効果への感受性の規定因子候補として、特定の遺伝子発現や遺伝子依存性を見出した。本研究による成果は、GLS阻害薬や代謝阻害薬の臨床開発に有用な新たな知見をもたらすものであったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aberrant tumor metabolisms, such as enhanced glycolysis and glutaminolysis are distinctive metabolic features in solid tumors and can provide potential therapeutic targets. However, cancer metabolisms exhibit high plasticity and are often hard to regulate by merely inhibiting a pathway. We have found that disruption of cancer metabolism can lead to cisplatin sensitization with DNA double strand breaks (DSB) accumulation in certain cancer cell lines. Therefore, in this research, the mechanisms of such homologous recombination deficiency-like phenotype induced by inhibition of glutaminolysis was assessed for therapeutic application of this synthetic lethality.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：がん 解糖系 グルタミン代謝 相同組換え修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

血管形成が不十分な腫瘍組織内において生存・増殖を維持するがん細胞が呈する、解糖系の亢進やグルタミン代謝経路への依存の亢進と言った特徴的な代謝形態を標的とした治療法の開発が進められているが、標的特異性や生体内での活性維持が課題となっている。近年、特異性の高いグルタミナーゼ阻害剤 CB-839 が開発され、腎がん、乳がんなど固形がんを中心に臨床試験が実施されている。グルタミナーゼ(Glutaminase; GLS)は、グルタミン代謝の初期ステップ、グルタミンからのグルタミン酸への変換酵素であり、種々のがんで、腫瘍組織内の発現亢進が報告されている。GLS により生じたグルタミン酸は、 $\gamma$ -KG として TCA サイクルへ入る他、細胞質でアミノ酸・グルタチオン・核酸等の合成に使われることから、グルタミン代謝に依存しているがん細胞で CB-839 は強い増殖抑制効果を発揮する。解糖系やグルタミン代謝活性の亢進には KRAS 等の活性化がん遺伝子が関与していることが知られているが、抗がん剤や栄養飢餓といったストレス等による代謝経路の阻害に際しても、代替経路の活性化等の適応応答がしばしば誘導される。このように、可塑性の高いがんの代謝経路を理解し、多角的に制御することが重要であり、CB-839 の開発に際しても、単剤に加えて、血管新生阻害薬や受容体チロシンキナーゼとの併用などが試みられている。申請者らはこれまでに、グルコース飢餓や解糖系阻害剤処理といった代謝ストレス下での抗がん剤感受性変化について研究を進めており、こうしたストレス下で、細胞障害性の抗がん剤の多くに対しては耐性が誘導される一方で、シスプラチンに対しては高感受性化することを見出した。またこの高感受性化に、細胞内での DNA 相同組み換え修復異常(Homologous Recombination Repair Deficiency; HRD)による、DNA2 本鎖切断(double strand break; DSB)の蓄積が関与していることを見出した。さらにグルコース飢餓のみならずグルタミン飢餓によってもシスプラチン高感受性化が誘導されることを見出し、グルタミン代謝阻害による相同組換え修復阻害を介した合成致死効果について着目するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、グルタミン代謝阻害と抗がん剤シスプラチンによる細胞選択的な合成致死という独自の知見について、分子機序の解明及び治療応用への proof of concept 取得を目指す。血管形成が不十分な腫瘍組織内において生存・増殖を維持するがん細胞が呈する、解糖系の亢進やグルタミン代謝経路への依存の亢進と言った特徴的な代謝形態を標的とした治療法の開発が進められている。最近、特異性の高いグルタミナーゼ(GLS)阻害薬が同定され、固形がんを中心に臨床試験が実施されている。興味深いことに、申請者らの予備的検討により、この GLS 阻害薬が、固形がんで広く用いられる抗がん剤シスプラチンの感受性化を細胞選択的に誘導することが明らかとなった。そこで、GLS 阻害によるグルタミン代謝阻害とシスプラチン感受性化の関係を明らかにすると共に、治療応用への可能性を評価することを目的とした。

### 3. 研究の方法

方法について項目に分けて以下に述べる。

#### グルタミナーゼ(GLS)阻害薬 CB-839 とシスプラチンとの合成致死効果における GLS 活性関与の検証

CB-839 によるシスプラチン感受性化が GLS 活性阻害を介しているかについて検討することを目的として実験を進めた。CB-839 とシスプラチンとの合成致死効果に高感受性を示すヒト肺がん細胞株 A549 および H460 を用いて複数の GLS 阻害剤 BPTES および compound968 処理時に、CB-839 と同様の現象が見られるかについて検討した。さらに、阻害剤処理時の GLS 活性について、細胞内の Glutamine および Glutamate の定量により検討した。また GLS に対する siRNA を用いたノックダウン実験によって同様の効果が得られるかを検討した。

#### CB-839 感受性既定因子の探索

予備的検討により、同じ肺がん細胞株の中でも CB-839 によりシスプラチンに感受性化する細胞株としない細胞株が存在することを明らかとしていた。そこで、がん研究会内で樹立されたがん細胞パネル(JFCR39: 大腸がん、肺がん、胃がん、乳がんなど 10 種類のヒトがん細胞株合計 39 株からなるパネル)を用いて CB-839 とシスプラチンとの合成致死効果を検討し、高い合成致死効果が得られる細胞(群)と合成致死の見られない細胞(群)を同定した。さらに、インハウスの遺伝子発現、メタボロームデータ等のオミクス情報や、公共データベース DepMap (<https://dempap.org>)を活用し、合成致死効果の異なる細胞群の比較解析を行い、合成致死の作用機序解析の足がかりとなる、マーカー候補等の情報について解析を実施した。

#### CB-839 による DNA 相同組換え修復不全(HRD)誘導の作用機序解析

HRD 誘導に際しては、HR 因子の発現、あるいは損傷箇所の HR 因子の集積が阻害されているものと考えられる。そこで、BRCA1/2、RAD51 等の HR 因子の発現について mRNA・タンパク質レベルで検討をおこなった。また、DNA2 本鎖切断について、リン酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX)の免疫染色により検討を行なった。さらに、HR 修復は、細胞周期において S 期特異的に働くことから、CB-839 とシスプラチン共処理時の細胞周期についての検討を実施した。上記の実験については、合成致死感受性の高い細胞株として A549 および H460、感受性の低い細胞として H226 および H1975 を用いた。また、細胞内での CB-839 の効果について網羅的に解析するため、A549 あるいは H460 を用いて、マイクロアレイによる遺伝子発現変動解析および C-SCOPE (Human Metabolome Technologies 社の糖・アミノ酸代謝など、中心炭素代謝に着目した絶対定量法)によるメタボローム解析を行なった。その結果、遺伝子発現変動から統合ストレス応答経路の活性化、メタボローム解析からは TCA 中間体等の減少が見られたことから、これらに着目し、シスプラチン感受性化との関係について解析を進めた。

### 4. 研究成果

A549 および H460 に BPTES あるいは compound968 を処理し、シスプラチン感受性化および

GLS 阻害活性について検討した結果、BPTES 処理により IC50 値約 3 倍と、CB-839 と同様の効果を認めた一方で compound968 ではシスプラチン感受性を認めず、GLS 阻害活性についても、CB-839 と BPTES では強い阻害効果を認めたものの、Compound968 では顕著な阻害効果を認めなかった。また GLS ノックダウンにより、阻害剤よりは弱い効果だったものの、シスプラチン高感受性を認めた。以上の結果から、CB-839 によるシスプラチン高感受性は実際に GLS 阻害を介していることが明らかとなった。

A549 および H460 細胞に CB-839 を処理した際のトランスクリプトーム解析により、両細胞内で共通して統合ストレス応答 (Integrated Stress Response ; ISR) と呼ばれる、EIF2 キナーゼを起点とした、翻訳レベル及び転写レベルでの適応応答シグナルが活性化することが明らかとなった。実際に、CB-839 処理時には ISR において中心的役割を果たす転写因子 ATF4 の発現が上昇していることを確認した。CB-839 による ISR の活性化機序としては、アミノ酸飢餓時に働くキナーゼ GCN2 が関与していることが明らかとなった。さらに、GCN2 特異的な阻害剤 (GCN2iB) を、CB-839 およびシスプラチンと共処理した結果、合成致死効果が低減し、CB-839 とシスプラチンによる DNA2 本鎖切断の蓄積、細胞周期の G2/M での停滞といった現象も GCN2iB により緩和した。以上のことから、CB-839 とシスプラチンとの合成致死には ISR 活性化が関与していることが明らかとなった。

H460 細胞株に CB-839 を処理した際のメタボローム解析により、GLS 阻害時には、TCA の中間体である ケトグルタル酸 (KG)・フマル酸・コハク酸の量が顕著に減少していることを明らかとした。これらの代謝物は、細胞内のエピジェネティクス制御因子 (DNA メチル化酵素、DNA アセチル化酵素など) の基質となることが知られている。このなかで、特に KG 依存的な DNA 脱メチル化酵素 (KDM) は Homologous Recombination との関連が最近報告されていることに着目し、KDM 阻害剤とシスプラチンとの共処理を行った。その結果、複数の KDM 阻害剤により、DSB 蓄積とシスプラチン感受性を認め、CB-839 とシスプラチンとの合成致死に、KG 減少を介したエピジェネティックな制御が関与している可能性が考えられた。実際に、細胞透過性の KG 誘導体の添加によって、CB-839 とシスプラチンとの合成致死効果の低減を認めたことに加え、CB-839 処理による DNA 二本鎖切断の蓄積および ISR の活性化も低減することが明らかとなった。以上のことから、CB-839 とシスプラチンとの合成致死に、KG の低下が重要であることが明らかとなった。

さらに、JFCR39 について、CB-839 とシスプラチンとの合成致死効果感受性の検討を進めた。その結果、GLS 阻害剤とシスプラチンとの合成致死に感受性の細胞株と、抵抗性の細胞株を、がん種横断的に見出した。高感受性を示した 6 細胞株と低感受性であった 7 細胞株について、遺伝子発現や遺伝子依存性の比較を行った。その結果、高感受性株では、mTOR 関連経路や OXPHOS 関連経路の遺伝子発現が定常状態において高く、高感受性株では、OXPHOS 経路に対して高依存性を示す傾向を見出した。

本研究では、グルタミン代謝阻害による相同組換え修復不全様の効果には、KG の低下を介

した ISR の活性化が関与していること、また、mTOR 関連経路や OXPHOS 関連経路の活性およびこれらの経路への依存性が高いことが高感受性の指標になる可能性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本 有加、富田 章弘
2. 発表標題 肺がん細胞株におけるがん代謝阻害剤による相同組換え修復不全様効果の誘導
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本 有加、富田 章弘
2. 発表標題 肺がん細胞株におけるシスプラチン感受性を増強する代謝阻害剤
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本 有加、富田 章弘
2. 発表標題 Metabolic inhibitors that enhance cisplatin sensitivity in lung cancer cells
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究協力者	富田 章弘  (TOMIDA Akihiro)		研究推進の方向性や結果の解釈についてのディスカッション、アドバイスなど

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