

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11585

研究課題名(和文) 卵巣がんにおけるNAC1-PEPCKによる栄養素代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Metabolic pathway of NAC1-PEPCK2 Axis in Ovarian cancer cells

研究代表者

中山 真美 (Nakayama, Naomi)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60713188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規がん関連転写因子NAC1による卵巣癌の代謝経路制御機構を明らかにした研究である。

NAC1は、糖新生のキー酵素であるPEPCK2のプロモーター領域の認識DNA配列(CATGTX)に直接結合し、CARM1をリクルートすることでその転写を正に制御することを明らかにした。さらに下流の代謝経路として、デノボのセリン合成経路を制御することを明らかにした。本経路は卵巣がん治療のターゲットとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、癌治療には様々な分子標的薬が使用されている。その多くは、癌細胞の分裂増殖や血管新生などをターゲットにしている。癌細胞においては、増殖アドバンテージを得るために栄養素代謝経路が変化している。代謝経路をターゲットにした抗がん剤は現時点で存在していないが、今後の新規抗がん剤として注目されている。本研究によりNAC1がPEPCK2を制御することで、癌細胞が効率よく解糖系を活性化すること、セリン合成系を正に制御しデノボセリン合成を活性化することで癌細胞を増殖させていることが明らかになった。外因性セリンを制限しながら本経路を抑制することが、有効な抗がん治療となりえることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study revealed the mechanism by which the novel cancer-related transcription factor NAC1 controls the metabolic pathway in ovarian cancer.

NAC1 directly binds to a recognition DNA sequence (CATGTX) in the promoter region of PEPCK2, a key enzyme in gluconeogenesis, and positively controls its transcription by recruiting CARM1. It was also revealed that it controls the de novo serine synthesis pathway as a downstream metabolic pathway. This pathway could be a target for ovarian cancer treatment.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌代謝 糖新生 セリン合成 NAC1 PEPCK2 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは、婦人科がん領域において最も予後が悪く、わが国を含め世界的に罹患率は上昇している。様々な分子標的薬が使用されるようになったが、過去 50 年の全生存率は殆ど伸長していない。これは、既存の抗がん剤への抵抗性および高い再発率に起因している。よって卵巣がん患者の予後改善には、より効果のある新規抗がん剤の開発が急務である。

一方で、近年、栄養素の代謝経路の異常が癌細胞の特徴の一つとして認識され始めた。癌細胞の特徴として「Hallmark of cancer」が Weinberg らによって提唱されており、現行の分子標的薬は、細胞増殖シグナル・アポトーシス回避等の Hallmark をターゲットとしているものが多い。2011 年の改訂版には代謝機構の異常が加わり、新たな癌の特徴および治療標的として注目を集めつつある(Weinberg RA, Cell. 2011)。癌細胞は正常細胞と比べ、強力な細胞増殖シグナルの活性化により細胞分裂・増殖が亢進している。これを可能とするため癌細胞は、酸素の有無にかかわらずグルコースを利用した解糖経路の活性化を呈すると考えられている。これは Warburg 効果と呼ばれ癌細胞の特徴の一つと考えられており、解糖系の中間生成物によりヌクレオチド、NADPH、グリセロール等の強力な合成を可能にしている。しかし実際の癌を取り巻く微小環境は慢性的なグルコース欠乏状態であり、その濃度は正常組織と比べ、約 10 分の 1 と報告されている (G. Grasmann, et al. BBA. 2019)。そのような環境下で癌細胞は、他の栄養素からグルコースを合成する“糖新生経路”を活性化することが近年報告された。癌細胞が最も多く利用する栄養素は、アミノ酸の一つであるグルタミンであり、糖新生経路の中心的役割を担う酵素が PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) である。PEPCK は oxaloacetate から phosphoenolpyruvate を合成する酵素であり、正常組織では肝臓等の糖新生臓器に限定して発現している。これまで大腸がんで PEPCK が高発現を示し、PEPCK が治療標的となりうることが報告された(Montal E, Molecular Cell 2015)。その他胃がん(Y. Li, Neoplasia 2018)でも PEPCK 発現と予後との関連が報告され、癌細胞での代謝異常は注目を浴びつつある。だが PEPCK 発現亢進は転写レベルであり、その発現制御機構は未だ明らかになっていない。

一方申請者らは、これまでの長期にわたる卵巣がん研究において、新規がん関連転写因子 NAC1 を同定している。卵巣癌組織と正常卵巣上皮での遺伝子発現の比較より、BTB ファミリー遺伝子である NAC1 の発現亢進を同定し、Digital Karyotyping 法により NAC1 は増幅遺伝子である事も同定した(Nakayama, et al., PNAS, 2006) (Shih, Nakayama, et al., Mod Pathol., 2011)。NAC1 発現陰性細胞株に NAC1 遺伝子を安定導入すると、細胞増殖能の亢進を認め、ヌードマウスに NAC1 を安定導入した細胞株を皮下注射すると腫瘍形成を認めた。その腫瘍は NAC1 タンパク質が高発現していた。これらの結果から NAC1 は卵巣がんの発がんに関与することが示唆された。NAC1 高発現細胞株に、BEN ドメイン領域を含む C 末端を欠損した変異型 NAC1 遺伝子導入するとアポトーシスが誘導され、siRNA により NAC1 遺伝子の発現を抑制してもアポトーシスが誘導された(Nakayama, et al., PNAS, 2006)。NAC1 を強制発現させた細胞株において遺伝子レベルが低下する遺伝子群をマイクロアレイ法により検討し、NAC1 の下流の遺伝子として GADD45GIP1 を同定した。GADD45GIP1 はアポトーシスを誘導し、NAC1 は GADD45GIP1 遺伝子の転写を抑制的に制御していると考えられた(Nakayama, et al., Cancer Res., 2007)。また、近年の機能ドメイン解析の結果、NAC1 タンパク質は、N 末端に BTB 領域を有しており、この領域を介して二量体形成することを明らかにした。さらに、NAC1 タンパク質の C 末端には、コンピュータ検索により最近同定された BEN 領域を有しており、試験管内結合実験により、BEN 領域を介して直接 DNA と結合することを証明した。PCR を利用したランダムオリゴ DNA 結合スクリーニング法により、BEN 領域依存的に NAC1 タンパク質に結合する DNA 配列も決定した(Nakayama, et al., Biomedicines, 2021)。さらに申請者らは NAC1 の転写制御に必要な co-factor としてヒストンメチル化酵素である PRMT4 を同定し、NAC1 は PRMT4 と直接結合し下流遺伝子の発現を制御する事も同定し、報告している(Nakayama, et al., Oncotarget, 2018)。これらの研究結果を元に、現在 NAC1 をターゲットとする低分子化合物の同定のため、NAC1 タンパク質の結晶構造解析を行っている。

また申請者らは、NAC1 に制御を受ける下流遺伝子検索の結果、強力に制御を受ける遺伝子として前述の PEPCK を同定している。TCGA データベースおよび申請者らの先行実験により、卵巣がんの約 20% で PEPCK の高発現を認めていることが分かっている。未だ明らかにされていない癌細胞における PEPCK の発現機構の一つとして、NAC1 による制御の可能性が示唆される。これらの事から本研究では、卵巣がんにおける PEPCK 発現の意義、および NAC1 による PEPCK 発現制御を中心とした糖新生経路を活性化する代謝制御機構を明らかにする。そして NAC1-PEPCK をターゲットとした卵巣がんの新規治療法開発の基盤を構築する。

2. 研究の目的

卵巣がんにおいては癌代謝に注目した研究報告は稀であり、未だ不明な点が多い。また、他癌種においても、代謝制御機構に着目した研究は最近注目を浴びつつある分野であり、治療法開発に結び付いているものは未だ報告はない。既存の抗がん剤に対する抵抗性により予後不良である、

また近年罹患者の増加している卵巣がんに関して、癌代謝を標的とした新たな治療戦略のための基礎研究は急務である。このような背景のもと、本研究は、NAC1 による PEPCK2 の転写制御機構を解明し、さらに NAC1-PEPCK2 パスウェイにより制御される代謝経路を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1)卵巣癌手術検体組織標本を用いて NAC1 および PEPCK2 の免疫染色を行い、発現量および両者の発現の相関性を確認する。さらに、両者の発現と患者の長期予後との関連性を確認する。
- (2)卵巣癌細胞株を用いて NAC1 および PEPCK2 の発現を免疫染色で確認する。両者を発現する細胞株を用いて、NAC1 を siRNA を用いてノックダウンし、PEPCK2 の発現を western blot で確認する。
- (3)Human PEPCK 遺伝子の転写開始点の上流に存在するプロモーター領域のフルレングスをオリゴで合成し、エンドジナスな NAC1 を発現していない RK3E 細胞と、その NAC1 stable clone を用いてプロモーターアッセイを行い、NAC1 が細胞内で PEPCK2 のプロモーターを活性化するかどうかを確認する。
- (4)PEPCK のプロモーターには目視で NAC1 の認識配列である 6 個の CATG 配列が存在するため、これをすべてアラニンで置換したアラニンミュータントを作成し、エンドジナス NAC1 を発現した OV207 を用いてプロモーターアッセイを行い、活性の変化を確認する。
- (5)次に 6 個のうち、どの CATG がプロモーター活性に最も重要かを見るために、1 個ずつ削っていく deletion mutant を作成し、同様のプロモーターアッセイを行い、どの CATG 配列がプロモーター活性に重要かを確認する。
- (6)CATG との結合が直接結合かどうかを確認するために、ChIP アッセイを行う。
- (7)NAC1 の co-factor である CARM1 が NAC1 の PEPCK2 プロモーター活性化に必要かどうかを確認するため、CARM1 を siRNA によりノックダウンした状態で前述のプロモーターアッセイを行う。
- (8)NAC1 はグルコースインデペンデントな発育を可能にするかどうか確認するため、グルコースのない微小環境をミミックするために、グルコースを含まないメデイウムを作成し、endogenous な NAC1 を発現していない RK3E 細胞と、同細胞の NAC1 強制発現株を用いてグロスアッセイを行う。
- (9)NAC1-PEPCK により制御される代謝経路を明らかにするために、両者を発現している OV207 細胞を用いて NAC1 をノックダウンし、whole cell メタボローム解析を行う。
- (10)セリン合成経路ががん細胞の増殖に関わっているかを見るために、セリンを含まない medium を用いて、Endogenous NAC1 を発現する OV207 細胞培養し、さらに NAC1 をノックダウンし、グロスアッセイを行う。

4. 研究成果

- (1)卵巣癌において、NAC1 と PEPCK2 の発現は相関しており、両者を発現している卵巣がん患者の長期予後は、DFS, OS とともに予後不良であった。
- (2)NAC1 および PEPCK2 を発現する卵巣癌細胞において、NAC1 のノックダウンにより PEPCK2 の発現も低下することから、NAC1 は PEPCK2 の発現を正に制御する可能性が示唆された。
- (3)RK3E 細胞に NAC1 の stable clone をトランスフェクションした細胞では PEPCK2 のプロモーターを活性が見られたが、コントロールベクターをトランスフェクションした細胞では見られなかったことから、NAC1 は PEPCK2 のプロモーターを活性化することが分かった。
- (4)6 個の CATG 配列すべてをアラニンに変換したミュータントではプロモーター活性が見られなかったことから、いずれかの CATG 配列が活性化に重要であると推測された。
- (5)5 番目の CATG 配列をふくんだ deletion mutant は活性を維持していたが、5 番目を含まないものは活性が減弱した。さらに 5 番目の CATG のみをアラニンで置き換えた mutant でも同様に活性が見られなかったことから、PEPCK プロモーターの 5 番目の CATG が転写活性に重要であることが分かった。
- (6)5 番目の CATG を含む配列に対してプライマーを作成し、OV207 細胞を用いて NAC1 およびコントロール IgG でクロマチン IP およびリアルタイム PCR をおこなったところ、NAC1 で IP したサンプルで有意に強いシグナルを認めたことから、NAC1 は PEPCK promotor の 5 番目の CATG 配列に直接結合することが分かった。
- (7)CARM1 のノックダウンによりプロモーター活性が消失したことから、NAC1 は PEPCK のプロモーター領域の 5 番目の CATG を認識して直接結合し、CARM1 をリクルートして転写を活性化することが分かった。
- (8)NAC1 の stable clone で有意な増殖アドバンテージをみとめたことから、グルコースのない環境では細胞増殖に NAC1 の発現が必須であることが分かった。
- (9)whole cell メタボローム解析のヒートマップより、多くのメタボロームが NAC1 の発現の有無により発現が変化することが分かった。変化のあったメタボロームの詳細を見ると、糖新生経路の一部である PEP およびその上流にある 2-PG, 3-PG が NAC1 のノックダウンにより有意に発現抑制されていた。さらにその先の代謝経路として、de-novo セリン合成経路が有意に抑制されていた。よって、NAC1 は PEPCK の発現制御を介して、OA から PEP、2-PG、3-PG という糖

新生経路の一部と、その先にあるセリン合成をポジティブに制御することが分かった。

(10)OV207 細胞をセリンを含まない medium を用いて培養し、通常の medium の場合と比較すると、その増殖に有意差はないことを確認したのち、NAC1 をノックダウンし、その増殖の差をみたところ、セリンのない medium では、NAC1 のノックダウンにより、そのセリン合成系を抑制すると、細胞増殖抑制がさらに強くなることが分かった。

以上の結果より、卵巣癌関連新規転写因子 NAC1 は、糖新生のキー酵素である PEPCK2 の発現を正に制御している。またその制御の詳細は、PEPCK2 のプロモーター領域に存在する C A T G 配列に直接結合し、コファクターであるヒストンのメチル化酵素である C A R M 1 をリクルートして転写を活性化する。これにより P E P C K 2 が発現し、糖新生経路が活性化され、その下流のセリン合成経路が活性化することで、がん細胞が増殖アドバンテージを得ることが分かった。臨床検体を用いた解析では、N A C 1 および P E P C K 2 が共発現している患者は長期予後不良であることから、今後は N A C 1 をターゲットにすることで癌における代謝経路を制御し、N A C 1 をターゲットにした創薬は卵巣癌患者の予後改善に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naomi Nakayama
2. 発表標題 Cancer Metabolism
3. 学会等名 International Surgical Week（招待講演）（国際学会）
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
研究分担者	中山 健太郎 (Nakayama Kentaro) (70346401)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

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