

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15521

研究課題名（和文）「がん代謝」を標的とする薬剤と抗がん剤を併用した、神経芽腫の新規治療法の創出

研究課題名（英文）Novel therapeutic approach for neuroblastoma by combining anti-cancer drugs with drugs targeting cancer metabolism

研究代表者

渡邊 健太郎（Watanabe, Kentaro）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、神経芽腫に対する「がん代謝」を標的とする治療の臨床応用に向けて、候補薬が与える影響をin vivoで複合的に観察することを目的とした。免疫抑制マウスによる腫瘍マウスモデルに対して候補薬を投与後に腫瘍を摘出し、発現解析と代謝物解析を実施した。発現解析により投薬の作用機序がより明瞭になるとともに、腫瘍細胞の投薬に対する代償作用と思われる変化が観察された。一方、代謝物解析により、腫瘍細胞株により異なる代謝プロファイルの変動が観察され、細胞の代謝動態により生じる薬効が異なることが推定された。今後はこれらの結果の統合による併用薬候補の抽出および治療の最適化を目指した研究を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経芽腫は小児の悪性固形腫瘍のうち脳腫瘍について多く、うち半数程度を占める高リスク例の予後は未だに不良である。また、抗がん剤の大量投与による急性期および晩期の合併症も大きな問題である。このため、効果が高く副作用の少ない新規治療戦略が強く求められる。本研究が着目した「がん代謝」の性質は腫瘍細胞に特異的であり、これを標的とした治療は正常細胞への障害が抑えられることが期待できるほか、従来の化学療法とは異なる機序であることから治療効果の上乗せが期待できる。本研究の2つのモダリティによる成果を複合することで、がん代謝を標的とする治療の臨床応用に向けた最適化に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to observe the in vivo combined effects of candidate drugs targeting "cancer metabolism" on neuroblastoma for clinical application. We performed expression and metabolite analyses on tumor mouse models by removing the tumors after administration of the candidate drugs. Expression analysis revealed the mechanism of the drug and observed compensatory changes in tumor cells in response to the drug. Meanwhile, metabolite analysis revealed different metabolic profiles in different tumor cell lines, suggesting that the metabolic kinetics of the cells result in different drug effects. We will continue our research to integrate these results to identify candidate concomitant drugs and treatment optimization.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：神経芽腫 がん代謝

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児の悪性固形腫瘍のうち、脳腫瘍について多く発生し、このうちのおよそ半数を占め転移を伴う高リスク例については、今日の集学的治療をもってしても予後不良である¹。また、大量化学療法を含む濃厚な化学療法による短期的・長期的な合併症も大きな問題である。このため、化学療法の純粋な強化によらない新たな治療戦略が求められる。

研究代表者らは、先行研究にて神経芽腫に対するデータ解析を行い、細胞内のセリン代謝に関連する PHGDH 遺伝子の発現増強が神経芽腫の悪性度に関連している可能性を見出した。また、細胞実験・動物実験において、PHGDH のはたらきを阻害することが神経芽腫の増殖を抑制し新たな治療標的となりうることを示した²。セリン代謝の増強はがん細胞特有の代謝様式である「がん代謝」の一つとして知られている。このような「がん代謝」を標的とする治療は正常細胞への影響が少ないと想定されることから、新たな治療戦略につながる可能性が示唆された。

一方で、この先行研究においては、「PHGDH 阻害剤は *in vivo* で神経芽腫の増殖を抑制するものの、根絶するには至らない」ということや、「*in vitro* と *in vivo* において細胞株ごとの薬剤への反応性に異なる点がある」といった問題が残っていた。また、他の先行研究において「がん代謝」を標的とする治療には耐性が出現しやすく、単独での効果が限定的であることがしばしば問題とされてきた。

これらの課題に対しこれまで研究代表者らは、*in vitro* の実験において投薬後の遺伝子発現解析及び代謝解析を行い、その中で薬剤の *on target effect* を確認するとともに腫瘍細胞が呈する代償作用についての観察を行った。また、この代償作用に対して一部の薬剤でさらに干渉することにより、治療効果の増強が得られた。この結果から、*in vivo* でも同様の投薬後の解析を行うことにより、投薬に際して腫瘍細胞が呈する反応の観察を行うことで、有望な薬剤(抗がん剤など)を併用することによる効果的な併用療法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、セリン産生の増強という「がん代謝」を標的とする候補薬剤が神経芽腫細胞に対して与える影響を、*in vivo* の条件下で遺伝子発現・代謝動態という 2 つの軸から観察することを主眼としている。これにより、候補薬剤が *in vivo* において腫瘍細胞に与える影響を、遺伝子発現による機能面での変化や代謝様式の最適化といった具体性の高い形で捉えることが可能になる。投薬に対する腫瘍細胞の反応や代償作用をより精度良く捉えることにより、抗がん剤を含む新たな併用薬剤の選定など、治療応用にむけた投薬の最適化を目指すことが見込まれる。最終的には、神経芽腫に対する効果が高く副作用の少ない治療方法の開発につながるのと同時に、成人がんを含めた悪性腫瘍に対する「がん代謝」を利用した治療研究に資することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究においては、神経芽腫の細胞株を皮下移植した免疫抑制マウスを用い、候補薬剤の投薬後に回収した腫瘍をもとに解析を行った(図 1)。

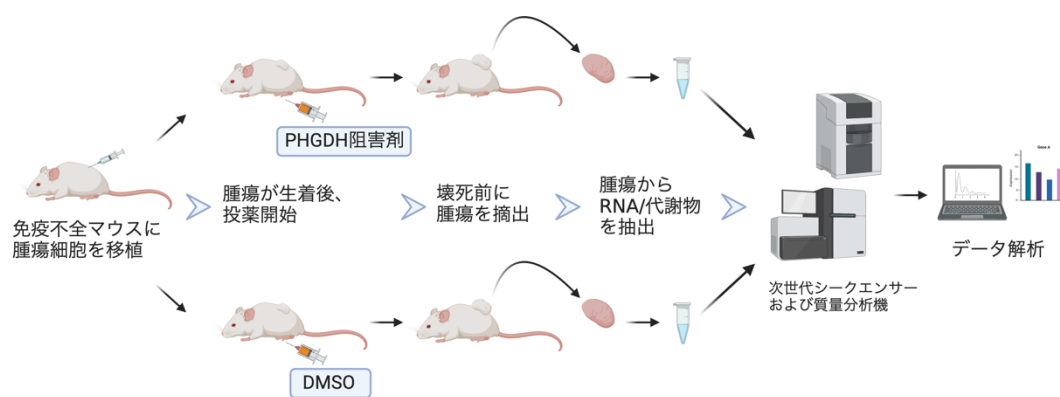


図 1: マウスを用いた実験のシエマ。投薬後に摘出した腫瘍を対象とする。

腫瘍モデルマウスの作成と投薬

免疫抑制マウスの背部皮下に神経芽腫細胞株を注射し生着を確認後に、セリン生合成に関わり難治性神経芽腫で発現が亢進している PHGDH に対する阻害剤、もしくは溶媒のみを腹腔内に投

与した。候補薬剤の投与により時間経過とともに腫瘍が壊死し液状化することから、先行実験にて決定した短期間の日数のみ投薬を行い、その後腫瘍の摘出を行った。腫瘍塊に対する切離により一部から RNA 抽出を行い、別の一部を凍結後粉砕することにより代謝物測定に用いた。

投薬後腫瘍に対する遺伝子発現解析

腫瘍から抽出した RNA を用いて、RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析を行った。シークエンスデータに対するアラインメントおよびリード数解析とノーマライゼーションを経て発現量データを得た。投薬群と溶媒群の発現変動解析および遺伝子セットエンリッチメント解析により発現変動が生じた遺伝子および遺伝子セットの抽出を行った。

投薬後腫瘍に対する網羅的代謝物解析

凍結腫瘍を材料とした CF-TOFMS による網羅的代謝物測定(メタボローム解析)を行った。2 種の代謝動態が異なる神経芽腫細胞株を用い、それぞれに対する投薬群と溶媒群での代謝物プロフィールの比較を行った。

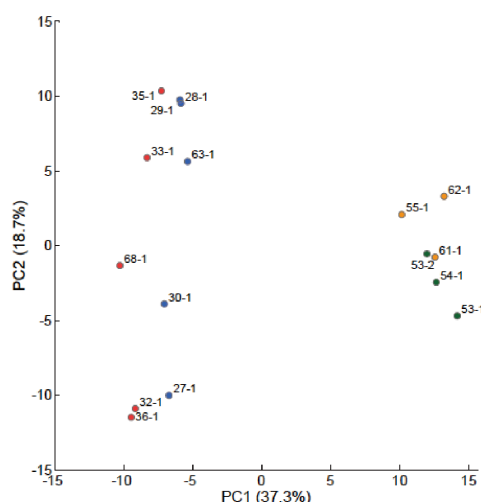
4. 研究成果

投薬後発現解析による変動遺伝子の観察結果

投薬群と溶媒群の発現変動遺伝子の抽出において、セリン代謝に直接関連する代謝関連遺伝子の発現変動は乏しく、in vitro での条件に比べて直接的な変動は明瞭ではなかった。投薬により細胞接着・増殖シグナルに関連する遺伝子セットの減弱がみられる一方で、蛋白産生や酸化的リン酸化の増強がみられ、細胞の代償作用やセリン産生経路の遮断による解糖系の亢進が生じていると想定された。

投薬後代謝解析による代謝動態の変化の観察結果

投薬後の代謝物量の比較において、PHGDH 発現の強い細胞株においては解糖系下流物質の増加傾向や、セリン合成経路の下流である酸化ストレス対応物質の減少傾向がみられる一方で、PHGDH 発現の比較的弱い細胞株ではそれらは明瞭にはみられなかった。主成分解析において、2 種類の細胞株において治療による変化は異なる軸の方向でみられていることから、細胞ごとに投薬の与える影響には差異があることが示唆された。



青 細胞株 A 投薬なし
赤 細胞株 A 投薬あり
緑 細胞株 B 投薬なし
黄 細胞株 B 投薬あり

図 2: 代謝物測定量をもとにした主成分解析の結果。細胞株ごとに投薬がもたらす変化は異なっている。

今後は、代謝物セットエンリッチメント解析や、遺伝子発現と代謝物量の複合経路解析を加えることで、投薬による影響の具体的な理解に結びつける試みを行い、がん代謝を標的とした治療の最適化にむけた研究を継続する。

参考文献

1. Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and practice of pediatric oncology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2015.
2. Watanabe K, Kimura S, Seki M, et al. Identification of the ultrahigh-risk subgroup in neuroblastoma cases through DNA methylation analysis and its treatment exploiting cancer metabolism. *Oncogene*. 2022;41(46):4994-5007.

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 Watanabe K, Kimura S, Seki M, Isobe T, Kubota Y, Sekiguchi M, Sato-Otsubo A, Hiwatari M, Kato M, Oka A, Koh K, Sato Y, Tanaka H, Miyano S, Kawai T, Hata K, Ueno H, Nannya Y, Suzuki H, Yoshida K, Fujii Y, Nagae G, Aburatani H, Ogawa S, Takita J.	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of the ultrahigh-risk subgroup in neuroblastoma cases through DNA methylation analysis and its treatment exploiting cancer metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4994 ~ 5007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02489-2	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Watanabe K, Kimura S, Seki M, Isobe T, Kubota Y, Sekiguchi M, Sato-Otsubo A, Hiwatari M, Kato M, Oka A, Koh K, Sato Y, Tanaka H, Miyano S, Kawai T, Hata K, Ueno H, Nannya Y, Suzuki H, Yoshida K, Fujii Y, Nagae G, Aburatani H, Ogawa S, Takita J.
2. 発表標題 The ultrahigh-risk subgroup in neuroblastoma cases identified through DNA methylation analysis and its treatment which exploit cancer metabolism.
3. 学会等名 ANR meeting 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊健太郎, 高杉奈緒, 竹林晃, 磯部知弥, 佐藤垂以子, 樋渡光輝, 滝田順子, 加藤元博.
2. 発表標題 がん代謝を標的とした候補薬の神経芽腫におけるメカニズムの検証.
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------