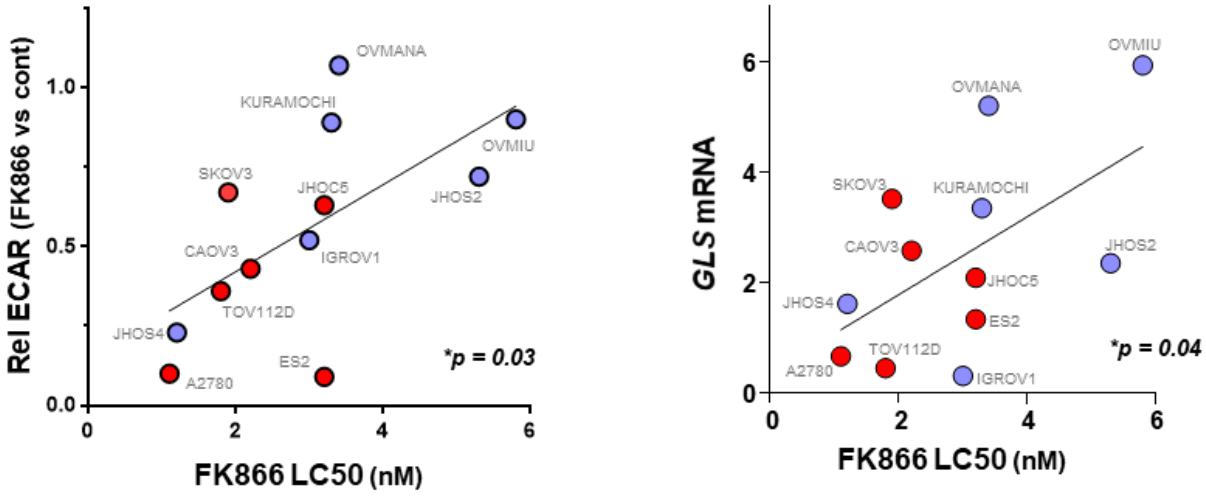
44　がんにおける代謝ネットワークロバスト性の分子基盤	田沼　延公

【目的】がん代謝は、近年、新規治療標的としての開発が期待され、多くの研究がなされてきたが、臨床応用までに越えなければならないハードルは多い。その一つが代謝ネットワークの恒常性であり、少々の干渉では、代償経路の活性化やフィードバック等を介した緩衝作用によって、うまく回避されてしまうことが多い。そのような代謝ネットワークロバスト性が垣間見られる現象として、例えば、NAD 合成に対する応答が挙げられる。本課題では、NAD 合成阻害、とくに NAD サルベージ経路の遮断に対し感受性を異にする腫瘍細胞群同士を比較することにより、がんにおける代謝ネットワークロバスト性分子基盤の一端を明らかにすることを目的として、研究を行った。

【方法】ヒトがん細胞株パネルを 2 種類の NAD 合成阻害剤にて処理し、リアルタイム細胞増殖アッセイ、コロニー形成試験、細胞外フラックス解析による代謝解析等を行った。NAD 合成阻害剤としては、サルベージ経路の律速酵素 NAMPT に対する阻害剤を使用した。また、代謝物の定量、網羅的な遺伝子発現解析も行った。

【結果】リアルタイム細胞増殖アッセイにより、コロニー形成試験条件の最適化を行った。その結果を踏まえ、ヒトがん細胞株パネルの NAMPT 阻害剤に対する感受性を、コロニー形成試験によって精査した。同様に、PARP 阻害に対する感受性についても調べた。PARP は、NAD を基質として用いタンパク質をポリ ADP リボシル化する酵素であり、この分子群に対する阻害剤は、既に臨床にて治療に用いられている。ほとんどの細胞において、PARP 活性は、NAMPT 阻害によって著しく低下することから、NAD サルベージへの依存が顕著であることが分かった。コロニー形成試験の結果、NAD 合成阻害や PARP 阻害に対する感受性は、細胞株毎に大きな差異があることが分かった。意外にも、NAD 合成阻害と PARP 阻害に対する感受性はまったく相関しないことが分かった。従って、NAD 合成阻害がもたらす増殖抑制作用は、特に感受性が高い細胞株の群においては、PARP 活性低下以外の作用ルートも含むことが強く示唆された。NAD を基質に合成される NADPH レベルも検討したが、NAD サルベージ阻害への感受性に一致するような結果は得られなかった。細胞外フラックス解析等を用いたその後の詳細な検討により、NAD 合成阻害に対して感受性の低い細胞株は、1. サルベージ経路を介する NAD 合成に非依存的な乳酸産生能を有していること、2. グルタミン代謝に関わる酵素、GLS を高発現する傾向があること、が明らかになった。GLS の高発現が、NAD サルベージに依存しない乳酸産生の直接の原因か否かは明らかになっておらず、今後、さらなる検討が必要と考えられた。また、いくつかの検討項目において、BRCA 遺伝子変異の有無が、NAD 合成阻害への感受性や乳酸産生の NAD サルベージ依存性などの点において、弱いながらも相関する傾向、あるいは統計的に有意な差異が認められた。

NAD サルベージ経路阻害に対する感受性は、同経路に依存しない乳酸産生・GLS 遺伝子発現レベルと逆相関する



44. がんにおける代謝ネットワークロバスト性の分子基盤

田沼　延公

宮城県立がんセンター がん薬物療法研究部

Key words：がん，代謝

緒　言

がん代謝は、近年、新規治療標的としての開発が期待され、多くの研究がなされてきたが、臨床応用までに越えなければならないハードルは多い。その一つが代謝ネットワークの恒常性であり、少々の干渉では、代償経路の活性化やフィードバック等を介した緩衝作用によって、うまく回避されてしまうことが多い。そのような代謝ネットワークロバスト性が垣間見られる現象として、例えば、NAD 合成に対する応答が挙げられる。本課題では、NAD 合成阻害に対し感受性を異にする腫瘍細胞群同士を比較することにより、がんにおける代謝ネットワークロバスト性分子基盤の一端を明らかにすることを目的として、研究を行った。その結果、解糖系反応の違いが、腫瘍細胞の NAD 合成阻害への感受性・耐性と相関することが明らかとなった［1］。

方　法

1.　細胞株パネル

ヒト卵巣がん細胞 SKOV3、CAOV3、JHOC5、A2780、ES2、TOV112D 株は、C. Grandori 博士（フレッドハッチンソンがん研究所）から恵与を受けた。OV-MIU、OV-MANA、KURAMOCHI 株は医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクから、JHOS2、JHOS4 株は理研バイオリソース研究センターから、入手した。

2.　低分子阻害剤

NAD サルベージ阻害剤としては FK-866・GNE-617 を、PARP 阻害としては MK-4827 を使用した。

3.　リアルタイム細胞増殖アッセイ

リアルタイム細胞増殖アッセイは、盛田らの方法に従い、IncuCyte セルアナライザーを用いたタイムラプス画像取得・画像解析にて行った［2］。

4.　コロニー形成アッセイ

細胞を 12 穴プレートに播き、翌日から FK866、GNE-617、MK-4827 による薬剤処理を開始した。薬剤処理の長さは、個々の細胞株がおよそ 50 倍に増殖するのに要する日数（倍加時間をもとに計算）とした。薬剤処理した、あるいは対照の細胞を、固定したのち、スルホローダミン B 色素にて染色し、相対的細胞数を算出した。

5.　細胞外フラックス解析

酸素消費量および乳酸放出量の測定は、シーホース XF96 フラックスアナライザーを用いて行った。専用プレートに播種した細胞を FK866 にて 48 時間処理し、培地をピルビン酸不含かつグルタミン添加した DMEM（緩衝なし）に置換し、測定を行った。定常時の測定の後、ロテノンとアンチマイシンを添加し、同薬剤感受性の酸素消費をミトコンドリア酸素消費として算出した。測定後、細胞をスルホローダミン B にて染色し、補正値の算出に用いた。

6.　酵素学的手法による代謝物の定量

細胞の NADt（NAD^+と NADH の総和）量、NADPHt（$NADP^+$と NADPH の総和）量の測定には、BioVIsion 社のカラーアッセイキットを用いた。

7. 統計解析

二群間の比較ではｔ検定（両側）を、多群間の比較では分散分析のうえ事後比較を行い、統計的有意差の有無を検定した。相関分析は、ピアソンの相関解析により行った。いずれにおいても、P 値が 0.05 未満の差異を統計的に有意と解釈した。

結果および考察

1. 細胞株パネルの NAD 合成阻害感受性

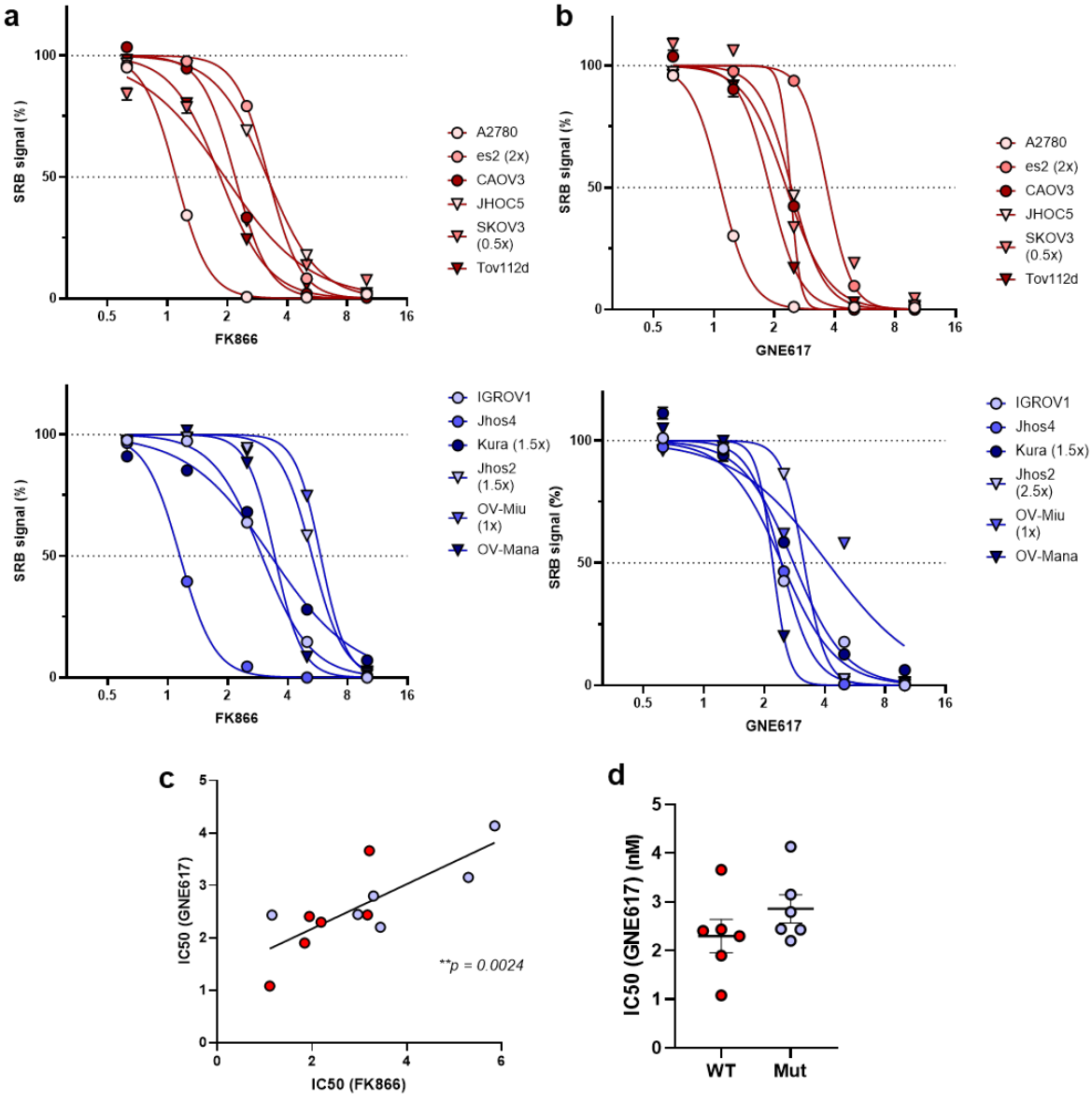


図 1. 細胞株パネルの NAD 合成阻害剤感受性

a) FK866 の細胞増殖抑制能を、コロニー形成試験によって調べた。*BRCA1/2* 遺伝子に機能喪失変異をもたない株を上段に、もつ株を下段にまとめた。

b) GNE-617 への感受性を、a と同様に調べた。*BRCA1/2* 遺伝子に機能喪失変異をもたない株を上段に、もつ株を下段にまとめた。

c) 各細胞株の FK866 および GNE-617 IC50 値の比較。ピアソンの相関解析。

d) *BRCA* 野生型および変異型細胞株の NAD 合成阻害剤感受性の比較。

コロニー形成試験により、二種類の NAD 合成阻害剤（FK866、GNE-617）を用い、細胞株パネルの感受性を調べた（図 1a，b）。これら阻害剤に対する感受性は細胞株によってさまざまであったが、IC50 値を算出して比較すると、FK866 に対する IC50 値と、GNE-617 に対する IC50 値は、よく相関していた（図 1c）。興味深いことに、*BRCA* 遺伝子変異の有無で比較すると、*BRCA* 変異なし（野生型）の株群の方が、NAD 合成阻害剤への感受性が高い傾向が認められた（図 1d ; 統計的な有意差なし）。これら結果を受け、NAD を基質とする DNA 修復関連分子、PARP 阻害剤に対する感受性も調べた。*BRCA* 変異によって PARP 阻害への感受性が高まることが報告されている［3］。コロニー形成試験を行い（図 2a、b）、IC50 値を算出して比較したところ、確かに、*BRCA* 変異をもつ株群の方が、MK-4827 への感受性が高い傾向が認められた（図 2c）。これら結果から、少なくとも調べた細胞株において、NAD 合成阻害への感受性と PARP 阻害への感受性は一致しないことが明らかになった。

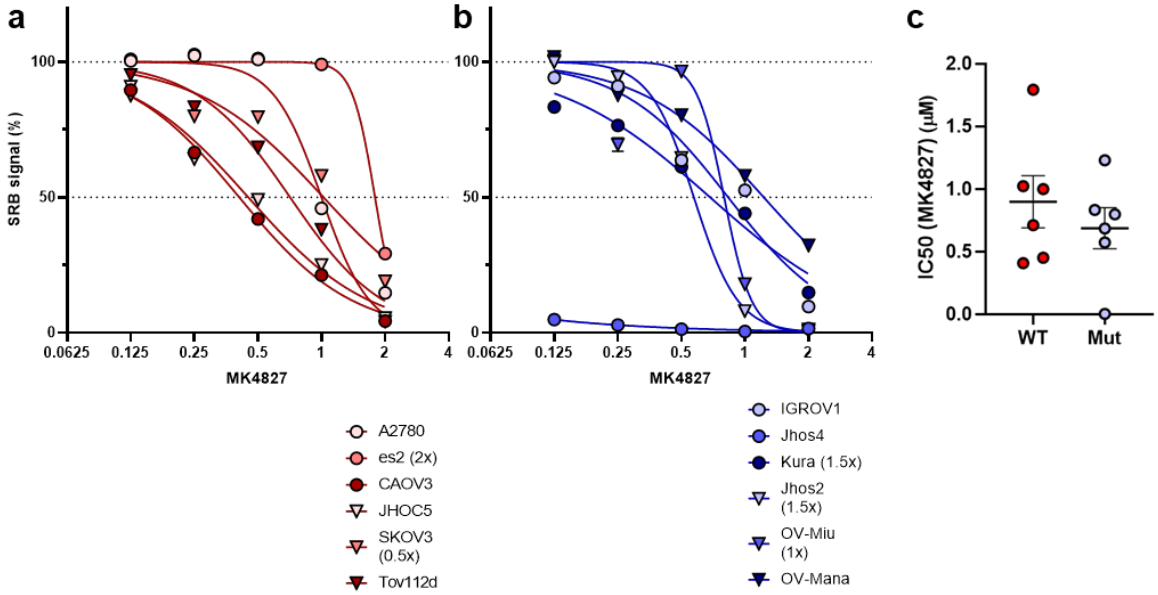


図 2. 細胞株パネルの PARP 阻害剤感受性

a） *BRCA1/2* 遺伝子に変異をもたない細胞株の PARP 阻害剤感受性。

b） *BRCA1/2* 遺伝子に機能喪失変異をもつ細胞株の PARP 阻害剤感受性。

c） BRCA 野生型および変異型細胞株の PARP 阻害剤感受性の比較。

2. NAD 合成阻害感受性と中心炭素代謝との相関

NAD 合成阻害への感受性を規定する因子を明らかにするため、細胞株パネルを用い、FK866 処理に対する代謝応答を調べ、感受性との相関がみられるかを検討することにした。まず、未処理の状態にて乳酸産生および酸素消費量を測定した。興味深いことに、いずれの項目においても、*BRCA* 変異を有する細胞株と比べ、*BRCA* 変異をもたない細胞群の方が高い値を示す傾向があったが、統計的な有意差は認められなかった（図 3a）。

次に、NAD 合成阻害剤 FK866 存在下あるいは非存在下にて 48 時間培養したのちの乳酸産生と酸素消費を計測した。大変驚いたことに、*BRCA1/2* 遺伝子野生型の細胞株では FK866 処理によって乳酸産生が有意に減少したのに対し、*BRCA* 変異型細胞群では FK866 処理の影響がほとんど見られなかった（図 3b）。より重要なことに、FK866 処理によって減少する乳酸産生の減少度と FK866 感受性（IC50 値）とが、有意に相関することが明らかになった（図 3c）。これら結果から、中心炭素代謝（解糖系や TCA 回路）の応答が、NAD 合成阻害への感受性と相関することが強く示唆された。

上記の結果をうけて、解糖系や TCA 回路および関連代謝経路に関わる酵素の遺伝子発現と、NAD 合成阻害への感受性との相関を検討した。遺伝子発現データは、マイクロアレイ解析によって取得した。相関解析を網羅的に行ったところ、グルタミン代謝に関わる酵素 *GLS* の発現量が、FK866 に対する IC50 値を有意に相関することが分かった（図 3d）。すなわち、*GLS* の遺伝子発現が高い株ほど、NAD 合成阻害への感受性が高いことが示唆された。

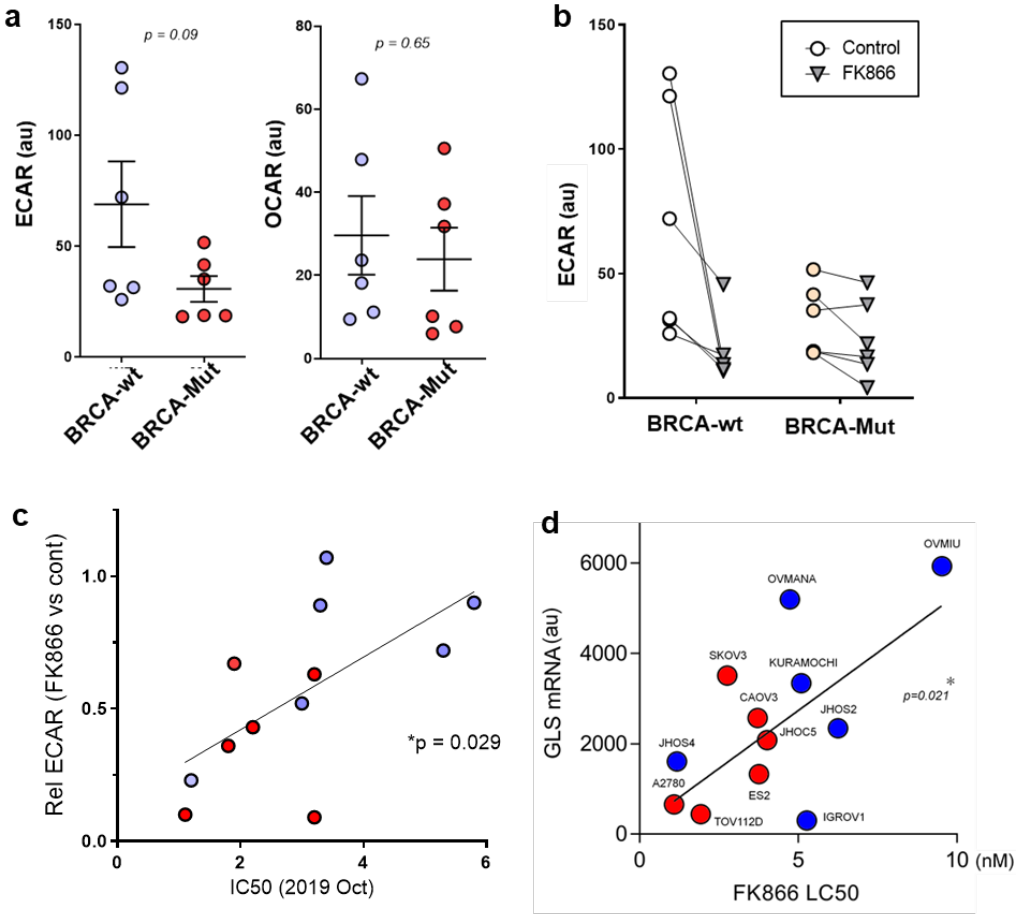


図 3. NAD 合成阻害感受性と中心炭素代謝との相関

a) 各細胞の乳酸放出（ECAR；左）と酸素消費量（OCR；右）を同時測定した。T 検定。

b) 各細胞を FK866 存在下および非存在下で 48 時間培養し、a と同様の測定を行った。*p < 0.05。One-way ANOVA 検定。

c) FK866 IC50 値と FK866 感受性乳酸産生量との相関解析。*p = 0.029。ピアソンの相関解析。

d) FK866 IC50 値と *GLS* 遺伝子発現量との相関解析。*p = 0.021。ピアソンの相関解析。

以上の検討結果から、NAD合成阻害に対して感受性の低い細胞株は、1. NAD合成に非依存的な乳酸産生能を有していること、2. *GLS*を高発現している傾向があること、が明らかになった。*GLS*の高発現が、NAD合成に依存しない乳酸産生の直接の原因か否かは明らかになっておらず、今後、さらなる検討が必要と考えられる。また、いくつかの検討項目において、*BRCA*遺伝子の変異有無が、弱いながらも、NAD合成阻害への感受性や関連形質と相関する傾向が認められており、この点についても、より大規模なパネルを使用するなどしての解明が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院医学系研究科産婦人科学講座の工藤敬、宮城県立がんセンター研究所がん薬物療法研究部の坂本良美、野村美有樹である。

文　献

1) Kudo K, Nomura M, Sakamoto Y, Ito S, Morita M, Kawai M, Yamashita Y, Ito K, Yamada H, Shima H, Yaegashi N, Tanuma N. Divergent metabolic responses dictate vulnerability to NAMPT inhibition in ovarian cancer. FEBS Lett. 2020 Jan 17 [Epub ahead of print] PMID: 31950503 DOI: 10.1002/1873-3468.13736.

2) Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamashita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N. Cancer Cell. 2018 Mar 12;33(3):355-367.e7. PMID: 29533781 DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.004.

3) Lord CJ, Ashworth A. BRCAness revisited. Nat Rev Cancer. 2016 Feb;16(2):110-20. PMID: 26775620 DOI: doi: 10.1038/nrc.2015.21.