

25-A-2 がんの代謝異常（メタボローム異常）に基づく革新的治療法の開発

岡本 康司 国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野

研究の分類・属性

発がん・がん生物学

研究の概要

がん細胞の多くが解糖系に依存したエネルギー代謝を行う Warburg 効果が古くから知られる一方で、近年になって、がんの代謝異常について様々な報告がなされている。さまざまながん腫において、解糖系やその側鎖経路の活性のみならず、最近ではアミノ酸代謝や脂質代謝等の変化と発がん過程の関連を示唆する報告が相次いでいる。これらの変化は、以前はがん細胞のおかれた劣悪な環境、すなわち低酸素状態や低栄養状態に対する細胞の受動的な反応と考えられていたが、最近の研究により、これらの代謝変化は、がん細胞の能動的な生存増殖戦略、すなわち代謝状態を積極的に変える事により、生体内でのアドバンテージを得るための変化であることが明らかになりつつある。実際、解糖系の亢進に代表される代謝動態の変化は、Myc、p53、Akt 等のがん関連遺伝子の制御を受ける事が報告されており、代謝動態の変化が発がん過程に促進的に働くと予想される。興味深い事に、がん幹細胞において解糖系亢進等の代謝変化が報告されており、がん幹細胞の有する造腫瘍性、治療抵抗性等の特質との関連が示唆されている。

急性骨髄性白血病やグリオーマでは、好氣的代謝に重要な TCA 回路の制御因子 IDH1/2 の変異が高頻度で見られ、その結果生じる異常な代謝産物（2HG）ががんの発症に関与することが示唆されているが、申請者らは、急性骨髄性白血病で高頻度に見られる NPM 変異が IDH2 変異と協調して白血病を発症させることを見いだしている。また、大腸がん等の固形がん腫やそのがん幹細胞においても、解糖系やその側鎖である PPP 経路が亢進していることが、申請者らや他のグループより報告されている。

このような研究背景に鑑み、本研究では、さまざまながん腫におけるがん幹細胞または幹細胞の特性を有する細胞の研究グループと、メタボローム解析を中心とした代謝動態の解析を行うグループとの協力体制のもと、がんの代謝異常の本態を明らかにし、今後の治療戦略へ向けた新たな方向性を呈示する事を主目的とする。進歩する代謝産物を測定する革新的技術を応用し、異常代謝産物の診断マーカーへの応用を検討するとともに、がん特異的な代謝異常を標的とした革新的治療薬の開発をめざす。

平成 27 年度研究経費

9,501 千円

研究班の組織

| 研究者名 | 所属研究機関名・職名 | 分担研究課題名 |
|-------|--------------------|-----------------------------------|
| 岡本 康司 | 研究所・がん分化制御解析分野・分野長 | 大腸がん幹細胞及び大腸発がんのメタボローム解析による代謝動態の解析 |

| | | |
|-------|--------------------|---------------------------|
| 市村 幸一 | 研究所・脳腫瘍連携研究分野・分野長 | グリオーマの網羅的メタボローム解析 |
| 濱田 哲暢 | 研究所・臨床薬理部門・部門長 | がん関連代謝物質の質量分析による定量法の確立 |
| 島 豊 | 研究所・造血器腫瘍研究分野・研究員 | 急性骨髄性白血病のメタボローム解析 |
| 佐谷 秀行 | 慶應義塾大学医学部・教授 | 脳腫瘍幹細胞のメタボローム解析による代謝動態の解析 |
| 曾我 朋義 | 慶應義塾大学先端生命科学研究所・教授 | 網羅的メタボローム測定法の確立 |

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標)

(目的)

1. 脳腫瘍、大腸がん、白血病の発がん進展過程における代謝異常の包括的解析を、メタボローム技術を用いて行い、新たな知見に基づいた治療薬の開発をめざす。
2. 脳腫瘍、白血病における IDH 変異による代謝状態への影響をメタボローム解析で検証し、発がんメカニズムの理解を深めるとともに、IDH 変異と同様の代謝異常を持つがん腫に対する治療戦略の構築に努める。
3. 網羅的な代謝産物のメタボローム測定法、及び代謝産物の MS イメージング法の開発を通じて、発がん進展過程における、より詳細な代謝動態の解明をめざす。

(到達目標)

1. がん悪性化過程における代謝異常の包括的解析
脳腫瘍、大腸がん、骨髄性白血病等の、さまざまながん腫において、がん幹細胞を頂点とした階層性の存在が知られている。がん幹細胞は、がん組織の造腫瘍性や治療抵抗性を担う事が知られているが、近年の報告により、これらのがんの悪性化に関わる特性と代謝状態の変化（解糖系の亢進等）の間に密接な関連がある事が明らかになりつつある。従って、これらのがん腫、とりわけ悪性度の高い症例において、幹細胞性を有する細胞集団に特徴的な代謝状態を、メタボローム解析により包括的に検証し、治療標的となりうる分子群を同定する。さらに各がん腫における代謝動態を比較し、がん腫を超えてがん幹細胞に共通する代謝異常の有無を検討する。これらの解析により、難治がんの特徴的かつ治療標的となりうる代謝異常の同定に努める。又、可能であれば、代謝異常を誘導する遺伝子変異あるいはエピジェネティック変化を同定し、創薬にむけた検討を行なう。
2. IDH 変異による発がん促進メカニズムの研究
一部のグリオーマや骨髄性白血病は IDH1/2 変異を持ち、変異の結果産生されるメタボライト (2HG) が発がん進展に関わる事が示唆されているが、その作用機序については未だ不明の点が多い。そこで、IDH1 変異の代謝状態への影響をメタボローム解析で検証するとともに、変異 IDH1 による分子メカニズムを解析する。得られた知見を基に、IDH 変異による代謝異常の是正等による創薬をめざす。
3. 革新的メタボローム測定法による、代謝動態の高精度解析法の開発
細胞中の代謝産物は、それぞれ違った化学的性質、量比、分子量を呈しており、従って広範かつ高感度な代謝産物の解析法の確立は技術的な困難を伴う。しかしながら、網羅的、包括的なメタボローム解析法の確立は細胞中の代謝状態の全体像を理解する上で不可欠である。そこで、より高精度な代謝産物の抽出法、メタボローム測定

法の確立につとめる。確立された高精度メタボローム解析技術を、各グループにおける代謝産物の解明に役立てる。さらに、従来のMSイメージング装置に顕微鏡を加えた質量顕微鏡を用いて、メタボローム解析で同定されたがん特異的代謝産物等の組織学的解析を実施することで、マイクロレベルでの代謝動態の変動を解析する。

(第3年次評価時点の実績要点)

がん悪性化過程における代謝異常の包括的解析

大腸がん、グリオーマ、骨髄性白血病において、幹細胞性を有する細胞集団に特徴的な代謝状態を、メタボローム解析により包括的に検証した。

大腸がんにおいては、大腸がん幹細胞の肝転移性と、トリプトファン代謝経路の産物であるキヌクレニン、及びその合成酵素である TDO2 が関連している事を見出し、これらの代謝特性と転移能の関連が強く示唆された。

グリオーマにおいては、マウス脳腫瘍幹細胞モデルの研究により、酸化リン酸化経路と解糖系経路の双方を可塑的に行き来できる細胞が存在する事、エネルギー代謝において解糖系を優位に用いているクローンだけでなく、酸化リン酸化経路を用いているクローンが存在していて、代謝的見地からがん幹細胞の不均一性が存在する事を明らかにした。このようながん幹細胞の可塑性、すなわち微小環境の変化に対応して代謝経路が変化する事が、治療に対する抵抗性に関与するのではないかと考察された。

白血病においては、NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞において、NUP98 融合タンパク質によって FASN の活性が負に制御され、脂肪酸合成が阻害されていることが示された。一方で、脂肪酸はミトコンドリアでのβ酸化の過程で、アシル CoA、アシルカルニチンに変換されるが、この白血病細胞においてアシル CoA、アシルカルニチン量は逆に高いことから NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞においては、β酸化が異常となっている可能性が示唆された。

IDH 変異による発がん促進メカニズムの研究

パイロシーケンス法を使った高精度の変異 IDH1/2 アッセイ法を開発し、グリオーマ臨床検体 909 例に対して IDH1/2 変異の解析を行い、322 例で IDH 変異(35.4%)を認めた。また、臨床検体を用いたマススペクトロメトリーによる 2HG の定量法を確立し、脳腫瘍組織において、IDH 変異群 における 2HG 濃度が野生型群に比べ有意に高い事を明らかにした。脳腫瘍患者 17 例の血漿中 2HG 濃度の測定煮においては、有意差は得られなかったが、IDH 変異群の血中においてやや高い濃度の 2HG が検出された。

革新的メタボローム測定法による、代謝動態の高精度解析法の開発

メタボローム解析の基盤整備を行い、代謝産物の抽出法、高精度なメタボローム測定法の確立し、代謝解析の基盤技術を整備した。これまでに開発してきたキャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) 法を改良し、シーレス CE-MS 法を新規に開発することによって、数倍の高感度化を達成した。また、CE-MS 法では測定が困難なオンコメタボライト D,L-2HG の分析条件を 光学分割カラムを用いた LC-MS) で確立し、実試料で確認した。

第3年次

(到達目標)

- 1 前年度に確立した液体クロマトグラフタンデム質量分析計を用いた分析方法を用いて、IDH1/2 変異が確認されている脳腫瘍患者の末梢血中における IDH1/2 の代謝産物である 2-Hydroxyglutarate(2HG)の定量を行い、バイオマーカーとしての有用性を評価するとともに、パイロシーケンス法を使った、高精度に全ての変異 IDH1/2 を検出できる新しいアッセイ法の開発をめざす。
- 2 大腸がん、脳腫瘍、白血病由来のがん幹細胞の代謝制御機構の解析をさらに進める。具体的には、転移性大腸がん幹細胞におけるアセチルコリンの役割の解析、グリオーマ幹細胞における、代謝状態の可塑性、NUP98 融合遺伝子を有する白血病における脂肪酸合成酵素 FASN の機能解析等を行う。
- 3 キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) を用いたメタボローム測定法の深化により、探索型研究及び、2HG の解析技術等の向上をめざす。

(年次評価時点の実績要点)

1. 転移性がん幹細胞において上昇する小分子の解析を行い、トリプトファン代謝経路の産物であるキヌクレニンに関しては、転移性がん幹細胞で顕著に上昇している事を確認した。さらに、キヌレニン合成酵素である TDO2 の発現が転移性がん幹細胞において有意に上昇している事を発見した、従って転移能を有する大腸がんにおいては、がん幹細胞において TDO2 の発現誘導が起これ、その代謝産物であるキヌレニンの上昇が転移巣形成において促進的に働く事が予想された。
2. マウス脳腫瘍幹細胞クローンの代謝特性を解析したところ、同じ培養条件でありながら、エネルギー産生を主に解糖系に依存している幹細胞と、酸化的リン酸化経路に依存している幹細胞の両方のクローンが存在していることが明らかになった。酸化的リン酸化経路に依存しているクローンは低酸素条件や、ミトコンドリアにおける ATP 産生を阻害する条件下では、速やかに解糖系にシフトしてエネルギー産生を行うことが明らかになり、がん幹細胞には代謝上の不均一性があり、それは可塑性によって制御されていることが分かった。
3. NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞において、細胞内の脂肪酸、アシル CoA、アシルカルニチンについて網羅的に測定した結果、この白血病細胞は正常細胞に比べて細胞内の各脂肪酸量が少なかった。一方で、アシル CoA、アシルカルニチン量は高いことも明らかとなった。この結果から NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞においては、 β 酸化が異常となっている可能性が示唆された。
4. パイロシーケンス法を使った高精度の変異 IDH1/2 アッセイ法を開発し、累積で 909 例に対して IDH1/2 変異の解析を行い、322 例で IDH 変異(35.4%)を認めた。
5. 前年度に確立した液体クロマトグラフィータンデム質量分析計を用いた 2-Hydroxyglutarate (2HG) の定量法を用いて、脳腫瘍患者検体 17 例における血漿中 2HG 濃度測定を行い、バイオマーカーとしての有用性評価を行った。腫瘍内濃度が高値を示す傾向が認められたが、血漿中濃度が低いことが確認された。なお、質量分析イメージング装置を用いたイメージング解析は条件設定を行っているところである。
6. 光学分割カラムを用いた液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)を用いてオンコメタボライトである 2HG の D 体と L 体の分析条件を確立し、大腸がんの培養細胞でその有用性を確認した。

研究成果と考察

第3年次評価時点

前年度の研究計画において同定した、大腸がん、グリオーマ、白血病がん幹細胞における代謝状態の特徴的変化について下のような更なる解析を行った。

大腸がん幹細胞の解析に関しては、前年度の研究により同定した転移性がん幹細胞において上昇する小分子のさらなる解析を行った。それら小分子のうち、アセチルコリンについては、ELISA法による再検討の結果、顕著な誘導は確認できなかった。一方、前年度同定した分子の一つである、トリプトファン代謝経路の産物であるキヌクレニンに関しては、転移性がん幹細胞で顕著に上昇している事を GC/MS で確認した。さらに、キヌレニン合成酵素である TDO2 の発現が転移性がん幹細胞において有意に上昇している事を発見した、従って転移能を有する大腸がんにおいては、がん幹細胞において TDO2 の発現誘導が起これ、その代謝産物であるキヌレニンの上昇が転移巣形成において促進的に働く事が予想された。

グリオーマ幹細胞の解析に関しては、前年度のマウス脳腫瘍幹細胞モデルの研究により、酸化的リン酸化経路と解糖系経路の双方を可塑的に行き来できる細胞が存在する事を見出していたが、がん幹細胞はエネルギー代謝に必ずしも解糖系を優位に用いているのではなく、酸化的リン酸化経路を用いているクローンが存在していて、代謝的見地から不均一性 (heterogeneity) が存在することが分かった。その上、酸化的リン酸化経路を用いているクローンは可塑性が高く、微小環境の変化に対応して代謝経路が変化することが治療に対する抵抗性に関与するのではないかと考察された。

白血病幹細胞の解析については、NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞において、前年次までに FASN 阻害剤がこの白血病に選択的に有効であることを明らかにしていたが、細胞内の脂肪酸、アシル CoA、アシルカルニチンについて網羅的に測定した結果、この白血病細胞に含まれる各種脂肪酸量が少なかった。従って、NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞において、NUP98 融合タンパク質によって FASN の活性が負に制御され、脂肪酸合成が阻害されていることが示された。一方で、脂肪酸はミトコンドリアでの β 酸化の過程で、アシル CoA、アシルカルニチンに変換されるが、この白血病細胞においてアシル CoA、アシルカルニチン量は逆に高いことが明らかとなった。この結果から NUP98 融合遺伝子を有する白血病細胞においては、 β 酸化が異常となっている可能性が示唆された。

がん幹細胞の代謝状態に関する探索的研究に加えて、既に臨床的な重要性が提唱されている変異型 IDH 酵素による 2HG 産生について下のような各種の基盤的研究を行った。

IDH の変異頻度解析の基盤的な研究として、昨年度までの研究で、パイロシーケンス法を用いて、臨床検体から高精度かつ効率的に全ての IDH1 および IDH2 の変異を検出するアッセイ法を開発しているが、このアッセイを用いてグリオーマにおいては、累積で 909 例に対して IDH1/2 変異の解析を行い、322 例で IDH 変異(35.4%)を認めた。従って、グリオーマにおいては、極めて高い頻度で IDH 変異が認められる事が明らかとなった。

2HG の測定については、前年度に臨床検体を用いたマスマスペクトロメトリーによる定量法を確立したが、確立した 2HG 定量法により、脳腫瘍組織 4 例 (野生型 2 例、IDH 変異型 2 例) の腫瘍内 2HG 濃度を測定した。両群間を比較すると、IDH 変異群 (mut) における 2HG 濃度が有意に高かった。次に、脳腫瘍患者検体 17 例 (野生型 9 例、IDH 変異 8 例) の血漿中 2HG 濃度測定を行った。野生型 (WT) では 31.9 (± 8.8) ng/mL、IDH 変異群 (mut) では 36.2 (± 8.4) ng/mL の 2HG が検出された。一方、野生型群と IDH 変異群の血漿中 2HG 濃度を比較したところ、両群間に有意な差は認められなかった。従って、脳腫瘍バイオマーカーとしての有用性を評価するにはさらなる検討が必要と考えられる。有意差が見られなかった一つの原因として、野生型群の一部がやや高い 2HG 濃度を示したことが挙げられる。そこで今後は、症例数を増やして脳腫瘍患者の血中だけでなく同一患者の脳腫瘍中の 2HG 濃度測定を行い、IDH 変異の有無と 2HG 濃度の相関だけでなく、腫瘍組織内 2HG 濃度と血中 2HG の相関までを評価する必要があると考えられた。

2HG には、L-2HG 及び D-2HG の光学異性体が存在するが、変異型 IDH は D-2HG を選択的に産生すると考えられ、両者を別々に測定する事は重要である。キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) では測定が困難な D,L-2HG の分離条件を、Astec CHIROBOTIC R Chiral 光学分割カラムを用いた液体クロマトグラフィ-質量分析計 (LC-MS) を用いて検討した。その結果、D 体と L 体の完全分離に成功した。この方法を大腸がんの培養細胞に応用したところ、D 体と L 体の 2HG を感度良く検出した。

倫理面への配慮

ヒト遺伝子及びヒト腫瘍サンプルを用いた実験、解析を実施する際には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、国立がん研究センターの遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画の審査を受け、委員会の承認が得られた上で研究を実施する。手術材料より得た細胞を使用するにあたっては患者に不利益の生じないように、連結可能匿名化し、またインフォームドコンセントを得るなどの配慮をし、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得ている。細胞への遺伝子導入にあたっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づき申請し、国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の審査を経て、理事長の承認を受ける。本研究に必要な動物実験については「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」に従い動物実験倫理委員会に申請を行う。遺伝子組み換え実験に関しては、「遺伝子組み換え実験に関する指針」に従い、カルタヘナ法の遵守を徹底する。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

第3年次

(雑誌論文)

英文論文 (謝辞なし)

1. Ogawara Y, Katsumoto T, Aikawa Y, Shima Y, Kagiya Y, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K, Kitabayashi I. IDH2 and NPM1 Mutations Cooperate to Activate Hoxa9/Meis1 and Hypoxia Pathways in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res.*, **75**, 2005-16 (2015)
2. Uetaki, M., Tabata, S., Nakasuka, F., Soga, T., Tomita, M., “Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress” *Sci. Rep.* **5**, 13896, 2015.
3. Ogawara, Y., Katsumoto, T., Aikawa, Y., Shima, Y., Kagiya, Y., Soga, T., Matsunaga, H., Seki, T., Araki, K., *Kitabayashi, I., “IDH2 and NPM1 mutations cooperate to activate Hoxa9/Meis1 and hypoxia pathways in acute myeloid leukemia” *Cancer Res.* **75**, 2005-2016, 2015.
4. Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamel W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H: IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic

state of dormancy that protects cells against chemotherapeutic stress. *Cancer Res* 74: 6531-6541, 2014
(doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914)

英文総説 (謝辞なし)

1. Ichimura K, Narita Y, Hawkins CE. "Diffusely infiltrating astrocytomas: pathology, molecular mechanisms and markers." *Acta Neuropathol* 129:789-808, 2015
2. Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K. "IDH1/2 mutation detection in gliomas." *Brain Tumor Pathol* 32:79-89, 2014

日本語総説 (謝辞なし)

1. 相川博明、北野滋久、山下万貴子、濱田哲暢：がん代謝研究の現状とがん代謝を標的とした治療戦略への応用 「腫瘍内科」Vol.15 (6)：608-613, 2015
2. 曾我朋義：CE-MS メタボロミクスとがん研究「電気泳動」特集 電気泳動のフロンティア 2015 Vol.59, No.2, pp67-69, 日本電気泳動学会、2015

(学会発表)

1. 相川博明、大野誠、林光博、大内真由、市村幸一、成田善孝、濱田哲暢「LC-MS/MS analysis of plasma 2HG as a diagnostic marker for relapsed glioma with IDH mutation」第74回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、平成27年10月8-10日
2. Saya H: Heterogeneity and plasticity of cancer metabolism. Symposium 3 "Cancer Metabolism: From basic to bedside", 74rd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, 10/08/2015, Nagoya Congress Center, Nagoya
3. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とする新たながん治療開発の展望。教育講演2。第53回日本癌治療学会学術集会。10/29/2015、国立京都国際会館、京都
4. 佐谷秀行：がん幹細胞の代謝特性を標的とした治療戦略の考案。特別講演。第6回癌・炎症と抗酸化研究会。11/14/2015。ホルトホール大分。大分