

博士論文 (要約)

小児固形腫瘍に対する多層性解析による
新規標的治療の創出

渡邊健太郎

論文の内容の要旨

論文題目 小児固形腫瘍に対する多層性解析による新規標的治療の創出

氏名 渡邊 健太郎

1. 背景

小児白血病の予後が改善傾向であるのに対して、小児の代表的な悪性固形腫瘍である神経芽腫と骨肉腫の治療成績は未だ十分でない。また、濃厚な集学的治療を要することから、短期的・長期的な合併症の問題も生じている。このため、新規治療、特に腫瘍細胞の性質の理解に基づく標的治療への期待が大きい。

本研究では、神経芽腫と骨肉腫に対するデータ解析を行い、それを元に抽出した候補遺伝子に対する細胞実験による機能解析を行った。

2. 神経芽腫の多層性解析と、がん代謝を標的とする治療の探求

米国 TARGET プロジェクトのコホートと、自施設コホートに対して、既知の予後不良因子である 11q (loss of heterozygosity) LOH を持つ神経芽腫症例を対象に、臨床検体をもとにした DNA メチル化アレイのデータと RNA シークエンスによる発現データの解析を行った。これにより、11q LOH を持つ神経芽腫症例は、DNA メチル化プロファイルの異なる 2 つの群に分割でき、その 2 群は予後に有意な差が見られることが示された。予後不良群で発現が増強しており、かつその発現が強いことが単独で予後不良因子となっている遺伝子を抽出することにより、2 つの遺伝子を候補遺伝子として抽出した。さらに、他の独立したコホートでも予後を規定していることを確認することにより、*PHGDH* 遺伝子を機能解析の対象となる候補遺伝子として選択した。

PHGDH は細胞内セリン生合成経路の初期段階に必要な酵素をコードする遺伝子であり、他の癌腫において *PHGDH* の発現増強によるセリン生合成の増強は、がん細胞に特徴的な代謝（いわゆるがん代謝）のパターンの 1 つとして報告されている。具体的には、セリン生合成の増強により、S-adenosylmethionine による DNA・RNA のメチル化修飾や、還元型グルタチオンの産生による酸化ストレスに対する対応など、がん細胞の増殖に有利な代謝動態が生じることが報告されている。神経芽腫においても、*PHGDH* の発現亢進が悪性度を高めている可能性、また逆に治療標的となりうる可能性を考え、細胞実験による検証に進んだ。

神経芽腫細胞株に対して siRNA によるノックダウンや、*PHGDH* 阻害剤の投与を行うこ

とにより、細胞増殖の抑制が観察された。アルギニン代謝とセリン代謝が関連しており、アルギニンの欠乏がセリン代謝への依存を高めるとの報告が見られることから、さらにアルギニンを枯渇させる治療の PHGDH 阻害に与える影響を検証した。アルギニンの枯渇剤により、細胞内アルギニン産生能の乏しい細胞の増殖は抑制された。さらに、PHGDH 阻害剤との併用効果が見られた。この 2 つの治療に対する細胞内代謝物の変化を観察するために、投薬後の細胞を用いた、細胞内代謝物の網羅的解析(メタボローム解析)を行った。PHGDH 遺伝子の発現が強い細胞において PHGDH 阻害剤が与えた代謝物プロファイルへの影響は、PHGDH 遺伝子の発現が比較的弱く細胞内アルギニン産生の乏しい細胞株においては、2 つの治療を併用することによってのみ生じた。この結果から、アルギニン産生の乏しい細胞においては、アルギニン枯渇により PHGDH 阻害の効果を顕在化させることができることが示された。また同様に投薬後の細胞から抽出した RNA を用いて、RNA シークエンスによる発現解析を行い、投薬による遺伝子発現状況の変化につき解析した。これらを複合的に解析することで、PHGDH 阻害剤によりセリン生合成系の下流の産物が減少し、代償的に *SLC7A11* (xCT) による細胞内へのシスチン取り込みが亢進すると推定された。PHGDH 阻害剤と xCT の阻害剤は併用効果がみられ、これらが新たな複合治療の候補となりうると考えられた。

3. 骨肉腫の発現解析と、糖鎖修飾を標的とする治療の探求

Gene expression omnibus にデポジットされている発現アレイデータを用いて、骨肉腫サンプルの遺伝子発現プロファイルの解析を行った。53 例の治療前検体に対する発現アレイデータに対して、unsupervised consensus clustering の手法でクラスタリングを行ったところ、2 つの安定したクラスターに分割することができた。2 群は無イベント生存率・全生存率に有意な差がみられた。また、予後不良クラスターにおいては初診時限局例に絞っても、より早く、転移再発や死亡がみられることが観察された。また、同じコホートの一部を含む拡大コホートに対する発現アレイデータを用いて、同様にクラスタリングを行ったところ、同じように 2 つのクラスターに群分けすることができた。さらに、独立した別のコホートの発現アレイデータも、同様に予後の異なる 2 つのクラスターに群分けすることができた。これらの結果から、骨肉腫は、発現プロファイルをもとに生物学的・臨床的に異なる 2 群にわけることができることが示唆された。

次に上記の 2 群を比較することにより、特に予後の悪い例で特徴的に発現する遺伝子を抽出することを試みた。2 つの独立したコホートにおいて、予後不良クラスターで強く発現がみられ、かつその発現が強いことが予後不良因子であるような遺伝子を絞り込むことにより、7 つの遺伝子を候補として抽出した。骨肉腫細胞株を用いて、これら 7 つの遺伝子

のノックダウン実験を行った。*C1GALT1* 遺伝子のノックダウンにより骨肉腫細胞株の増殖が最も明瞭に抑制されたことから、*C1GALT1* 遺伝子の発現が骨肉腫の増殖に必要であることが示唆された。

C1GALT1 遺伝子は、タンパクの翻訳後修飾の 1 種である O-glycosylation に必要な酵素をコードする。他の癌腫において細胞内リン酸化シグナルタンパクの働きに関与すると報告されることから、骨肉腫における *C1GALT1* のリン酸化タンパクに与える影響をタンパクアレイにより網羅的に観察した。*C1GALT1* のノックダウンにより、リン酸化 ERK の減少と総 PDGFR β の減少がみられた。この結果から、*C1GALT1* は PDGFR β を介した ERK リン酸化経路の増強を通して、細胞増殖の亢進をもたらしている可能性が考えられた。

さらに既報で他の癌腫で itraconazole が *C1GALT1* タンパクの阻害を行うと報告されることから、骨肉腫細胞に対する itraconazole の効果を、細胞株を用いて検証したところ、Itraconazole の投与により、骨肉腫細胞内の *C1GALT1* タンパクの減少がみられ、細胞増殖の抑制もみられた。

C1GALT1 の細胞内での遺伝子発現に対する役割を観察するために、*C1GALT1* のノックダウンと itraconazole の投与のそれぞれが骨肉腫細胞株に与える影響を、介入後の細胞から抽出した RNA に対する RNA シークエンスを行うことで網羅的に観察した。いずれの介入でも細胞周期に関連する遺伝子の発現が減弱する一方で、*MMP3* をはじめとしたいくつかの遺伝子は、いずれの介入においても増強がみられた。*C1GALT1* の阻害に対する代償性変化をさらに阻害することによる合成致死を期待して *MMP3* の阻害剤と itraconazole を併用したところ、併用効果がみられたことから、これらの複合が骨肉腫に対する新しい治療の候補薬となりうると考えられた。