

「がん悪液質を改善する新規治療法の探索」

理化学研究所生命機能科学研究センター

岡田 守弘

1 研究の背景と目的

がん悪液質は進行がん患者の 80%以上に認められ、がんによる死亡の 30%を占めると考えられている (AK. Biswas and S. Acharyya, *Nat Rev Cancer*, 2020)。しかし、現在、がん悪液質を完全に回復させる有効な医療介入はない。がん悪液質研究が立ち遅れている主要な原因は、がん悪液質は全身性の代謝障害のため「個体を使った解析」が必須であるにもかかわらず、その解析が困難な点にある。現状を打破するために、申請者はショウジョウバエを用いてがん悪液質研究に取り組んできた (H. Nishida, M. Okada, *et al.*, *eLife*, 2021)。大規模なスクリーニングを遂行し、がん細胞から分泌されてがん悪液質を誘導する因子の同定を試みて、最終的に「ネトリン」タンパク質ががん悪液質誘導因子であることを発見した。分泌されたネトリンは、がん細胞から離れた組織に作用してカルニチン代謝異常を引き起こし個体を不調にした (M. Okada *et al.*, *EMBO J.*, 2023)。しかし、依然として「どのようにしてがん細胞は分泌因子を産生し、全身の代謝異常を引き起こして、がん悪液質を誘導するのか」詳細な分子基盤とその普遍性は明らかではない。そこで、我々が発見したがん悪液質の原因となるネトリンを中心とした分泌因子切り口として、がん-宿主連関解析によってがん悪液質本態の解明とその普遍性を明らかにすることを目指す (図 1)。

さらに、がん悪液質は複数の誘導因子が複雑に絡み合い、個体に悪影響を与えている代謝異常である。そのため、単一の代謝異常に焦点を当てた治療法はがん悪液質の改善には効果が乏しいことが想定され、異なる代謝経路に同時にアプローチする総合的ながん悪液質に対する治療法の開発が求められている。そこで、網羅的な遺伝子発現解析と RNAi スクリーニングを駆使することで、新たながん悪液質誘導因子候補の同定を目指す (図 1)。

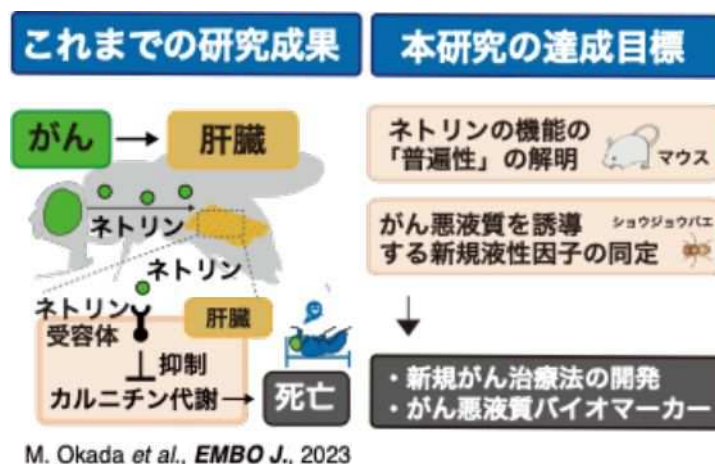


図 1. 本研究の概略図

2 研究方法・研究内容

1. ネトリンを欠損したマウスがん悪液質モデル作成のための準備

ネトリンを欠損したマウスがん悪液質モデルを作成することで、ネトリンの機能の普遍性の検証を目指した。マウスがん悪液質モデルは、がん細胞を移植することで作製する方法が広く用いられている。そこで、様々ながん移植実験において用いられている 3 種類のマウス細胞 (マウス乳がん細胞株 (4T1)、マウス結腸癌由来細胞株 (Colon-26)、ルイス肺がん由来細胞株 (3LL)) を JCRB 細胞バンクから購入し、解析に使用した。各細胞株から RNA を抽出し、ネトリンとその受容体の mRNA の発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。

2. ネトリンの臓器連関因子としての機能の普遍性の検証

ネトリンは神経軸索の誘引因子としての機能が広く知られている (T. Serafini et al., Cell 1996)。我々は、ネトリンが離れた臓器同士を連関させる液性シグナルとして機能し、全身の代謝をリモデリングする新規機能を発見した (M.

Okada et al., EMBO J., 2023)。しかし、ネトリンがホルモンのように臓器同士を連関される機能は他のモデル生物では全く知られていない。本研究では、ネトリンタンパク質の臓器連関因子としての普遍的な機能を明らかにするため、ネトリンタンパク質をマウス尾静脈に投与し、肝臓における代謝変動の解析を行った。実験には以下の3つの条件を設定した。(A)ネトリンタンパク質 $1\mu\text{g}$ を尾静脈投与した群、(B)PBS を尾静脈投与した群 (コントロール1)、(C)熱処理によって不活化したネトリン $1\mu\text{g}$ を尾静脈投与した群 (コントロール2)。各群において、マウス尾静脈投与後、12時間および24時間経過時点で肝臓サンプルを採取し、急速冷凍を行った。その後、採取した肝臓からRNAを抽出し、全30匹のサンプルについて網羅的なRNA-seq解析を実施した。



図2. ネトリンの臓器連関因子としての機能の普遍性の検証

3. がん悪液質を誘導する液性因子候補の同定

ショウジョウバエ担がんモデルを用いてがん悪液質を誘導する液性候補因子の探索を行った。具体的には、野生型の組織とがんを誘導した組織からRNAを抽出し、網羅的なRNA-seq解析を実施した。その後、がん組織のみで発現が上昇している遺伝子に着目して、組織特異的なRNAiスクリーニングを行った。その際、担がん個体の生存率を指標にして候補因子の絞り込みを行った。

3 研究成果

1. ショウジョウバエのネトリンに相当するネトリン-1は、ルイス肺がん由来細胞株 (3LL) とマウス乳がん細胞株 (4T1) で高発現していた。一方、マウス結腸癌由来細胞株 (Colon-26) ではネトリン-1の発現はほとんど認められなかった (図3)。また、ネトリン受容体の1つである Unc-5b は、マウス乳がん細胞株 (4T1) にお

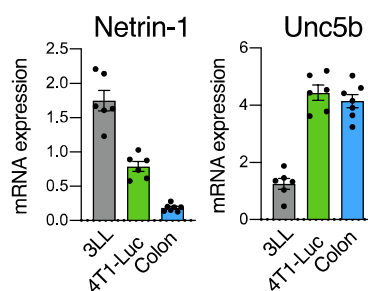


図3. 3種類のマウス細胞におけるネトリンとその受容体の発現量の比較

いて特に高い発現が認められた (図3)。そのため、温血動物であるマウスを用いてがん悪液質におけるネトリンの機能を検証する際には、マウス乳がん細胞株 (4T1) を移植してがん悪液質を誘導するのが適切であると考えられる。現在、マウス乳がん細胞株 (4T1) を用いたネトリン遺伝子破壊株の作製を進めている。今後、このネ

トリン欠損マウス乳がん細胞株 (4T1) および通常株を皮下移植することで担がんモデルを作製し、ネトリンの有無によるがん悪液質の進行度(体重、筋肉量、握力)と生存率を測定することでネトリンの機能の評価を予定している。

2. 3つの条件: (A)ネトリンタンパク質 $1\mu\text{g}$ を尾静脈投与した群、(B)PBS を尾静脈投与した群 (コントロール 1)、(C)熱処理によって不活化したネトリン $1\mu\text{g}$ を尾静脈投与した群 (コントロール 2)、を設定し、実験を行った。そして、各群において、マウス尾静脈投与後、12時間および24時間経過時点で肝臓サンプルを採取し、急速冷凍を行った。その後、採取した肝臓から RNA を抽出し、全 30 匹のサンプルについて網羅的な RNA-seq 解析を実施した。

ネトリンタンパク質を投与した群では、コントロール群と比較して発現量に有意な変動を示す遺伝子が複数同定された。ネトリンタンパク質 $1\mu\text{g}$ を尾静脈投与した群では、マウス尾静脈投与後、12 時間で 134 遺伝子が有意に上昇し、180 遺伝子が有意に減少した。また、24 時間では、158 遺伝子が有意に上昇し、165 遺伝子が有意に減少した。その中には機能未知の遺伝子が複数含まれていた。注目すべき所見として、ネトリンを投与することでコレステロール合成関連遺伝子が顕著に上昇していた。また肝臓の炎症に関与する遺伝子の上昇もネトリンタンパク質の投与によって認められた。これらの結果は、ネトリンが肝臓における遺伝子発現の調節に関与している可能性を示唆するものであり、ネトリンが臓器連関を介して代謝機能を調整する因子として普遍的に機能している可能性が考えられる。今後は同定された遺伝子の詳細な機能解析を通じて、ネトリンの作用メカニズムの解明を進める予定である。

3. ショウジョウバエ担がん個体を用いて、網羅的な遺伝子発現解析と RNAi スクリーニングを駆使して、新たながん悪液質誘導因子を探索した。そして、がん悪液質誘導因子候補として「ムチン」を同定した。がん細胞から分泌された

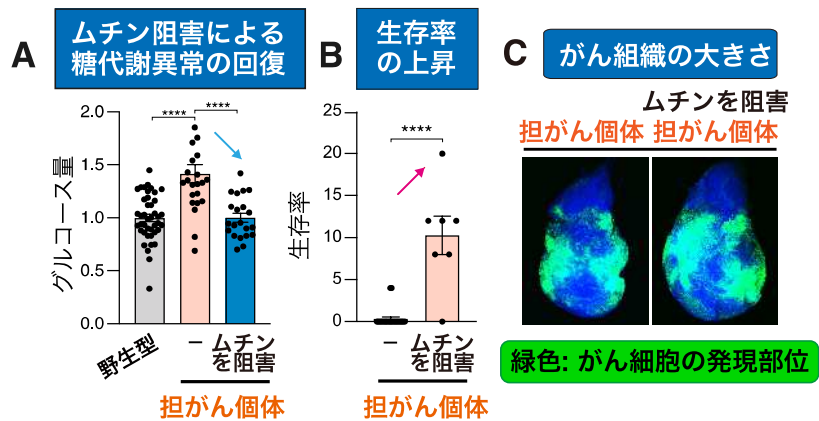


図 4. がん細胞のムチンを阻害すると糖代謝異常と担がん個体の生存率が回復する

ムチンは、その分子機構は依然と不明であるが、全身の糖代謝異常を誘導することを明らかにした(図 4A)。さらに、ムチンに起因する全身の糖代謝異常が原因で担がん個体は不調になり死亡することを見出した。一方、遺伝学を用いてがん細胞特異的にムチンを阻害すると、全身の糖代謝異常が正常レベルに回復し、それに伴い担がん個体の生存率も顕著に上昇した(図 4A、B)。その際、がん細胞でムチンを阻害しても、がん自体の増殖や大きさには影響を与えなかった(図 4C)。

これらの結果から、がん細胞で発現が上昇したムチンは体液中に分泌され、臓器関連因子として機能する可能性が示唆される。

4 生活や産業への貢献および波及効果

がん悪液質は、進行がん患者の 80%以上に認められ、がんによる死亡の 30%を占めると考えられている。現在、がん悪液質を完全に回復させる有効な医療介入はなく、臨床での使用が認可されたがん悪液質バイオマーカーさえ存在しない。日本ではがん悪液質に対する薬剤は 2021 年に認可されたが効果が非常に限定的であり、アメリカ食品医薬品局や欧州医薬品庁では認可されていない。そのため、2022 年に米国国立がん研究所らは、がん研究の最重要課題の 1 つとしてがん悪液質研究を選定し、社会的な問題となっている。がん悪液質改善の効果は担がん個体の死亡率の改善という指標で評価する必要があるが、倫理的規制や時間的制約から脊椎動物を用いたモデルでは研究が非常に難しい。

現状を打破するために、我々は、新たながん悪液質研究のモデル生物として認知され始めているショウジョウバエを用いて研究に取り組んできた。過去に、ショウジョウバエモデルを用いた研究成果がシーズとなり、甲状腺髄様がんの初めての治療薬（バンデタニブ）が承認された（AC. Dar et al., Nature, 2012）。この成功例が示すように、ショウジョウバエモデルを用いた発見が、未知の治療法の開発を切り拓く可能性がある。

我々は、「ネトリン」というがん悪液質誘導分泌因子を発見し、本研究においてその普遍性の一端を明らかにした。臨床検体を用いて得られている知見として、

1. がん患者（乳がん、腎臓がん、前立腺がん、髄芽腫など）の血液や尿ではネトリンタンパク質が上昇する（B. Li et al., Cancer Biomarkers, 2020）。
2. がん患者（胃がんや子宮がん）ではネトリンの高発現と致死率に相関がある（M. Uhlen et al., Science, 2017）（PA. Cassier et al., Nature, 2023）。

そのため、ネトリンを切り口にすることで、がん悪液質に起因する全身不調の全容が解明出来る可能性がある。

さらに、我々は、本研究において、「ムチン」というがん悪液質誘導候補因子を発見した。これまでに、臨床検体を用いて得られているムチンの知見として、がん患者におけるムチンの血液中の濃度と 5 年生存率は逆相関することが報告されている。さらに、がん患者において、血液中のムチン量の増加と高血糖の症状には相関があることが知られている。今後、ムチンの発現を制御する因子の同定とがん細胞から分泌されたムチンはどの組織に作用して全身に悪影響を与えているのか、その分子機構を明らかにできれば、新たながん悪液質バイオマーカーになる可能性がある。

がん悪液質が進行し不応性悪液質になると、がん患者は体が衰弱し、新しく開発された薬や効果的な放射線療法があっても治療が叶わず死亡するケースが多い。本研究成果は、こうした問題に新たな解決策を提供し、がん患者の治療選択肢を増やすことに貢献できると考える。