

肝臓 NAD 代謝を標的とした 新規がん悪液質治療薬の開発研究

愛知県がんセンター研究所

がん病態生理学分野 主任研究員 小島 康

慶應義塾大学

先端生命科学研究所 教授 曾我 朋義

名古屋大学

WPI-ITbM 特任講師 三城 恵美

1. 研究の背景・目的

多くの進行がん患者は、骨格筋萎縮を主徴とする「がん悪液質」に苦しむことが多い。しかし、その病態生理は不明な点が多く、根本的な治療方法は開発されていない。申請者らは、がん悪液質モデルマウスを解析したところ、骨格筋より、むしろ肝臓で激しい代謝変化が生じることを見出した(Ref. 1)。さらに悪液質肝臓では代謝産物である NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 濃度が半減すること、そして NAD 消費酵素である NNMT および CD38 の発現が上昇することを観察した。

NAD は、酸化還元反応の補酵素として、また Sirtuin や PARP など重要な生理機能に関わる酵素の基質として働く代謝物である。近年、NAD の細胞内濃度減少は、ヒトの骨格筋萎縮や神経変性と強く相関することを示唆する報告が相次いでいる(Ref. 2)。生体が必要とする NAD の 80% が肝臓で合成されている(Ref. 3)。CD38 は、NAD を分解する酵素である。CD38 ノックアウトマウスでは、生体の NAD 濃度が劇的に上昇することが報告されている(肝臓では 10 倍近く上昇; Ref. 4)。この表現型は、CD38 が、生体で NAD 濃度をコントロールしている主要酵素であることを強く示唆している。

CD38 は、NAD サルベージ回路から NAD を取り除き、生体の総 NAD 量を減少する方向に作用する。本研究では、CD38 阻害剤を悪液質モデルマウスに投与して検証して、悪液質における NAD 代謝に与える影響、および悪液質治療薬としての可能性を探ることを目的とした。2021 年 1 月、我が国において、非小細胞肺癌、胃がん、膵がん、大腸がん) におけるがん悪液質に対してグレリン様作用薬であるアナモレリンの使用が承認されたが、必ずしも悪液質の病因に立脚した治療法とは言えない。またアナモレリンが効果を示さない患者も多い。そのため、本研究において、CD38 阻害剤の悪液質治療効果が確認されれば、新機軸のがん悪液質開発に大きく資することが期待された。

2. 研究の対象ならびに方法

実験動物・培養細胞

BALB/c nu/nu (BALB/cAJcl nu/nu) マウスを日本クレア (東京) より購入した。愛知県がんセンターSPF 飼育施設で馴化させたのち実験に供した。マウスの飼育・管理およびそれらを用いた実験は全て愛知県がんセンター研究所動物実験規程に基づいて、愛知県がんセンター研究所動物実験委員会の承認を得てから行った。JCRB バイオバンクより入手したヒトメラノーマ細胞株 SEKI (JCRB1041; RRID: CVCL_3162) を使用した。SEKI 細胞は、10%FBS を含有する RPMI-1640 培地 (Sigma) にて培養した。

薬剤

CD38 阻害剤は、Compound 78c (CAS#1700637-55-3+ Merck) を使用した。Compound 78c は、溶媒 (ジメチルスルホキシド (DMSO, Sigma)、5% (v/v); ポリエチレングリコール 300 (PEG300、和光純薬)、40% (v/v); Tween 80 (東京化成工業)、5% (v/v); 精製水、50% (v/v)) に溶解して、用時調製した。

移植処置および薬理学実験

SEKI 細胞を 1.0×10^5 細胞数をヌードマウスの皮下に移植した。移植に際しては、三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.75 mg/kg+ミダゾラム 4mg/kg+酒石酸ブトル

ファノール 5mg/kg) を腹腔に投与して、十分な麻酔深度に到達したことを確認した後に腫瘍細胞移植操作を実施した。移植完了後は、ただちにアンチセダン (0.3~0.75 mg/kg) を腹腔から投与して覚醒状態になるまでモニタリングを実施した。低体温症には特に留意した。移植後 11 日目にランダムに割り振り、投与群と非投与群に分けた (それぞれ N = 5)。移植後 12 日目から 30mg/kg の Compound 78c を 1 日 1 回、連日、1 週間腹腔投与した。投与実験完了後、マウスは安楽死後、病理解剖およびサンプル採取に供した。

3. 研究結果

非担がんマウス (Nude; N = 5)、Compound 78c 非投与担がんマウス (SEKI without C78c ; N = 5)、Compound 78c 投与担がんマウス (SEKI with C78c ; N = 5) の 3 群を解析した。非担がんマウス (Nude) と Compound 78c 非投与担がんマウス (SEKI without C78c) の 2 群を比較すると、投与開始前の体重には有意差がなかったが、実験終了時には統計学的有意に低下していた (図 1; Welch t-test, P = 0.024)。くわえて実験期間中の摂食量も非投与担がんマウスで統計学的有意に低下しており、実験終了時には、がん悪液質を発症していることが強く示唆された (Welch t-test, P = 0.024)。一方、Compound 78c 投与群と非投与群では全身状態に大きな差異は認めなかった。体重に関しては Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意な差は認められなかった (Welch t-test, P = 0.25)。Compound 78c 投与期間中の総摂食量についても統計学的差異は認めなかった (Welch t-test, P = 0.38)。

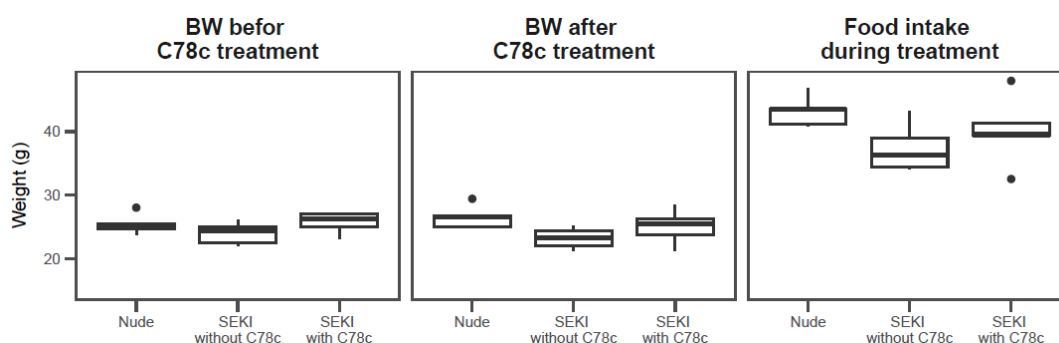


図1 体重および摂食量 コントロール非担がんマウス (Nude; N = 5)、Compound 78c 非投与群 (SEKI without C78c; N = 5)、Compound 78c 投与群 (SEKI with C78c; N = 5) の体重 (BW) および総摂食量 (Food intake)

骨格筋重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意な差は認められなかった(図 2 ; Welch t-test, $P = 0.057$)が、投与群で骨格筋重量が高い傾向を認めた。肝臓重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群では統計学的有意に投与群で肝臓重量の増加を認めた(Welch t-test, $P = 0.037$)。薬剤性肝障害などを疑って、肝臓と腫瘍組織に関して、病理学的検索を実施したが、あきらかな Compound 78c の肝細胞および腫瘍細胞に対する細胞傷害作用を示唆する形態病理学的所見を認めなかった。

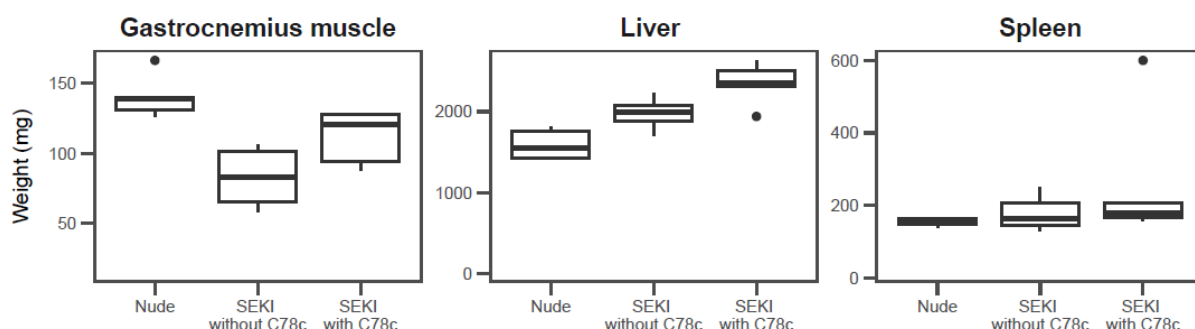


図 2 腓腹筋重量、肝臓重量、脾臓重量 コントロール非担がんマウス(Nude; $N = 5$)、Compound 78c 非投与群(SEKI without C78c; $N = 5$)、Compound 78c 投与群 (SEKI with C78c; $N = 5$) の腓腹筋重量、肝臓重量、脾臓重量。単位は mg。

4. 考察

がん悪液質モデルマウス(SEKI モデル)に対して CD38 阻害剤である Compound 78c を 1 週間投与した。がん悪液の重要な表現型である骨格筋萎縮に対しては統計学的な有意な効果を示さなかったが、Compound 78c 投与群では骨格筋量が多い傾向も認められた。本研究で解析したマウスは 1 群 5 匹で Compound 78c の骨格筋に対する効果を検出するには解析数が少ない可能性がある。がん悪液質モデルマウス(SEKI モデル)における Compound 78c の骨格筋萎縮に対する影響を確定するには、再実験をする必要があると判断した。

がん悪液質モデルマウス(SEKI モデル)は、非担がんコントロールと比較して、肝臓重量が重い表現型を示すことを我々は既に報告している(Ref. 1)。肝臓重量に関して、Compound 78c 投与群は、非投与群と比較して統計学的に有意な重差を認めた(図 2)。Compound 78c では、その肝臓重量への上乗せ効果が認められた。肝臓は薬物解毒の中核臓器であるので Compound 78c による薬剤性肝障害を

疑ったが、病理学的検討で検出できる肝障害像は認められなかった。具体的には肝細胞壊死像や免疫系細胞の集積所見などは確認しなかった。CD38 は免疫系細胞で主に発現している。免疫系細胞が多く集簇している脾臓重量に関しては、Compound 78c 投与群と非投与群に関しては有意差を認めなかった。Compound 78c への肝臓重量に対する影響は、再現性も含めて、より詳細な解析が必要であると考えた。

本研究により CD38 阻害剤である Compound 78c には、がん悪液質モデルマウスの骨格筋および肝臓重量を増加させる効果を有する可能性が示唆された。今後は、より規模の大きい実験を実施して生存期間に対する効果も含めて検討したい。

5. 文献

1. Kojima Y, Mishiro-Sato E, Fujishita T, Satoh K, Kajino-Sakamoto R, Oze I, Nozawa K, Narita Y, Ogata T, Matsuo K, Muro K, Taketo MM, Soga T, Aoki M. Decreased liver B vitamin-related enzymes as a metabolic hallmark of cancer cachexia. *Nat Commun.* 6;14(1):6246, 2023.
2. Covarrubias AJ, Perrone R, Grozio A, Verdin E. NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 22(2):119-141, 2021
3. Chiarugi A, Dölle C, Felici R, Ziegler M. The NAD metabolome--a key determinant of cancer cell biology. *Nat Rev Cancer.*, 12(11):741-52, 2012
4. Aksoy P, White TA, Thompson M, Chini EN. Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38. *Biochem Biophys Res Commun.*, 345(4), 1386-92, 2006

6. 論文発表

なし(原稿準備中)