

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21177

研究課題名(和文)膵がんに対するアディポネクチン受容体アゴニストの抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Analysis of antitumor effects of adiponectin receptor agonists on pancreatic cancer

研究代表者

秋元 美穂 (Akimoto, Miho)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：60437556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アディポネクチン受容体アゴニストAdipoRonが膵がん細胞の細胞死を誘導することを見出すとともに、その分子機序を明らかにした。AdipoRonは膵がん細胞のアディポネクチン受容体AdipoR1を介して下流のERK1/2を活性化し、ミトコンドリアにおけるカルシウムの蓄積とスーパーオキシドの産生量増加、ミトコンドリア機能の低下を引き起こしてネクロトーシスを誘発することが分かった。また、AdipoRonは膵がん担がんマウスへの経口投与により重篤な副作用もなく腫瘍増殖を抑制することや、膵がん患者由来のがん細胞に対しても殺細胞効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、AdipoRonがヒト膵がん細胞の細胞死を誘導する分子機序を明らかにするとともに、動物実験や膵がんの臨床検体を用いたアッセイでもAdipoRonが膵がんに対する抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。AdipoRonは抗糖尿病薬としての臨床応用が期待されているが、これまでがん治療への応用は試みられていない。本研究により得られた新たな知見は、アディポネクチン受容体アゴニストを膵がん治療に応用するための科学的な根拠となりうる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that adiponectin receptor agonist AdipoRon induces cell death in pancreatic cancer cells and clarified the molecular mechanism. In pancreatic cancer cells, AdipoRon activates ERK1/2 via adiponectin receptor AdipoR1, followed by accumulation of calcium and increased production of superoxide in mitochondria, to induce necroptosis by inducing mitochondrial dysfunction. In addition, AdipoRon suppressed tumor growth without serious side effects by oral administration to pancreatic cancer-bearing mice, and showed a cell killing effect on cancer cells derived from patients with pancreatic cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：AdipoRon 膵がん ネクロトーシス 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

日本における膵がんの罹患者数および死亡者数は年々増加傾向にある。膵がんは難治性がんの代表であり、予後が悪く、種々の抗がん剤による治療の奏効率も低い。そのため、従来の抗がん剤とは機序の異なる効果的な新規抗がん剤の開発が求められてきた。我々は、ヒト膵がん細胞株を用いた検討において、アディポネクチン受容体 (AdipoR) のアゴニストである AdipoRon が増殖抑制とその後の細胞死を誘導すること、動物実験でも抗腫瘍効果を示す傾向があることを予備的に見出した。

AdipoRon は経口投与可能な 2 型糖尿病の治療薬として注目され、その作用機序や生理活性が解析されてきた。AdipoRon は AdipoR1 および R2 に結合し、AMP キナーゼ (AMPK) や PPAR の活性化を介して肝細胞や筋細胞で脂質代謝や糖代謝を促進する他、血管内皮細胞に作用して血管炎症を抑制するなど、アディポネクチン様の多様な作用を示すことが報告されていた¹。しかし、アディポネクチン受容体アゴニストの膵がん細胞に及ぼす影響や抗腫瘍効果については十分な検討はされていなかった。また、我々の予備的な解析結果から、AdipoRon 処理によりミトコンドリア由来のスーパーオキシド (mtROS) の増加が認められ、これが AdipoRon 誘導性の膵がん細胞の細胞死に關与することが予想されたが、分子機序の詳細については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、膵がん細胞における AdipoRon 誘導性の細胞死の分子機序を明らかにするとともに、膵がん担がんマウスおよび膵がんの臨床材料を用いて AdipoRon の抗腫瘍効果を明らかにし、アディポネクチン受容体アゴニストを膵がん治療に応用するための科学的な根拠を示すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵がん MIAPaCa-2 細胞と Panc-1 細胞を AdipoRon で処理し、Annexin V-FITC/ PI 染色、Caspase-3 および -9 の活性測定、アポトーシス関連タンパク質の検出などを行い、アポトーシスがあるいは他の細胞死かを判定した。アポトーシス以外の細胞死であることが疑われたので、ネクロトーシスやオートファジー、フェロトーシスなど様々な細胞死について各々の阻害剤 (Nec-1、Chloroquine、Ferrostatin-1) を用いて検討し、AdipoRon による膵がん細胞の細胞死の様式を特定した。

(2) AdipoRon 誘導性の細胞死誘導に關与する受容体を特定するため、AdipoR1 または AdipoR2 の発現を siRNA で抑制し、AdipoRon 感受性への影響を検討した。また、AdipoRon 処理により膵がん細胞で活性化されるシグナル伝達経路をシグナルタンパクの阻害剤やアゴニストなどを用いて特定した。

(3) 予備的な解析では、AdipoRon 処理により mtROS の増加が認められた。一般的に、mtROS 産生の上昇はミトコンドリア機能の低下の原因あるいは結果であると考えられる。そこで、AdipoRon 処理をした MIAPaCa-2 細胞におけるミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 I の酵素活性、ATP 産生量、ミトコンドリア膜電位を測定し、AdipoRon がミトコンドリア機能に及ぼす影響について調べた。

(4) AdipoRon は細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させることが報告されている^{1,2}。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は細胞死の引き金となりうるので、AdipoRon 処理をした M1aPaCa 細胞における細胞質カルシウムイオン濃度およびミトコンドリアカルシウムイオン濃度を Ca^{2+} 蛍光プローブを用いて測定するとともに、これらを抑制した場合に AdipoRon 誘導性の細胞死が抑制されるか否かを検討した。

(5) M1aPaCa-2 細胞を皮下移植して担がん状態にした Balb/c ノードマウスに AdipoRon (60 mg/kg) を経口投与し、腫瘍増殖に対する AdipoRon の影響を評価した。AdipoRon は細胞移植後 15 日目から 50 日目まで AdipoRon を隔日で投与し、経時的に腫瘍体積を測定して、AdipoRon 投与群と非投与群の間で比較した。腫瘍の凍結切片を細胞増殖マーカー Ki67 の抗体で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で Ki67⁺ の増殖細胞を観察した。また、腫瘍血管新生に対する影響を見るため、腫瘍の凍結切片を抗 CD31 抗体で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡の画像から腫瘍血管密度を算出した。

(6) 島根大学医学部附属病院の消化器外科より提供された 4 検体の膵がんの新鮮手術材料から腫瘍組織を細切し、リベラーゼ処理による分散とフィルターの通過を経て細胞浮遊液を得た。腫瘍細胞に対する AdipoRon の殺細胞効果を評価するため、細胞浮遊液に AdipoRon を添加し、48 時間後に細胞死のマーカー (PI) および上皮性マーカー (EpCAM 抗体) による蛍光染色を行って共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、細胞死が誘導されたがん細胞の割合 (PI⁺EpCAM⁺ / EpCAM⁺) を算出してヒト膵がんに対する AdipoRon の殺細胞効果を評価した。

4. 研究成果

AdipoRon が主にネクローシスを通じて M1aPaCa-2 細胞死を誘発することを発見した。また、AdipoRon とアディポネクチンの双方が AdipoR1 依存的に p38MAPK のリン酸化に加え細胞の生存維持に関わる AMPK の活性化が誘導される一方、AdipoRon のみが AdipoR1 依存的に ERK1/2 の活性化とそれに続くミトコンドリアへの Ca^{2+} の蓄積と mtROS の産生量上昇に伴う急速なミトコンドリア機能不全を誘発し、細胞死を誘導することが分かった。さらに、膵がん担がんマウスにおける AdipoRon の経口投与は重篤な副作用なしに腫瘍の増殖を抑制すること、AdipoRon は膵がん患者から分離されたがん細胞に対して殺細胞効果を示すことを明らかにした。本研究により、アディポネクチン受容体アゴニストである AdipoRon を膵がん治療に応用するための科学的な根拠を提示することができた³。

(1) ヒト膵がん細胞に対する AdipoRon 誘導性の細胞死の分子機序について以下のことを明らかにした (図 1)。

FACS を用いた解析の結果、AdipoRon 処理をしたヒト膵がん細胞株 (M1aPaCa-2 および Panc-1) ではアポトーシスを示す Annexin V⁺PI⁺ の細胞集団の増加を認めたが、Caspase-3 および -9 の活性やアポトーシス関連タンパク質の変動は確認され



図 1 AdipoRon 誘導性の細胞死の分子機序の概要

ず、非アポトーシス性の細胞死が誘導されることが示唆された。さらに AdipoRon 誘導性の細胞死はネクローシス阻害剤 (Nec-1) およびオートファジー阻害剤 (Chloroquine) により抑制されたことから非典型的な細胞死であるネクローシスが誘導されることが分かった。

MIAPaCa-2 細胞では AdipoRon 処理に伴い AdipoR1 下流の AMPK のリン酸化と共に MAPK、ERK シグナルの活性化が認められた。また、AdipoRon 誘導性の細胞死は MEK/ERK 阻害剤や siRNA による AdipoR1 の発現抑制により著しく阻害されたが、AdipoR2 の発現抑制では大きな影響を受けなかった。したがって、AdipoRon は AdipoR1 を介して ERK シグナル依存的に MIAPaCa-2 細胞の細胞死を誘導することが示された。

AdipoRon 処理をした MIAPaCa-2 細胞ではミトコンドリア由来のスーパーオキシド (mtROS) の増加に先立ち、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇することを見出した。Ca²⁺蛍光プローブを用いた共焦点レーザー顕微鏡下での観察では、特にミトコンドリアへの Ca²⁺の蓄積が顕著であった。また、Ru360 により細胞質からミトコンドリアへの Ca²⁺の取り込みを阻害すると mtROS レベルの上昇および AdipoRon 誘導性の細胞死が阻害されたことから、AdipoRon はミトコンドリアへの Ca²⁺の蓄積を介して mtROS レベルを上昇させ、細胞死を誘導することが示唆された。また、mtROS の上昇に伴いミトコンドリア機能が低下し、脂質酸化の亢進、呼吸鎖酵素複合体 I (complex I) の活性低下、 β -酸化の抑制、ATP 産生の低下、膜電位の低下が認められ、これらが細胞死を誘導することが分かった。

アディポネクチンもまた AdipoR1 を介して各種シグナルを活性化することから、AdipoRon と同様に膵がん細胞の細胞死を誘導することが予想された。しかしながら、MIAPaCa-2 細胞に APN を作用させても細胞増殖がわずかに抑制されただけで細胞死は誘導されず、細胞死の誘導に繋がるミトコンドリアへの Ca²⁺の蓄積や mtROS の増加も認められなかった。MIAPaCa-2 細胞を APN で処理すると、p38MAPK のリン酸化に加え細胞の生存維持に関わる AMPK の活性化 (リン酸化) が AdipoR1 依存的に誘導される一方、細胞死誘導に関わる ERK1/2 のリン酸化が抑制されることが分かった。したがって、AdipoRon 及び APN はいずれも AdipoR1 を介して膵がん細胞に作用するが、AdipoR1 下流のシグナル伝達は異なり、AdipoRon はヒト膵がん細胞に対し効果的に細胞死を誘導することを示した。

(2) 膵がん担がんマウスにおいて AdipoRon の経口投与が抗腫瘍効果を示すことを明らかにした (図 2)。

ヒト膵がん細胞株 MIAPaCa-2 を皮下移植して担がん状態にした Balb/c ノードマウスを AdipoRon 投与群と非投与群に分け、移植後 50 日目まで AdipoRon (60 mg/kg) または同量の水を隔日で経口投与した。経時的に腫瘍体積を測定した結果、AdipoRon 投与群では非投与群と比較して腫瘍増殖が有意に抑制された。この際、体重減少などは見られず、顕著な副作用は確認されなかった。腫瘍の凍結切片を Ki67 抗体で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察したところ、AdipoRon 投与群の腫瘍中では腫瘍細胞の増殖が抑制されていることが確認された。

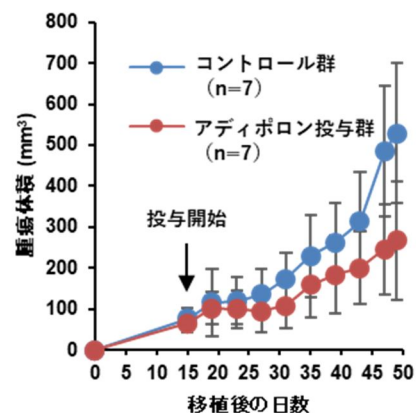


図 2 AdipoRon による腫瘍増殖抑制

腫瘍の凍結切片を抗 CD31 抗体により免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察して腫瘍血管密度を評価した結果、AdipoRon 投与により膵がん腫瘍組織中の腫瘍血管形成が抑制されることを明らかにした。

(3) 膵がんの臨床検体を用いた検討により AdipoRon ががん細胞に対して殺細胞効果を示すことを明らかにした(図3)。

島根大学医学部附属病院の消化器外科より提供された4検体(#5, #6, #8, #9)の膵がんの新鮮手術材料から腫瘍組織を細切し、リペラーゼ処理による分散とフィルターの通過を経て細胞浮遊液を得た。腫瘍細胞に対する AdipoRon の殺細胞効果を評価するため、細胞浮遊液に AdipoRon を添加し48時間後に細胞死のマーカー(PI)および上皮性マーカー(EpCAM 抗体)による蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果、全ての検体において、細胞死が誘導されたがん細胞の割合(PI+EpCAM⁺/EpCAM⁺)が AdipoRon 処理により有意に増加することが確認された。

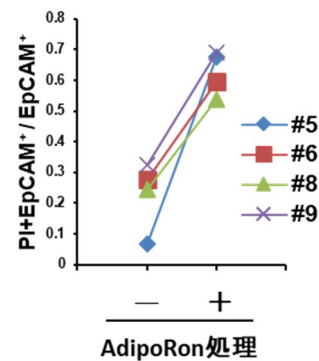


図3 AdipoRon による膵がん細胞の殺細胞効果

<引用文献>

1. Okada-Iwabu, M. *et al.* A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* **503**, 493-9 (2013).
2. Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Ueki, K., Yamauchi, T. & Kadowaki, T. Perspective of small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Diabetes Metab. J.* **39**, 363-372 (2015).
3. Akimoto, M., Maruyama, R., Kawabata, Y., Tajima, Y. & Takenaga, K. Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis. *Cell Death Dis.* **9**, (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Nagase H	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer cell-derived interleukin-33 decoy receptor sST2 enhances orthotopic tumor growth in a murine pancreatic cancer model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0232230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1371/journal.pone.0232230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akimoto M, Maruyama R, Kawabata Y, Tajima Y, Takenaga K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-0851-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Harashima N, Takenaga K, Akimoto M, Harada M.	4. 巻 8
2. 論文標題 HIF-2 dictates the susceptibility of pancreatic cancer cells to TRAIL by regulating survivin expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 42887-42900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.17157.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koshikawa N, Akimoto M, Hayashi J-I, Nagase H, Takenaga K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial ND genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-15592-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akimoto M, Takenaga K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Role of the IL-33/ST2L axis in colorectal cancer progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cellular Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cellimm.2017.12.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akimoto M, Hayashi JI, Nakae S, Saito H, Takenaga K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Interleukin-33 enhances programmed oncosis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Death & Diseases	6. 最初と最後の頁 e2057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cddis.2015.418.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akimoto M, Maruyama R, Takamaru H, Ochiya T, Takenaga K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Soluble IL-33 receptor sST2 inhibits colorectal cancer malignant growth by modifying the tumour microenvironment.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 13589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncomms13589.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 大腸癌細胞におけるIL-33低酸素誘導性核集積による腫瘍抑制性sST2の発現抑制
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三、岡崎具樹
2. 発表標題 大腸がん細胞における低酸素誘導性sST2発現低下のメカニズムの解明
3. 学会等名 第17回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimoto M, Takenaga K
2. 発表標題 Hypoxia downregulates tumor-suppressive sST2 in CRC cells in an IL-33/HIF-dependent manner
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takenaga K, Akimoto M
2. 発表標題 sST2, a decoy receptor, enhances orthotopic tumor growth of murine pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋元 美穂, 岡崎 具樹, 竹永 啓三
2. 発表標題 大腸がん細胞における腫瘍抑制性sST2発現のHIF/IL-33依存的抑制
3. 学会等名 第16回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 AdipoRonはミトコンドリアカルシウムユニポーターによるCa ²⁺ の取り込みを介して膵がん細胞の細胞死を誘導する
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 越川信子、秋元美穂、永瀬浩喜、竹永啓三
2. 発表標題 肺癌・大腸癌における病因性mtDNA ND遺伝子変異と転移との関連の再評価
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋元美穂、岡崎具樹、竹永啓三
2. 発表標題 可溶性ST2は炎症性のがん微小環境を修飾し膵がん細胞の皮下増殖を抑制する
3. 学会等名 第15回 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 越川信子、秋元美穂、林純一、永瀬浩喜、竹永啓三
2. 発表標題 ヒト癌におけるミトコンドリアND遺伝子変異の病因性予測と遠隔転移との関連性の検討
3. 学会等名 第15回 がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 IL-33はprogrammed oncosis耐性高転移性肺癌細胞をがん微小環境下において選別する
3. 学会等名 第25回日本がん転移学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 越川信子、秋元美穂、植田健、飯笹俊彦、鍋谷圭宏、井内俊彦、永瀬浩喜、竹永啓三
2. 発表標題 mtDNA変異が制御する転移の予測因子としての乳酸トランスポーターMCT4の核局在
3. 学会等名 第75回日本癌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋元美穂、竹永啓三
2. 発表標題 可溶性IL-33受容体sST2は大腸がん同所移植モデルにおいて腫瘍増殖および肝転移を抑制する
3. 学会等名 第75回日本癌学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 秋元美穂、丸山理留敬、竹永啓三
2. 発表標題 可溶性ST2は炎症性のがん微小環境の修飾を介して大腸がんの増殖および転移を抑制する
3. 学会等名 第14回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Koshikawa N, Akimoto M, Ueda T, Iizasa T, Nebeya Y, Iuchi T, Nagase H, Takenaga K.
2. 発表標題 Nuclear localization of lactate transporter MCT4 could be a predictor of metastasis regulated by mtDNA mutation.
3. 学会等名 第14回がんとハイポキシア研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----