

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15673

研究課題名(和文) がん代謝で制御される抗酸化代謝フラックスが抗がん剤耐性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of redox metabolic flux regulated by cancer metabolism on anticancer drug resistance

研究代表者

石野 孔祐 (Ishino, Kousuke)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：60584878

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)：がん細胞の多くは代謝を解糖系優位にリプログラミングし劣悪な環境にも対応できるために、抗がん剤の作用にも耐性を発揮する。グルコース類似体の2-デオキシグルコース(2DG)は解糖系を阻害しがん細胞の増殖を抑制するのに加え、抗がん剤など薬剤の作用を増強する。本研究では、膵がん細胞に対するシスプラチンまたはメトホルミンの作用を2DGが相乗的に増強することを見出した。また、2DGと同時にある種の代謝物を投与することで、2DGの細胞への作用が抑制されることを認めた。今後2DGの作用がより理解されることでがん治療がさらに進展することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がんが栄養の使い方を变化させてブドウ糖を多量に使うようになっている性質を利用して新しい薬の候補を調べた研究です。がん細胞がブドウ糖を使うのを防ぐ2DGという化合物を、抗がん剤などの薬(シスプラチンやメトホルミン)と一緒にがん細胞に加えると、薬の効き目が高くなることがわかりました。この飲み合わせが効果的な理由を調べることで、いろいろながんに効く薬を作るヒントを調べられる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：Many cancer cells also exert resistance to the action of anti-cancer agents because they reprogram metabolism in a glycolytic-dominant manner and respond to adverse environments. The glucose analog 2-deoxyglucose (2DG) not only inhibits glycolysis and suppresses the growth of cancer cells, but also enhances the action of drugs such as anticancer agents. In the present study, we found that 2DG synergistically enhanced the action of cisplatin or metformin on pancreatic cancer cells. It was also found that the combination of 2DG and metabolite suppressed the action of 2DG on cells. It is expected that the cancer treatment will be further advanced by further understanding the action of 2DG.

研究分野：実験病理学

キーワード：2-デオキシグルコース 膵がん細胞株 メトホルミン がん代謝 併用投与 相乗効果 抗がん剤耐性 抗酸化代謝物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん代謝は、がん細胞がさまざまな環境に対応できるように代謝を解糖系優位にリプログラミングした結果であり、そのため劣悪な環境にも対応できるように、抗がん剤の作用にも耐性を発揮することが示唆されている。近年ではこれらのがん代謝はドライバー遺伝子を始めとする様々ながん関連遺伝子の制御によりリプログラミングを受けていることが明らかとなってきた。また、がん代謝ががんの速い増殖を支えるための生体高分子の産生に寄与するのみならず、増殖で生じる活性酸素種(ROS)を抑制するための対抗手段として機能している可能性が示されており、がんにおける代謝の変化はその複雑な代謝クロストークも相まって全容解明には未だ至っていない。

2. 研究の目的

グルコース類似体の 2-デオキシグルコース (2DG) は細胞に投与されると、細胞内に取り込まれ N 型糖鎖形成不全による小胞体ストレスを誘発し、細胞死を誘導する (Ishino K et al, 2018, BBRC)。さらにその際、細胞内グルタチオンなどの抗酸化代謝物の著明な減少を引き起こす。また先行研究で、2DG 投与細胞のプロテオーム解析において、がん関連遺伝子である解毒酵素 Nrf2 の下流タンパク質群が発現変化を示した。がん細胞では解糖系代謝物やグルタミンなどアミノ酸が抗酸化代謝物の産生に関わることが知られる。それらの代謝物は、ある時はがん細胞の速い増殖を下支えし、またある時は抗がん剤耐性を制御する。すなわち、解糖系やアミノ酸の代謝フラックスの変化が細胞内の抗酸化代謝物の産生を通してがん細胞の抗酸化能を制御し、抗がん剤耐性を制御している可能性があるものと推察される。本研究は、がん細胞における解糖系阻害を介した抗酸化代謝物の制御が細胞死を引き起こすという実験的証拠に基づき、がん代謝が抗がん剤感受性に及ぼす影響を理解することを目的とする。

3. 研究の方法

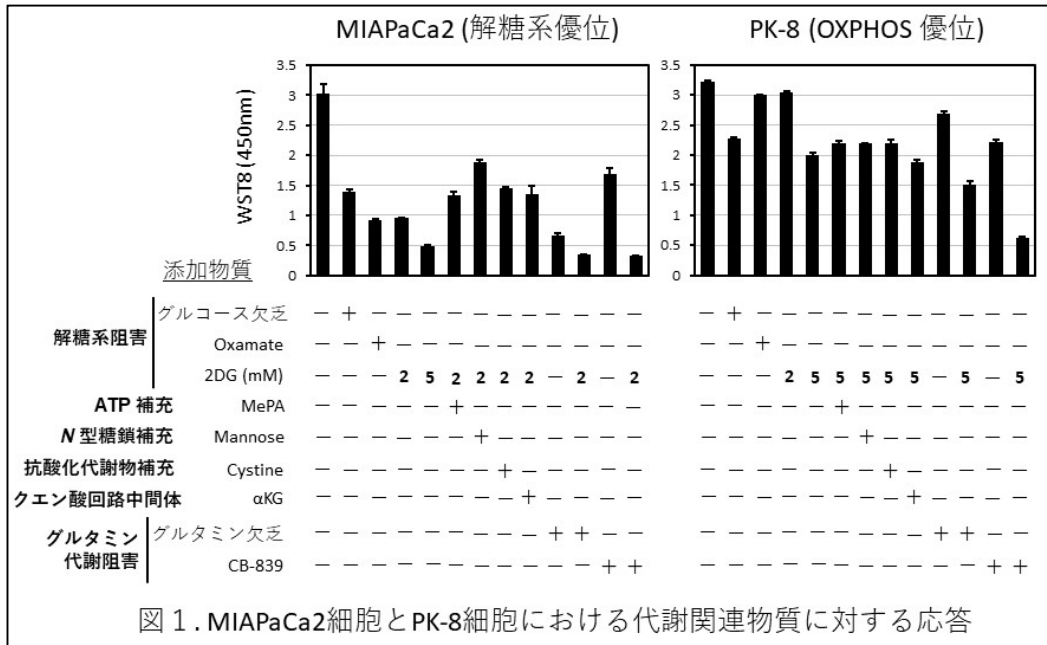
膵がん細胞株 MIAPaCa2 細胞と PK-8 細胞、肺がん細胞株 A549 細胞に対し、2-デオキシグルコース (2DG) と抗がん剤など薬剤を投与し、細胞死誘導における相乗作用を *N*-アセチルシステイン (NAC)、ATP 供給物質メチルピルビン酸 (MePA)、 α ケトグルタル酸 (α KG) あるいはマンノースが抑制するかどうかを調べた。薬剤にはメトホルミン (Met) とシスプラチン (CDDP) を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞死における 2DG と薬剤の相乗効果と低分子化合物による抑制効果の検討
MIAPaCa2 細胞に抗がん剤シスプラチンを 2-デオキシグルコース(2DG)と共投与することで、細胞死が相乗的に増加すること、その細胞死が *N*-アセチルシステイン(NAC)によりわずかにリカバーされることを認めた。これらのことから、2DG により誘発される活性酸素種 (ROS) がシスプラチンの抗がん作用を増加に一部関わっており、*N* 型糖鎖修飾は全く関わっていないことが示唆された。また、2DG+Met による MIAPaCa2 細胞の細胞死は、NAC あるいはマンノースのいずれの共投与によっても抑制された。このことより、MIAPaCa2 細胞において 2DG+Met の細胞毒性は ROS とタンパク質 *N* 型糖鎖修飾抑制の合わせたものであることが考えられた。2DG+CDDP の細胞毒性は ROS が一部関わっているが、*N* 型糖鎖修飾は全く関わっていない可能性が考えられた。また、A549 細胞における細胞生存の評価では、2DG+Met による細胞死は NAC では抑制されなかったが、マンノースによりわずかにレスキューされた。一方で、2DG+CDDP による細胞死は、NAC あるいはマンノースのいずれの投与でも抑制されなかった。また興味深いことに、A549 細胞において NAC による細胞毒性が認められた。
以上より、2DG と抗がん剤など薬剤の組合せによる細胞毒性は、MIAPaCa2 と A549 で異なることが示唆された。この理由として、2DG や NAC などの取込み量に依る可能性が考えられたが、現状で証明する手段が無いため、細胞内の抗酸化代謝物量や解糖系活性、ミトコンドリア呼吸を測定し間接的に毒性発現メカニズムの解析を行う必要がある。

(2) MIAPaCa2 と PK-8 における細胞外代謝物変化への応答性の検討

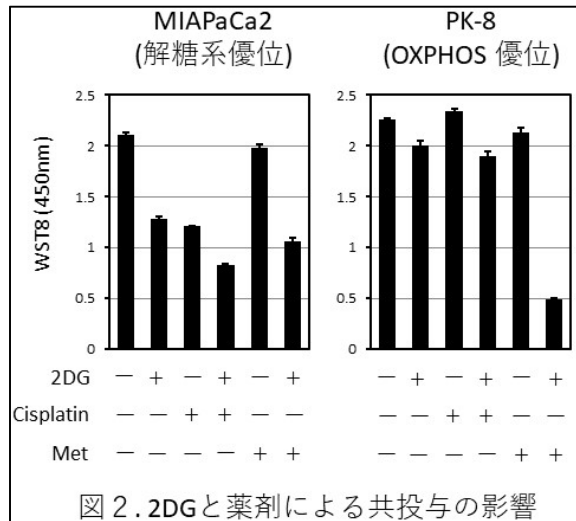
がん細胞は速い増殖を支えるために細胞外から様々な代謝前駆体を取り込めるようトランスポーターなど膜タンパクの発現が亢進している。2DG 投与で生じる細胞死に影響する細胞外の代謝物について探索するために、膵がん細胞株に 2DG を投与する際に、複数の代謝物を同時に投与あるいは培地中から除去した。ここで検討した代謝物については細胞内でシステインやグルタチオンなど抗酸化代謝物の産生に関わる化合物を中心に検討した (図 1)。



その結果、膵がん細胞株 MIAPaCa2 の培地に抗酸化代謝物シスチンを添加してみたところ、2DG による細胞死がわずかに抑制された。また、ATP 供給物質メチルピルビン酸 (MePA) や細胞内の主要な代謝物 α ケトグルタル酸 (α KG) が 2DG による細胞死をわずかながら阻害した。一方で膵がん細胞株 PK-8 ではこれらの化合物の投与は 2DG の細胞毒性を抑制しなかった。PK-8 はグルコース欠乏に対する感受性が低いため、細胞死の抑制効果も認められにくい可能性がある。さらに、グルタミン欠乏培地で培養すると MIAPaCa2 は比較的感受性が高いが、PK-8 はグルタミン欠乏に対しても抵抗性をもっていることがわかった。MIAPaCa2 と PK-8 では細胞内代謝指向性が異なり、MIAPaCa2 は解糖系優位であり PK-8 は酸化的リン酸化(OXPHOS)・脂質代謝優位であると知られる (Daemen et al, 2015, PNAS)。このことからグルコース欠乏やグルタミン欠乏への感受性の違いがみられたのは妥当とも考えられた。これらの結果から、2DG の細胞増殖抑制作用に細胞外の代謝物が影響することが示唆された。今後上記代謝物に由来してがん細胞内で抗酸化代謝物に変化しているか否かを調べる必要がある。

(3) 膵がん細胞株の 2DG と薬剤の併用における相乗効果の検討

膵がん細胞株の MIAPaCa2 と PK-8 に対し、2-デオキシグルコース (2DG) と薬剤を投与し、細胞死誘導における相乗効果を調べた。薬剤にはシスプラチンとメトホルミン (Met) を用いた。その結果、解糖系優位な MIAPaCa2 細胞で 2DG+シスプラチン及び 2DG+Met 投与で相乗的な細胞増殖抑制が認められた。また、OXPHOS 優位の PK-8 細胞で 2DG 単独および Met 単独の処理ではほぼ無効であるのに対し、2DG と Met の共投与で細胞増殖が強力に抑制された(図 2)。代謝タイプの異なる MIAPaCa2 と PK-8 の両細胞に対して、2DG と Met の共投与という条件が強い増殖抑制効果を示したのは大変興味深い。理由は明らかではないが、2DG は解糖系を阻害する一方で、Met はミトコンドリアの呼吸鎖を阻害することが報告されていることから、2DG と Met では細胞の標的部位が異なるために相乗的に強い増殖抑制効果が認められたものと推察された。今後、(2)で用いた代謝物を同時に投与あるいは除去して増殖抑制作用が影響を受けるか否か検討されたい。2DG+Met の強い増殖抑制作用の機序を検討することで、膵がん細胞株のみならず、異なる臓器のがん細胞にも幅広く有効な抗がん作用が明らかとなることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimoda Tomohiro, Wada Ryuichi, Kure Shoko, Ishino Kousuke, Kudo Mitsuhiro, Ohashi Ryuji, Fujita Itsuo, Uchida Eiji, Yoshida Hiroshi, Naito Zenya	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression of protein disulfide isomerase A3 and its clinicopathological association in gastric cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2265-2272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.6999	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 Kondo Ryota, Ishino Kousuke, Wada Ryuichi, Takata Hideyuki, Peng Wei-Xia, Kudo Mitsuhiro, Kure Shoko, Kaneya Yohei, Taniai Nobuhiko, Yoshida Hiroshi, Naito Zenya	4. 巻 54
2. 論文標題 Downregulation of protein disulfide-isomerase A3 expression inhibits cell proliferation and induces apoptosis through STAT3 signaling in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1409-1421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2019.4710	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 Kure Shoko, Kudo Mitsuhiro, Ishino Kousuke, Wada Ryuichi, Naito Zenya	4. 巻 9
2. 論文標題 Nuclear morphological changes in papillary thyroid carcinoma cell: The utility of a 3-dimensional (3D) holographic microscopy in cytology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cytology & Histology	6. 最初と最後の頁 527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2157-7099.1000527	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 Ishino Kousuke, Kudo Mitsuhiro, Peng Wei-Xia, Kure Shoko, Kawahara Kiyoko, Teduka Kiyoshi, Kawamoto Yoko, Kitamura Taeko, Fujii Takenori, Yamamoto Tetsushi, Wada Ryuichi, Naito Zenya	4. 巻 501
2. 論文標題 2-Deoxy-D-glucose increases GFAT1 phosphorylation resulting in endoplasmic reticulum-related apoptosis via disruption of protein N-glycosylation in pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 668-673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.041	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 Arai Hiroki, Wada Ryuichi, Ishino Kousuke, Kudo Mitsuhiro, Uchida Eiji, Naito Zenya	4. 巻 52
2. 論文標題 Expression of DNA damage response proteins in gastric cancer: Comprehensive protein profiling and histological analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 978-988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4238.	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 Hotta Masahiro, Sakatani Takashi, Ishino Kousuke, Wada Ryuichi, Kudo Mitsuhiro, Yokoyama Yasuyuki, Yamada Takeshi, Yoshida Hiroshi, Naito Zenya	4. 巻 519
2. 論文標題 Farnesoid X receptor induces cell death and sensitizes to TRAIL-induced inhibition of growth in colorectal cancer cells through the up-regulation of death receptor 5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 824-831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.033	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 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 石野孔祐、前迫侑也、内藤善哉、戸塚ゆ加里
2. 発表標題 質量分析データに基づくDNA付加体データベースの整備
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第47回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石野孔祐、工藤光洋、彭為霞、呉壮香、和田龍一、内藤善哉
2. 発表標題 膵癌細胞株において2-デオキシ-D-グルコースはGFAT1リン酸化を介して小胞体ストレス関連細胞死を誘発する
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 三神絵理奈、工藤光洋、大橋隆治、川原清子、河本陽子、手塚潔、藤井雄文、呉壮香、石野孔祐、坂谷貴司、和田龍一、佐伯秀久、内藤善哉
2. 発表標題 有棘細胞癌におけるTLR4の発現と機能についての検討
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 近藤亮太、石野孔祐、和田龍一、工藤光洋、内藤善哉
2. 発表標題 肝細胞癌におけるSTAT3経路を介したPDIA3による細胞増殖とアポトーシスの制御
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 呉壮香、和田龍一、彭為霞、石野孔祐、工藤光洋、杉谷巖、内藤善哉
2. 発表標題 40歳未満の乳頭癌におけるBRAF遺伝子変異と臨床病理学的因子の関連についての検討
3. 学会等名 第6回日本甲状腺病理学会総会・学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤亮太、石野孔祐、金谷洋平、高田英志、彭為霞、工藤光洋、和田龍一、谷合信彦、内田英二、内藤善哉
2. 発表標題 肝細胞癌においてPDIA3はJak/STAT経路の活性化を介し細胞増殖能を制御する
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石野孔祐、工藤光洋、彭為霞、吳壯香、河本陽子、手塚潔、藤井雄文、恩田宗彦、和田龍一、内藤善哉
2. 発表標題 液状検体で利用可能な新規膵がん腫瘍マーカーのタンパク質網羅的探索
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤亮太、石野孔祐、金谷洋平、高田英志、彭為霞、工藤光洋、和田龍一、谷合信彦、内田英二、内藤善哉
2. 発表標題 肝細胞癌においてPDIA3はJak/STAT経路の活性化を介し細胞増殖能を制御する
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 新井洋紀、和田龍一、石野孔祐、工藤光洋、内藤善哉
2. 発表標題 胃癌におけるDNA損傷応答関連分子の発現：網羅的蛋白発現解析と病理組織学的検討
3. 学会等名 第63回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap - 石野孔祐 https://researchmap.jp/60584878

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
--	---------------------------	-----------------------	----