

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07275

研究課題名(和文) 糸状菌由来ポリエチレングリコール誘導体による腫瘍特異的な細胞障害性の機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of tumor specific growth inhibition by polyethylene glycol derivative PEG-X

研究代表者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：40595708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規ポリエチレングリコール誘導体 Nonaethylene glycol mono (‘4-iodo-4-biphenyl) ester (PEG-X) は、腫瘍細胞に対しては明らかな増殖抑制効果を示す一方、正常細胞への作用は非常に限られている。PEG-Xの腫瘍特異的な細胞毒性の分子機序を解明することを目的として本研究を行った。その結果、PEG-X細胞のATP合成を抑制することで増殖抑制を行っていることが確認できた。メタボローム解析および酸素消費量の解析から、PEG-Xが細胞の酸化的リン酸化を抑制する機能を持つことがわかり、さらにPEG-Xが呼吸鎖複合体Iを標的とすることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規ポリエチレングリコール誘導体PEG-Xが、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体Iの機能を阻害することにより細胞の増殖抑制を行うことを明らかとした。PEG-Xは腫瘍細胞特異的に細胞障害性を持つことから、副作用の少ない抗腫瘍薬として非常に有望な分子である。PEG-Xの正確な作用機序を解明したことにより、新規の実用可能な抗腫瘍薬の開発に一步近づいた点に、本研究の社会的意義があると考えられる。PEG-Xによる酸化的リン酸化の抑制は正常細胞においても腫瘍細胞においても同等にみられたことから、PEG-Xの効果なぜ腫瘍特異的であるのか、今後さらなる解析により検討を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Nonaethylene glycol mono (‘4-iodo-4-biphenyl) ester (PEG-X) is a polyethylene glycol derivative, synthesized by modifying a compound originally extracted from filamentous bacteria. Although PEG-X shows remarkable inhibition of tumor cell growth, it has limited effect on normal fibroblast. In the present study, we examined the efficacy of PEG-X on tumor cells and fibroblast, and investigated the molecular mechanisms underlying the exclusive cytotoxic effects of PEG-X on tumor cells. Our results indicated that PEG-X induced cell death in tumor cells by decreasing the production of ATP. Metabolome analysis and measurement of oxygen consumption indicated that PEG-X markedly suppressed oxidative phosphorylation (OXPHOS). Further analyses indicated that PEG-X inhibited the activity of mitochondrial respiratory complex I. Based on the results of the present study, PEG-X is a good candidate as a novel anti-cancer agent.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ポリエチレングリコール 増殖抑制効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

土壤中の糸状菌の一種より抽出されたポリエチレングリコール化合物およびその誘導体（以下 PEG-X と総称）(特許第 5364532 号)は、腫瘍細胞に対しては明らかな殺細胞効果す一方、繊維芽細胞等の正常細胞の生存状態や増殖能にはほとんど影響を与えない。しかしながら、その作用機序は全く不明であった。

腫瘍細胞特異的に細胞を傷害する手法の確立およびその作用機序の解明を行ってきた我々は、この化合物に着目し、培養系において PEG-X の機能解析を試みた。その結果、PEG-X はグルコース欠乏状態において特に顕著な殺細胞効果を示すこと、グルコース欠乏状態においてのみ、PEG-X の投与により細胞内の ATP 濃度が顕著に低下することを発見した。これらの結果は乳がん、膵臓がん、神経芽腫等の各種腫瘍細胞株において確認できた。またこの時、アセチル CoA の合成も PEG-X により抑制されていた。以上の結果は PEG-X が ATP 産生経路のうち、グルコース以外の物質からの経路を抑制している可能性を強く示唆した。そこでメタボローム解析を行い、PEG-X 投与前後で変化する代謝産物を網羅的に調べたところ、PEG-X 投与細胞では脂質代謝経路の一部が阻害されていることを示すデータを得た。

2. 研究の目的

PEG-X の腫瘍細胞特異的な細胞障性の機序を解明し、副作用の少ない新規がん治療法の開発を行うことを目的として本研究を行った。具体的には、PEG-X が標的とするエネルギー代謝経路を絞り込むこと、それが PEG-X によってどのように阻害されるか、その分子メカニズムを解明すること、マウス皮下腫瘍モデルを用い、*in vivo* における抗腫瘍効果と副作用の有無を検証することを目的として以下の研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 細胞の酸素消費量の定量

PEG-X 投与後の細胞の酸素消費量(OCR)を Seahorse Bioscience XFp extracellular flux-analyzer を用いて測定した。細胞を専用プレートに播種し、48 時間後に 1 μ M の PEG-X 存在下または非存在下で OCR の測定を行った。

(2) ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性の定量

呼吸鎖複合体 I の活性は、MitoCheck Complex I assay kit (catalog no. 700930; Cayman Chemical) を用いて、呼吸鎖複合体 II/III の活性は、MitoCheck Complex II/III assay kit (Cayman Chemicals; catalog no. 700950)、呼吸鎖複合体 IV の活性は、MitoCheck Complex IV assay kit (catalog no. 700990; Cayman Chemicals) を用いて行った。

(3) マウス Xenograft model を用いた PEG-X の抗腫瘍効果の検討

免疫不全マウス NOD-SCID に、ヒト神経芽腫細胞株 SK-N-AS を移植して皮下腫瘍を作成し、腫瘍が 100 m^3 に育った時点で薬剤の投与を開始した。投与は 40mg/Kg(体重)の PEG-X もしくは水のみを週 2 回、腹腔内注射により行った。週 1 回ずつ腫瘍サイズやマウスの健康状態の確認・記録を行い、最終投与日の 1 週間後に剖検・腫瘍の摘出を行った。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析データの再検討

メタボローム解析の結果から、PEG-X が脂質代謝経路の一部が阻害されている可能性を示唆するデータを得たため、PEG-X 投与により脂質代謝酵素の発現や活性に変化が現れるか検証したが、明確な結果が得られなかった。また、研究を開始した当初は PEG-X 投与によりアセチル CoA が低下するという結果を得ていたが、何回かの追加実験の結果、その現象が再現できなかった。一方、メタボローム解析のデータのうち、脂質代謝経路以外の部分についても再度確認したところ、PEG-X 投与により解糖系が亢進し TCA サイクル

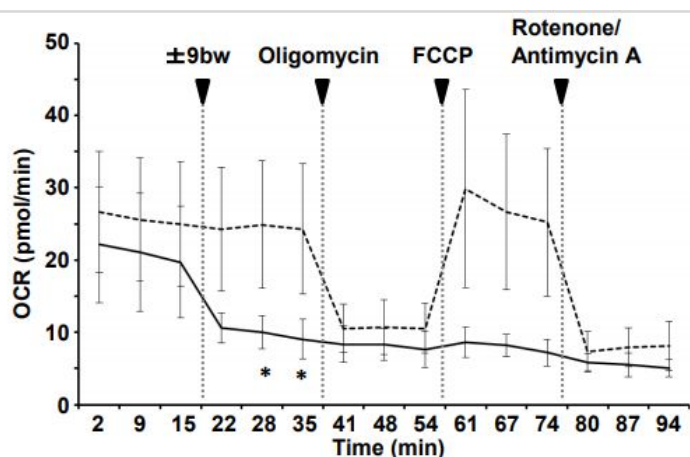


図1 PEG-X 投与後の OCR の変化

神経芽腫細胞株 SK-N-AS に 1 μ M の PEG-X を投与後 OCR の測定を行った（実線）。コントロールでは水のみを投与した(点線)。平均値 \pm SD を示す。* P<0.05

が抑制している傾向がつかめた。また、PEG-X 投与条件ではカルニチン/アセチルカルニチン比が低下していることも、解糖系の亢進を裏付けた。これらのデータは、PEG-X が TCA 回路から酸化的リン酸化までのいずれかの過程を阻害している可能性を示唆したため、以下の解析に進んだ。

(2) PEG-X の OCR に対する効果

PEG-X 投与後の OCR の変化を flux-analyzer を用いて測定した結果、1 μ M の PEG-X 投与直後から OCR が完全に抑えられることが分かった (図 1)。その効果はオリゴマイシンやロテノン、アンチマイシン A と同等であった。FCCP による脱共益によっても OCR が回復しなかったことから、PEG-X は複合体 V 以外の呼吸鎖複合体を阻害している可能性が考えられた。図 1 に示す結果は、SK-N-AS 細胞を用いた実験の結果であるが、ヒト神経芽腫細胞株 NB9 およびヒト線維芽細胞 HDF を用いた解析においても、ほぼ同様の結果が得られた。

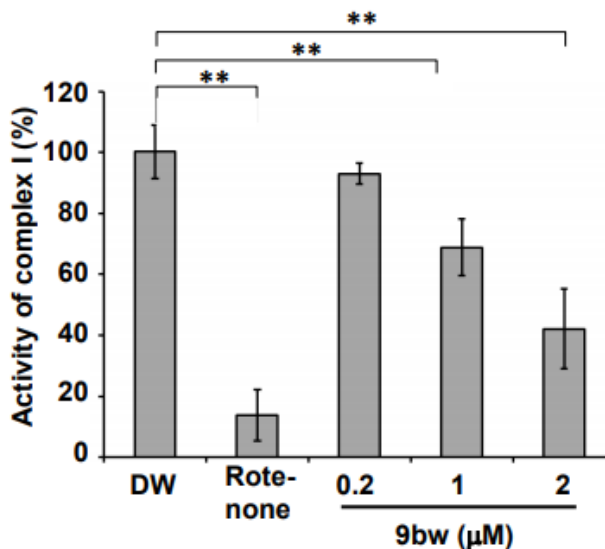


図 2 PEG-X 投与後の呼吸鎖複合体 I の活性変化。平均値 \pm SD を示す。** P<0.01

(3) PEG-X による呼吸鎖複合体の阻害効果

PEG-X の作用標的を絞り込むために、PEG-X 存在下または非存在下における呼吸鎖複合体 I ~ IV の活性を測定した結果、PEG-X は複合体 I の活性を有意に抑制することが確認できた (図 2)。いっぽう、複合体 II/III および IV に対しては PEG-X の明確な阻害効果は確認できなかった。

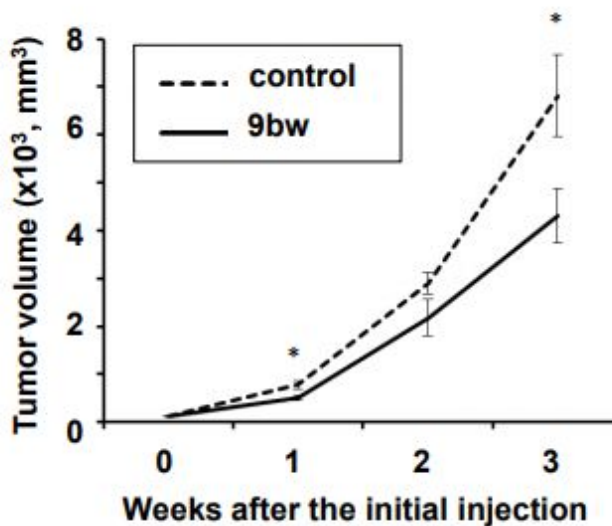


図 3 PEG-X 投与後の腫瘍サイズの変化。平均値 \pm SEM を示す。* P<0.05

(4) *in vivo* における PEG-X の抗腫瘍効果の検討

免疫不全マウス皮下に SK-N-AS 細胞を移植し、腫瘍体積が 100mm³ を越えた時点で PEG-X の腹腔内投与を行った。週 2 回の投与を 3 週間続けた結果、PEG-X 投与群においては水のみを投与したコントロール群と比較して、腫瘍増大速度の有意な抑制効果が観察された (図 3)。マウスの体重や健康状態には顕著な変化は見られなかった。

これらの結果から、PEG-X が呼吸鎖複合体 I の活性を阻害して酸化的リン酸化を抑制し、その結果細胞内 ATP の産生が阻害されることで、細胞の増殖抑制が生じることがわかった。なお、PEG-X による酸化的リン酸化の阻害は正常線維芽細胞においても同様に確認された。このことは、PEG-X により酸化的リン酸化が抑制された場合の ATP 濃度の変化が腫瘍細胞において特に顕著である可能性と、低 ATP 状態への耐性が腫瘍細胞において特に低い可能性が考えられ、今後の詳細な解析が必要である。また、*in vivo* における解析の結果、PEG-X がマウスの健康状態に影響を与えることなく、抗腫瘍効果を示すことが分かった。このことは、PEG-X が新規の抗腫瘍薬として非常に有望であることを意味するため、今後さらに詳細な解析を続けていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nagasaki-Maeoka E, Ikeda K, Takayama KI, Hirano T, Ishizuka Y, Koshinaga T, Tsukune N, Takayama T, Inoue S, Fujiwara K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Polyethylene glycol derivative 9bw suppresses growth of neuroblastoma cells by inhibiting oxidative phosphorylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2943-2953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14512	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fujiwara K, Nagasaki-Maeoka E, Koshinaga T, Kanagawa M, Yoshida M, Watanabe H, Soma M.
2. 発表標題 The antitumor functions of polyethylene glycol derivatives originally extracted from filamentous bacterium.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	尾崎 俊文 (OZAKI Toshinori) (40260252)	千葉県がんセンター（研究所）・発がん研究グループ DNA損傷シグナル研究室・室長 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------