

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650230

研究課題名（和文） 脂質メタボロミクスによるがん微小環境再構築メカニズムの解析

研究課題名（英文） Lipid metabolomics to analyze the mechanisms for cellular adaptation to tumor microenvironment

研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

研究成果の概要（和文）：がん細胞は脂質を盛んに合成するが、その意義は不明である。今回我々は、脂質代謝酵素 ATP-クエン酸リアーゼ (ACLY) の枯渇ががん細胞の増殖を抑えること、この効果は活性酸素 (ROS) および AMPK と呼ばれる酵素のリン酸化が低い細胞で大きいことを見出した。ACLY の枯渇はパルミチン酸の上昇をもたらした。パルミチン酸の増加は ROS を誘導するため、これが制がん効果につながるのかもしれない。進行した大腸がんでは AMPK のリン酸化と酸化ストレスが低く、ACLY の阻害が新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells often enhance *de novo* lipid synthesis. However, its functional significance remains unknown. In this study, we found that depletion of a lipid-synthesizing enzyme, called ATP citrate lyase (ACLY), blocks cancer cell growth. This anticancer effect was more evident in those cells with lower reactive oxygen species (ROS) and lower phosphorylation level of AMPK. ACLY depletion elevated the relative abundance of palmitate. Because palmitate can induce ROS, it may contribute to the anticancer effect of ACLY depletion. In clinical colon tumors, higher malignant grades correlated with lower levels of AMPK phosphorylation and oxidative stress, suggesting that ACLY inhibition can be utilized as an anticancer therapeutics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：脂質代謝、細胞増殖、がん、微小環境、メタボローム、ATP-クエン酸リアーゼ、活性酸素、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景
がん細胞が旺盛に増殖して出来た腫瘍塊の

内部では、血管が不在のために血流の供給が不足し、低酸素・pH低下・栄養飢餓といった

複合的な局所環境の悪化が生じる。これらのいわゆる微小環境ストレスがもたらすがん細胞の内部変化や間質相互作用、それに伴う微小環境の再構築プロセスを理解すべく、国内外で研究が進展しつつある。また、一般にがん細胞では、外来性脂質の多寡にかかわらず、脂質の新規合成が盛んであることが古くから知られている。しかしながら、その意義は十分に理解されていない。我々はこれまでに、幾つかの脂質代謝酵素ががん細胞の生育を促進することを報告してきた (Migita, Seimiya et al. Cancer Res, 2008; Mashima, Seimiya et al. Oncogene, 2009 ほか)。これらの酵素の選択的阻害は、新たながん分子標的治療法として応用できるかも知れない。脂質代謝は糖代謝と連動するため (図1)、腫瘍塊の内部に生じるグルコース飢餓環境が、がん細胞の脂質代謝系と連係し、双方が微小環境の再構築に寄与する可能性も考えられる。

2. 研究の目的

(1) 具体的な目的: 本研究では、脂質メタボロミクス技術を動員し、がん細胞内で働きが盛んになった脂質代謝系が、がん細胞自身および腫瘍内微小環境の再構築プロセスにどのような影響を与えるのか、その分子基盤も含めて明らかにすることを目的とする。具体的には、脂質合成カスケード (図1) を構成する主要酵素: ATP-クエン酸リアーゼ (ATP-citrate lyase: ACLY)・アセチル Co-A カルボキシラーゼ (acetyl Co-A carboxylase: ACC)・脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase: FASN) に着目し、これらががん細胞の生存・増殖を支持する分子機構を明らかにする。

(2) 本研究の意義および期待される効果: 我々の最近の成果も含め、幾つかの脂質代謝酵素ががんの発生や悪性化、ストレス耐性などに寄与することがすでに知られている (Reviewed in Mashima, Seimiya et al. Br J Cancer, 2009)。腫瘍内における脂質代謝の制御により、がん細胞自身のみならず、それを取り巻く微小環境の再構築系をも破綻させ、がんの治療に結びつけることが出来ると期待される。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子ノックダウンとがん細胞増殖抑制効果の検定: 前立腺がん・乳がん・肺がん・大腸がんをはじめ、様々なヒト臓器由来の培養がん細胞株において、小分子干渉 RNA により上記の脂質代謝酵素群をそれぞれ枯渇させ、このときの細胞増殖抑制効果を調べた。ノックダウンの効率は、各々の酵素に対する一次抗体を用いてウェスタンブロット法にて確認した。

(2) 遺伝子ノックダウンによる細胞内応答の解析: ウェスタンブロットによる個別解析および GeneChip マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析により、細胞内の応答シグナル経路を予測し、さらにこれを検証した。効果予測バイオマーカーになると考えられた因子として、AMP 活性化蛋白質キナーゼ

(AMP-activated protein kinase: AMPK) および酸化ストレス (8OHdG) については、臨床大腸がん組織での免疫化学染色を実施し、診断・治療面への応用性を検証した。

(3) 脂溶性・水溶性メタボローム解析: 脂質代謝酵素 (代表的酵素として ACLY: 後述) を枯渇もしくは過剰発現させた前立腺がんおよび乳がん細胞株のリピドミクス解析により、前項の細胞応答を司る脂質メディエーターを同定するとともに、水溶性メタボローム解析を実施し、代謝パターンの変動を解析した。これらの研究は、東京大学・中部大学の田口良教授および慶應義塾大学の曾我朋義教授の協力を得てそれぞれ実施した。

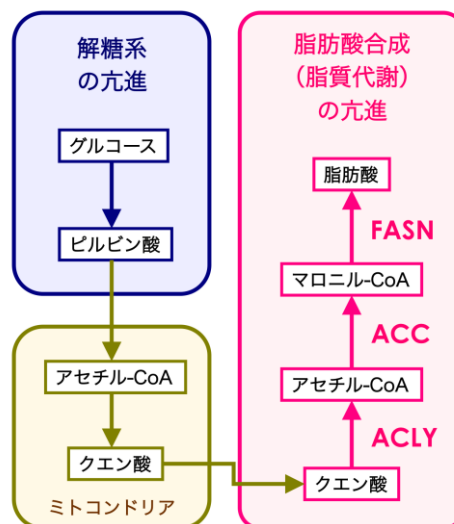


図1 がんにおける脂質代謝の亢進

多くのがんでは、解糖系の亢進のみならず、脂肪酸の新規合成も亢進している。脂肪酸合成に関わる酵素群とがんの関連が報告されている。

4. 研究成果

前項に記した様々ながん細胞株において、一連の脂質代謝酵素群の遺伝子発現をノックダウンすると、顕著な細胞増殖の抑制が観察された。前立腺上皮細胞・間質細胞などの正常細胞ではこれらの酵素を枯渇させても増殖抑制効果は微弱であり、がん細胞選択性が確認された。酵素群の中でノックダウンによる増殖抑制効果が最も顕著であったのは ACLY であった (図1)。そこで、ACLY 枯渇細胞についてさらに解析を進めたところ、この遺伝子のノックダウンに伴うがん細胞の増殖抑制は、細胞内活性酸素 (reactive oxygen

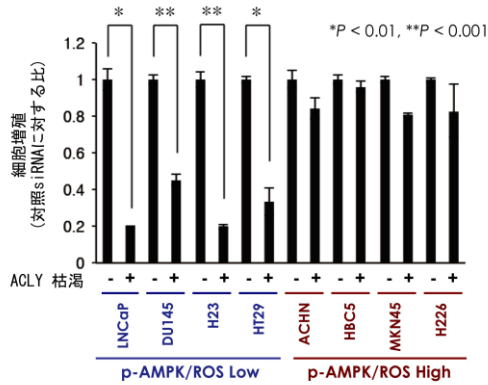


図2 ACLYの枯渇によるがん細胞の増殖抑制

species: ROS) レベルおよび AMPK のリン酸化 (活性化) レベルが低い細胞株で特に顕著であることが明らかとなった (図2)。このような細胞株では、ACLY のノックダウンによる増殖抑制に伴い、ROS および AMPK リン酸化のレベルが亢進した。重要なことに、抗酸化剤N-アセチルシステインによるROSの阻害は、この細胞増殖抑制を効果的に解消した。これらの結果から、ROSは、ACLY ノックダウンによる細胞増殖抑制の媒介因子である可能性が示唆された。一方、定常状態においてROSおよびAMPKリン酸化のレベルが高いがん細胞株は、ACLY ノックダウンによる増殖抑制に耐性を示した。ミトコンドリア機能を欠損した ρ^0 細胞では、ROS および AMPK リン酸化のレベルが高く、ACLY 枯渇による増殖抑制に耐性を示した。ミトコンドリア機能を再構成したcybrid細胞では、ROS および AMPK リン酸化のレベルが対照細胞と同等レベルに復帰し、ACLY 枯渇による増殖抑制にも感受性となった。そこでさらに、ACLY を枯渇もしくは過剰発現させた前立腺がん細胞についてのトランスクリプトーム解析および水溶性・脂溶性メタボローム解析を実施した。その結果、ACLY の枯渇はがん細胞内のカルニチン経路の働きを低下させて中性脂質の蓄積をもたらすこと、さらに脂肪酸の炭素鎖伸長に関わる遺伝子の発現を低下させ、短鎖脂肪酸であるパルミチン酸の細胞内含有比を増加させることがわかった。パルミチン酸の過度な増加はミトコンドリアを刺激してROSの産生を誘導させるため、これが ACLY 枯渇による細胞増殖抑制の原因となっているのかもしれない。前述のROS および AMPK のリン酸化レベルが亢進したがん細胞株では、適応応答が起きているために ACLY の枯渇による増殖抑制に耐性を示すものと考えられた。最後に、腫瘍内微小環境を構築しているヒト大腸がん組織の免疫染色を実施した。その結果、進行度の高いがんでは AMPK のリン酸化および酸化ストレスがいずれも低く、ACLY 枯渇が有効な治療戦略となる可能性が示唆された (図3)。

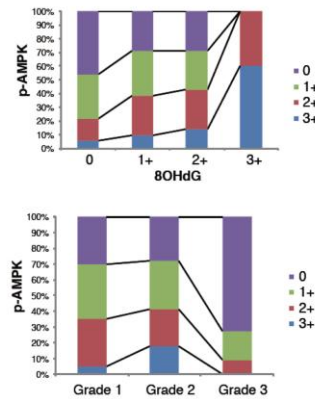
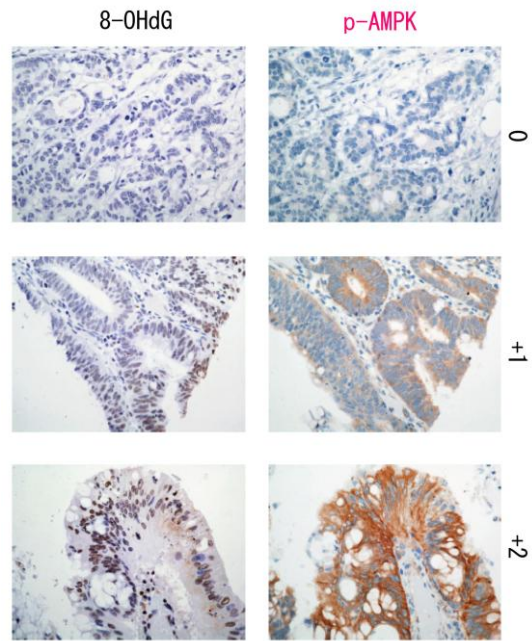


図3 ACLY枯渇の効果マーカー

大腸がん組織において、AMPKリン酸化と酸化ストレス (8OHdG=ROSレベルを反映) は正の相関を示した (上のグラフ)。AMPKのリン酸化は腫瘍の病理学的悪性度 (グレード) と逆相関した (下のグラフ)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計16件)

- ① Mashima, T., Seimiya, H. Role of acyl-CoA synthetases in glioma cell survival and its therapeutic implication. *Tumors of the Central Nervous System*, 1, 337-340 (2011), 査読有
- ② Mashima, T., Okabe, S., Seimiya, H. Molecular pharmacological approach reveals potential new strategies to suppress androgen receptor signaling in prostate cancer. *Mol Cell Pharmacol*, 3, 7-12 (2011), 査読有

- ③ Mashima, T., Okabe, S., Seimiya, H. Pharmacological targeting of constitutively active truncated androgen receptor by nigericin and suppression of hormone-refractory prostate cancer cell growth. *Mol Pharmacol*, 78, 846-854 (2010), 査読有
- ④ Migita, T., Narita, T., Asaka, R., Miyagi, E., Nagano, H., Nomura, K., Matsuura, M., Satoh, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Seimiya, H., Ishikawa, Y. Role of insulin-like growth factor binding protein 2 in lung adenocarcinoma: IGF-independent antiapoptotic effect via caspase-3. *Am J Pathol*, 176, 1756-1766 (2010), 査読有
- ⑤ Ohishi, T., Hirota, T., Tsuruo, T., Seimiya, H. TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora-A overexpression. *Cancer Res*, 70, 2041-2052 (2010), 査読有

[学会発表] (計41件)

- ① 右田敏郎、岡部幸子、池田和貴、曾我朋義、田口良、清宮啓之、Inhibition of ATP citrate lyase mediates anticancer effects via reactive oxygen species and triglyceride accumulation、第70回日本癌学会学術総会(名古屋)、平成23年10月3-5日
- ② Mashima T., Okabe S., Seimiya H., Involvement of constitutively active truncated androgen receptor (tAR) in hormone-refractory prostate cancer growth and the tAR inhibition by nigericin. 第10回日韓がん老化合同シンポジウム (東京)、平成23年2月14-15日
- ③ 右田敏郎、岡部幸子、清宮啓之、脂質代謝酵素を標的とした乳癌、前立腺癌の治療とその分子機構、第11回関東ホルモンと癌研究会 (東京)、平成23年1月29日
- ④ 馬島哲夫、岡部幸子、清宮啓之、ナイジェリシンによる恒常活性化型アンドロゲン受容体の抑制はホルモン再燃性前立腺がん細胞増殖を阻害する、第11回関東ホルモンと癌研究会 (東京)、平成23年1月29日
- ⑤ 右田敏郎、岡部幸子、清宮啓之、脂質代謝酵素の阻害によるがん細胞死とその分子機構、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会・ワークショップ (神戸)、平成22年12月7-10日

- ⑥ 岡部幸子、右田敏郎、馬島哲夫、清宮啓之、がん細胞の増殖・生存における脂質代謝酵素の役割、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)、平成22年12月7-10日
- ⑦ 右田敏郎、岡部幸子、清宮啓之、脂質代謝酵素の阻害による制がん効果とその分子メカニズム、第14回日本がん分子標的治療学会学術集会 (東京)、平成22年7月6-8日

[図書] (計1件)

- ① 右田敏郎、馬島哲夫、清宮啓之、がんにおける脂質代謝、*実験医学増刊号「がんと代謝」*、羊土社、印刷中

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA HIROYUKI)
がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長
研究者番号：50280623

(2) 研究分担者

右田 敏郎 (MIGITA TOSHIRO)
がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・研究員
研究者番号：20462236
(H23：連携研究者)

馬島 哲夫 (MASHIMA TETSUO)
がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・研究員
研究者番号：30311228
(H23～)

(3) 連携研究者

田口 良 (TAGUCHI RYO)
中部大学・大学院生命健康科学研究科・教授
研究者番号：20080210

斎藤 慎一 (SAITO SHINICHI)
東京理科大学・理学部第一化学科・教授
研究者番号：21655017