

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790198

研究課題名（和文） 抗癌剤の奏効率向上を目指した膵癌新規治療標的へのアプローチ

研究課題名（英文） Approach to a new target for pancreatic cancer therapy to elevate the response of anti-cancer drugs

研究代表者

西 弘二 (NISHI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：00398249

研究成果の概要（和文）：ヒト膵癌細胞株を用いてメタボローム解析を行い、ゲムシタビンの標的として CTP 合成酵素が関与している可能性が考えられた。さらに、CTP 合成酵素はゲムシタビン感受性にも関与していることが示唆された。また、薬剤耐性に関与している内皮-間葉転換に着目し、内皮系細胞および間葉系細胞をメタボローム解析したところ、数種類の代謝物に変化が見られた。これらの代謝物が EMT やゲムシタビン耐性と関連があるかも知れない。

研究成果の概要（英文）：Metabolomics analysis using human pancreatic cancer cell lines showed that CTP synthase was involved in the action of gemcitabine. In addition, gemcitabine was observed to be involved in the sensitivity to these cancer cell lines. Epithelial - mesenchymal transition (EMT) is known to be drug resistance. Metabolomics analysis using 8 kinds of human pancreatic cancer cell lines (epithelial: 4 kinds and mesenchymal: 4 kinds) revealed the significant changes in some kinds of cellular metabolite levels. Therefore, these metabolites may be involved in the EMT and/or gemcitabine resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後の悪い固形癌の1つであり、日本国内でも膵癌による死亡数は男女ともに年々増加傾向にある。膵癌の化学療法には、代謝拮抗剤である gemcitabine (2',2'-difluoro 2'-deoxycytidine) の単独療法が標準治療となっているが、その奏効率は5～20%と低く、50%生存期間も約6ヶ月と非常に短い。そのため、gemcitabine単独療法に加える新規治療薬の開

発が急務とされているが、gemcitabine自体の作用機序が明らかにされていないことも要因となり、未だ有効なものは見出されていない。膵臓は体の奥にあり、異変を発見しにくい臓器であることに加え、①かなり早い時期から遠隔転移を起こし、②周囲の組織に浸潤しやすい性質を有している。癌細胞の浸潤・転移に上皮-間葉転換 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) が関与して

いることが多くの報告で明らかにされつつある。EMTとは、cadherinを介した細胞間接着により組織を構築する上皮細胞が細胞間及び細胞外マトリクスとの接着を消失し、運動性の高い間葉系細胞に変化する現象である。EMTにより間葉系細胞となった癌細胞は、その形態及び高い運動性により、血管内や組織内に浸潤し、最終的に転移を起こすと考えられている。そのため膵癌の高い浸潤・転移能にはEMTが関与している可能性が高い。事実、膵癌細胞株においてEMTにより生じた間葉系細胞が高い浸潤・転移能を有することが報告されている。興味深いことに、EMTにより生じた間葉系細胞は、EMTを起こす前の上皮細胞と比較して抗癌剤耐性を示すことが見出された。膵癌細胞も EMTにより抗癌剤耐性になることが報告されている。また、抗癌剤を長期間曝露して作成した獲得耐性株においてもEMTが観察されたことから、抗癌剤奏効後の再発・再燃癌細胞が浸潤・転移を起こしやすくなる可能性が示唆されている。これらの報告は、EMTが膵癌における化学療法耐性の原因の1つであり、EMTを抑制することで癌の進行を抑えることが出来る可能性を示唆している。これまでの報告によると、EMTにはE-cadherinの発現低下に加えて、TwistやSnailなどのE-cadherin抑制因子の発現上昇が関与していることが知られている。最近、これらのタンパク質の発現に、ある特定のmicroRNAが関与していることが見出された。しかしながら、実際にはそのようなタンパク質やRNAの発現を調節している分子は明らかにされていない。その一方でLiらは、microRNAの発現調節に低分子化合物が関与することを報告している。この知見は、細胞内で最も下流に位置すると思われる細胞内代謝物が、実際には関連因子と何らかの関係を有している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では膵癌の早期発見及び化学療法の奏効率向上を目的として、ゲムシタビン曝露ヒト膵癌細胞の網羅的メタボローム解析を行い、ゲムシタビンの作用機序を明らかにし、次いで EMT により生じる細胞内代謝変動及び抗癌剤曝露に対する代謝応答変化を明らかにすることで、膵癌の化学療法における新規治療標的及び早期発見のためのバイオマーカーを同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ゲムシタビン曝露ヒト膵癌細胞株のメタボローム解析

ヒト膵癌細胞株 (Miapaca-2、AsPC-1) にゲムシタビン 100 μM を曝露し、0 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に細胞を回収し、抽出過程を経てサンプルを調製した。また、ヒト膵癌細胞株のうち、内皮系細胞 (BxPC3、PK-1、PK-59、CFPAC-1) および間葉系細胞 (Miapaca-2、AsPC-1、PANC-1、PSN-1) も同様に適当な細胞数まで培養後、抽出過程を経てサンプルを調製した。Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (CE-TOFMS) により、ゲムシタビン曝露細胞においてはゲムシタビン代謝物および細胞内代謝物を、非曝露細胞においては細胞内代謝物を網羅的に測定した。

(2) ウェスタンブロッティング

培養したヒト膵癌細胞株に Protease inhibitor cocktail を含む RIPA buffer を添加し、細胞溶解液を調製した。これらのサンプルを用いて、SDS-PAGE を行った。その後、PVDF 膜に転写し、それぞれの目的蛋白質の抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。内部標準タンパク質としては GAPDH を用いた。

4. 研究成果

(1) ゲムシタビン曝露ヒト膵癌細胞株のメタボローム解析

ゲムシタビン曝露後 0、3、6、12 および 24 時間におけるメタボローム解析の結果、ゲムシタビン代謝物（1、2 および 3-リン酸化体）の中でも、3 リン酸化体のレベルが最も高く、ゲムシタビン曝露直後から 3-リン酸化体まで代謝されることが確認された。また、内因性の核酸代謝においては、ゲムシタビン曝露により dCTP の減少が観察された。この結果は、これまでゲムシタビンの作用であることが知られていたリボヌクレオチド還元酵素阻害が起きたことを示唆している。一方、興味深いことに UTP レベルの上昇および CTP レベルの低下も観察された。この結果は、ゲムシタビンがリボヌクレオチド還元酵素に加えて CTP 合成酵素も阻害したことを示唆している。リボヌクレオチド還元酵素および CTP 合成酵素の特異的阻害である Hydroxyurea および 3-deazauridine を曝露した際のメタボローム解析の結果において、ゲムシタビン曝露時と 3-deazauridine 曝露時の核酸代謝阻害様式は極めて類似していた。この結果より、ゲムシタビンの核酸代謝阻害作用はリボヌクレオチド還元酵素よりも CTP 合成酵素への関与が大きいことが示唆された。また、ゲムシタビン曝露後 24 時間において解糖系代謝物や TCA サイクルに含まれる代謝物のレベルの上昇が認められた。これは、ゲムシタビンの核酸代謝阻害によ生じた結果である可能性が高い。これまで、細胞がアポトーシスを起こすには解糖系によるエネルギー（ATP）産生が必要であることが知られていることから、ゲムシタビンによる解糖系代謝物のレベル上昇は、ゲムシタビンによるアポトーシス誘導の新たなメカニズムであるかも知れない。

(2) ゲムシタビン感受性関連酵素の発現確認
ゲムシタビン低感受性細胞株として、Miapaca-2、高感受性細胞株として AsPC-1 を用いて、細胞内の核酸代謝酵素であるリボヌクレオチド還元酵素、CTP 合成酵素、ゲムシタビンの細胞内取込みに関与する輸送体 ENT1 の発現量について比較検討するためウエスタンブロッティングを行った。その結果、Miapaca-2 に比べて AsPC-1 では、リボヌクレオチド還元酵素および CTP 合成酵素の発現量が低かった。Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) については有意な差は観察されなかった。そのため、ゲムシタビン感受性には、これまで報告のあったリボヌクレオチド還元酵素に加えて、新たに CTP 合成酵素の関与も示唆された。

(3) EMT 関連代謝物の網羅的探索

8 種類のヒト膵癌細胞株（内皮系細胞（BxPC3、PK-1、PK-59、CFPAC-1）および間葉系細胞（Miapaca-2、AsPC-1、PANC-1、PSN-1））のメタボローム解析を行った結果、いくつかの代謝物においては、内皮系および間葉系の 2 群間で違いが観察された。イノシンにおいては、内皮系細胞の方がよりレベルが高く、アデニンにおいては、間葉系細胞群の方がよりレベルが高いことが確認された。そのため、内皮系および間葉系細胞の特性維持にはこれらの代謝物が関与しているかも知れない。さらに、これらの代謝物は核酸代謝に関係しているため、核酸代謝その中に内皮系、間葉系を決定づけるもの、または EMT の引き金になるようなものがあるのかも知れない。

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)

[学会発表] (計2件)

1. Koji Nishi, Yurika Fujimura, Akito Nishimuta, Masahiro Sugimoto, Tomoyoshi Soga, Yusuke Tanigawara. Title: A metabolomic analysis revealed the involvement of deoxycytidine kinase and CTP synthase in the sensitivity of human pancreatic cancer cells to gemcitabine, American Association of Cancer Research, Annual meeting 2012, March 31, 2012. Chicago, USA

2. 西弘二、藤村由梨香、西牟田章戸、杉本昌宏、曾我朋泰、谷川原祐介
演題「ゲムシタビン曝露ヒト膵癌細胞の網羅的メタボローム解析」、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月3日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 弘二 (NISHI KOJI)

慶應義塾大学・医学部・特任講師

研究者番号：00398249