

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750056

研究課題名(和文) 終末糖化産物に着目した糖尿病併発膵癌促進蛋白質の同定及び柑橘類含有化合物の作用

研究課題名(英文) Identification of the promoter proteins for pancreatic cancer which concurred with diabetes and research of effect of the compounds in citrus fruits which investigation is approached from AGEs.

研究代表者

高田 尊信 (TAKATA, Takanobu)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：20515308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌と糖尿病の関連性は認められているが、明確な因果関係は不明である。糖尿病血管合併症など生活習慣病に強く関与する、毒性終末糖化産物に(Toxic AGEs, TAGEと命名)が癌と関連することに着目し、TAGEが膵癌の発展・増悪を促進しているという仮説を立てた。TAGEの原因物質である果糖/ブドウ糖代謝中間体グリセルアルデヒド(GA)を、膵管癌のモデルである膵管癌由来の培養細胞PANC-1に添加する実験により、細胞内にGA取り込まれるGA濃度の上昇とともに、細胞内TAGEの生成/蓄積量が増加することが明らかとなった。また、癌の浸潤や細胞死に関連する蛋白質にも異常が起きることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is related to diabetes. However, their causal relationship remains unclear. Toxic advanced glycation end products (toxic AGEs, named TAGE), involved in diabetic vascular complications (e.g., lifestyle-related diseases), are related to cancer. Based on this finding, we hypothesized that TAGE promote the development and progression of pancreatic cancer.

In an experiment with a fructose/glucose metabolic intermediate, glyceraldehyde (GA), i.e., the causative agent of TAGE, added to the culture medium for PANC-1 cells derived from pancreatic cancer (pancreatic duct cancer model), the production and accumulation of intracellular TAGE increased along with an increased concentration of GA incorporated into the cells. In addition, abnormalities were found in proteins involved in cancer invasion and cell death.

研究分野：糖尿病

キーワード：膵癌 食習慣 糖尿病 生活習慣病 TAGE

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、生体内で生成される各種の終末糖化産物 (AGEs) の中でも、特に果糖 / ブドウ糖代謝中間体グリセルアルデヒド (GA) に由来する Glycer-AGEs (toxic AGEs, TAGE と命名) が、糖尿病合併症を始めとする生活習慣病の増悪に深く関連することに注目していた (生体の科学 2007;58:502, AGEs と老化-糖化制御からみたウェルエイジング- 2013; 69)。TAGE はその受容体である Receptor for AGEs (RAGE) と結合することを介して癌、心血管病、非アルコール性脂肪肝炎、アルツハイマー病、不妊等の多様な疾患に関与することが示されている (日本薬理学会誌 2012;139:193, 金沢医科大学雑誌 2012; 37:141)。生活習慣病を防止するための方法には、過食の抑制、適切な運動などが挙げられる。それと同時に、栄養その他の面から「体内にとって好ましい影響をもたらすと期待できる食品」を摂取するように心がけ、健康的な食生活を送ることで病気に罹ることを予防するという発想が現代社会で広がりつつある。

## 2. 研究の目的

国内において、膵癌死亡者数は年間 2 万人を超える。膵癌は、患者の 50%以上が診断時に糖尿病を発症している点、糖尿病合併型膵癌の多くが進行癌である点、癌の 90%が膵管上皮に発生する点等の特徴をもつ (日消外誌 1982;15:1758, *Endocr. Relat. Cancer* 2012;19:9 他論文多数)。しかし、膵癌と糖尿病との関連は十分には明らかにされていない。今後も、糖尿病患者の増加に伴い、糖尿病合併型膵癌患者数も増加すると予測され、糖尿病合併型膵癌の進行機序の解明は、国民の健康的な生活のために急務である。

糖尿病患者の病態にはいくつかの特徴があるが、そのうちの 1 つに食後高血糖が挙げられる。

そこで、研究代表者は、還元糖と蛋白質との非酵素的糖化反応の後期段階で生成する AGEs に着目した。AGEs は、その前駆体というべき還元糖や、還元糖の代謝中間体により様々な種類が存在する。各種の AGEs のうち、TAGE が糖尿病合併症や癌に関連する報告に着目し、TAGE が糖尿病合併症や癌の促進を誘導するという仮説を立てた。この仮説を証明することが研究目的の 1 つであり、食品に由来する化合物による、細胞内 TAGE 生成 / 蓄積阻害を検討することがもう 1 つの目的である。

## 3. 研究の方法

(1) 糖尿病患者の食後高血糖状態のモデルとして、高グルコース培地でヒト株化膵管上皮培養細胞 PANC-1 を培養し、さらに GA を添加することによる TAGE 生成 / 蓄積の検討:

PANC-1 を高グルコース培地 (4.5 g/L) で培養することで、糖尿病患者の食後高血糖状態における膵管癌細胞のモデルとする (以下、すべての PANC-1 の培養および実験において高グルコース培地を用いた)。PANC-1 に GA を添加して 24 時間後の細胞の状態を顕微鏡で観察し、

細胞生存率を WST-8 法により解析した。

GA を PANC-1 に添加して 24 時間後に細胞内に生成 / 蓄積した TAGE を、抗 TAGE 特異抗体を用いたスロットプロット (SB) 法により定量した。すでに報告されている SB 法 (*J. Gastroenterol.* 2010;45:646) よりも、高感度な測定方法を開発した。その新規 SB 法の開発のために、細胞ライセートの調製に必要な細胞溶解液の組成について大いに工夫した。同時に、細胞を抗 TAGE 特異抗体で染色し、観察および画像撮影を行った。

GA を PANC-1 に添加して 24 時間後に細胞内に生成 / 蓄積した TAGE の分子量を推定するため、細胞ライセートを調製し、抗 TAGE 特異抗体を用いたウェスタンプロット (WB) 法による分析を行った。

(2) 高グルコース培地で培養する PANC-1 に GA を添加して、細胞内に生成する TAGE 化蛋白質の検討:

PANC-1 に GA を最終濃度 0、1、2、4 mM で添加し、24 時間後の細胞から細胞ライセートを調製し、推定された TAGE 分子量の情報等をもとに、癌浸潤や細胞障害 / 細胞死に関連する蛋白質である Aminopeptidase N (APN)、HSP90、HSP90、HSP70、HSP27、pro Caspase-3、cleaved Caspase-3 の抗特異的抗体を用いた WB 分析を行った。

(3) 高グルコース培地で培養する PANC-1 に GA を添加して、培養上清中へと放出 / 逸脱している TAGE の量を、SB 分析によって検討:

最終濃度 0 mM および 4 mM の GA 添加処理をした PANC-1 の培養上清を回収し、濃縮液を調製して SB 分析により、TAGE 量を定量した。

(4) 柑橘類由来化合物ナリンジンの PANC-1 への添加のための濃度検討

柑橘類に含有される化合物であり、2 型糖尿病モデルラットの諸症状を改善することが報告されているナリンジン (ナリンギン) (*Food Chemistry* 2013;141:4115) に着目した。柑橘類にはナリンジンとその配糖体であるナリンジェニン (ナリンゲニン) が多く含まれる。ナリンジェニンは肝臓で代謝されてナリンジンになるので、柑橘類の摂食によりナリンジンを豊富に体内に取り込むことができる。ナリンジンが PANC-1 の TAGE 生成 / 蓄積阻害の効果があるかどうかを検討するための実験系の構築が可能かどうかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) 糖尿病患者の食後高血糖のモデルとして、高グルコース培地で PANC-1 を培養し、さらに GA を添加することによる TAGE の生成 / 蓄積の検討:

すでに株化肝実質細胞に対して GA を添加して、細胞内に TAGE を生成 / 蓄積しているかを検討した報告があるが (*J. Gastroenterol.*

2010;45:646, *World J. Gastroenterol.* 2015;21:1784)、株化膵管上皮培養細胞 PANC-1 における細胞内 TAGE 生成 / 蓄積を検討した報告は存在しない。PANC-1 が、培地中の GA を取り込むか否かについての報告も存在しなかったが、膵島細胞に対して GA を添加し、その細胞内への取り込みについて分析した報告が存在した (*Biochem. J* 1994;304:295)。

そこで、PANC-1 においても細胞外から添加した GA を細胞内へと取り込む可能性があると考え、添加する GA の最終濃度を複数設定し、細胞に対する影響を調べ、細胞内 TAGE の生成 / 蓄積の検討を行った。

予備試験として、GA の最終濃度 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM を添加して 24 時間後の PANC-1 の細胞生存率を WST-8 法により解析したところ、GA 濃度 1 mM 以降から細胞数減少が認められた。そこで PANC-1 に添加する GA 濃度は 0, 1, 2, 4 mM に固定し、独立して 3 回実験を繰り返した。WST-8 法での実験データは、一元配置分散分析 (ANOVA) で解析をして有意差が存在することを確認した後、Dunnett-t 検定を用いて、0 mM の細胞生存率に対する、各 GA 濃度添加細胞の細胞生存率に有意差が存在するかを解析した。その結果、GA 濃度依存的に細胞生存率が有意に低下していることがわかった。

PANC-1 に最終濃度 0, 1, 2, 4 mM の GA を添加し、24 時間後に細胞ライセートを調製して、SB 分析細胞内に生成 / 蓄積した TAGE を定量した。SB 分析は、当初は、すでに株化肝実質細胞の TAGE 定量について報告されている方法 (*J. Gastroenterol.* 2010;45:646) を参考に実施したが、検出できたバンドが微弱あるいは検出限界以下であったため、定量が困難であることが判明した。そこで、まず従来の SB 分析法を改良した『高感度 SB 法』の開発に取り組んだ。

いくつかの細胞溶解液で細胞ライセートを調製し、SB 法を試みた結果、従来の手法を含めて、SB 分析において感度が低い原因および再現性が低い原因は、蛋白質をメンブレン膜へ吸着させる過程において、蛋白質が十分に吸着しないためであるという仮説を立てた。この仮説に基づき、細胞ライセートを調製するために必要な細胞溶解液の組成のうち、メンブレン膜に対して蛋白質の吸着を低下させる可能性がある化合物を調べた。ついで、それらを含む組成の細胞溶解液の調製が可能であるかを検討した。SB 分析の感度を高めるためには「細胞膜を破壊し、細胞内蛋白質を回収できること」、「蛋白質の高次構造を破壊できること」、「メンブレン膜に対する蛋白質の吸着を阻害しないこと」という 3 つの条件を満たす細胞溶解液が必要であり、このための化合物の組成の検討を行い、最終的に尿素・チオ尿素などを中心とした組成で細胞溶解液を調製することにした (論文投稿準備中)。これは、研究代表者が過去に携わった研究

(*Oncol. Rep.* 2012;28:1968) から着想を得たものであり、研究代表者の考案した細胞溶解液は上記の 3 つの条件を満たす。当該細胞溶解液を用いて細胞ライセートを調製し SB 分析を行った場合、従来法と比べて 1/15 の蛋白質質量で分析できることが判明した。これは蛋白質がメンブレン膜に吸着する効率が大幅に上昇したことによると考えられる。

研究代表者の考案した新規高感度 SB 法により、GA 添加して 24 時間後の PANC-1 の細胞内 TAGE 生成 / 蓄積を定量したところ、GA 濃度依存的に細胞内に TAGE が生成 / 蓄積していることが証明された。この SB 分析の結果は、細胞を抗 TAGE 特異抗体で染色した結果とも「正相関」を示し、また後述する WB 分析の結果とも「正相関」を示した。

研究代表者が開発した新規高感度 SB 分析法により、独立して 3 回、PANC-1 の細胞内 TAGE の生成 / 蓄積量を定量し、それぞれの結果の平均値を算出するとともに、有意差の有無を検討した。

有意差の検討においては、ANOVA の後、Dunnett-t 検定を行った。この結果、高濃度の GA 添加処理をされた PANC-1 細胞内の TAGE 量については、対照群と比べて有意な差を認めた。

すでに報告されている株化肝実質細胞の TAGE 量の SB 分析 (*J. Gastroenterol.* 2010;45:646) においては、その結果は統計処理が行われておらず、有意差の有無について検討がなされていない。

培養細胞内に生成 / 蓄積した TAGE 量を SB 分析によって定量し、統計処理を行い有意差の有無を証明したのは、本研究が初めてである (日本薬学会第 136 年会にて発表。論文投稿準備中)。

なお、新規高感度 SB 分析法は、PANC-1 以外にも適用できることも確認した。

新生仔ラット初代培養心筋細胞や、ラットの肝臓、腎臓から得た細胞ライセートをサンプルとして SB 分析を試みた結果、TAGE 定量は可能であった (GA 添加をした新生仔ラット初代心筋培養細胞の TAGE 定量に関しても、日本薬学会第 136 年回にて発表。論文投稿準備中)。

細胞を抗 TAGE 特異抗体により染色した結果、GA 濃度依存的な細胞内 TAGE の生成 / 蓄積が認められたが、撮影した細胞群の画像から、GA 濃度依存的に細胞の数が減少していること、外形が変化した細胞が増加していることも確認された。

この結果は、GA 添加 24 時間後に顕微鏡観察を行った結果とも一致している。

なお、顕微鏡観察においては、最終濃度が 2 mM および 4 mM の高濃度の GA を添加された PANC-1 でも、培地中に浮遊している死細胞はほとんど観察できない。これは TAGE を生成 / 蓄積した細胞は、細胞死を迎えた後に崩壊する

までの時間が早いためであろうと考察している。

最終濃度 0、1、2、4 mM の GA を PANC-1 に添加し、24 時間後に WB 分析用の細胞ライセートを調製した。細胞ライセートの調製には、SB 分析とは異なり、市販の細胞溶解液を使用した。

抗 TAGE 特異抗体を用いた WB 分析の結果、複数の TAGE 化蛋白質のバンドが検出できた。

WB 分析の画像を印刷し、分子量サイズマーカーの分子量および移動度をもとにして片対数グラフを作成し、TAGE 化蛋白質の推定分子量を算出した。分子量約 25 kDa 付近の低分子蛋白質から、分子量約 240 kDa 付近の高分子蛋白質まで幅広く TAGE 化を受けていることが明らかとなった。

### (2) 高グルコース培地で培養する PANC-1 に GA を添加して、細胞内に生成する TAGE 化蛋白質の検討:

PANC-1 に GA を最終濃度 0、1、2、4 mM で添加し、24 時間後の細胞から細胞ライセートを調製し、先に行った抗 TAGE 特異抗体による WB の結果から推定した TAGE の分子量の情報等をもとに、癌浸潤や細胞障害 / 細胞死に関連する蛋白質の中から、TAGE 化候補蛋白質を選別し、WB 分析を行い、TAGE 化の有無を検討した。本研究では、癌細胞浸潤に関与する Aminopeptidase N (APN)、細胞死に関連する HSP90、HSP70、HSP27、pro Caspase-3、cleaved Caspase-3 の抗特異的抗体を用いた WB 分析を行った。その結果、APN、HSP90、HSP70、HSP27、pro Caspase-3 の 5 つの蛋白質に高分子化バンドが検出された。これらのバンドは GA 濃度依存的に増強しており、TAGE のバンドとも分子量が一致することから、これらの蛋白質は TAGE 化蛋白質であると推定した。今後、免疫沈降法や 2 次元電気泳動法によるプロテオミクス解析等の手法を駆使して、TAGE 化の証明をする予定である。

HSP90 には TAGE 化蛋白質のバンドが認められなかった。今後、HSP90 との違いについて、蛋白質全体の立体構造や、アミノ酸配列中の TAGE 化部位であるリジン残基の数、立体配置などについて検討する予定である。

WB 分析において、対照である PANC-1 ライセートにも GA 添加の PANC-1 ライセートにも、アポトーシス誘導蛋白質である cleaved Caspase-3 のバンドが検出できなかった。

cleaved Caspase-3 のバンドが検出できなかった点について、詳細に検討した。アポトーシス誘導への刺激を受けていない状態の PANC-1 では、cleaved Caspase-3 が存在しないか、抗体の検出限界以下であることが報告されている (*Oncotarget* 2015;6:21208, *Oncol. Rep.* 2013;29:1671 等)。さらに、本研究と同じく高グルコース培地で培養された PANC-1 においても、アポトーシス誘導されていない状態の PANC-1 には cleaved Caspase-3 が存在しないか、もしくは抗体の検出限界以下であることが報告されて

いる (*Oncotarget* 2016;7:18495)。これらの報告を踏まえた上で、cleaved Caspase-3 の WB 分析で、対照用 PANC-1 ライセートおよび GA 添加 PANC-1 ライセートのすべてから cleaved Caspase-3 のバンドが検出できない問題について、抗体の不具合というファクターを排除するために、0、1、2、4 mM の GA 添加 PANC-1 ライセートとともに Jurkat ライセート (シトクロム c 未処理物およびシトクロム c 処理物) を用いて実験を行った。その結果、シトクロム c 処理をして cleaved Caspase-3 の産生を誘導させた Jurkat ライセートにのみ cleaved Caspase-3 のバンドが検出された。

このことから、PANC-1 の TAGE 生成 / 蓄積依存的な細胞死は、cleaved Caspase-3 の増加を伴わないことが明らかとなり、細胞死の原因がアポトーシス誘導による可能性は低いことが推察された。

TAGE 生成 PANC-1 の細胞内において、本来、pro Caspase-3 から cleaved Caspase-3 への活性化を制御する HSP90、HSP70、HSP27 が TAGE 化されていることがどのような影響をもたらすかは不明である。

また pro Caspase-3 自身も TAGE 化されていることが細胞にもたらす影響も不明である。

これら TAGE 化蛋白質の機能については、今後の研究課題である。

### (3) 高グルコース培地で培養する PANC-1 に GA を添加して、培養上清中へと放出 / 逸脱している TAGE を、SB 分析によって検討:

最終濃度 0 mM および 4 mM の GA 添加処理をした PANC-1 の培養上清を回収した。培養上清中の蛋白質が微量であるため、上清を濃縮する必要があったが、培養上清中に大量に存在するウシ胎児血清アルブミン (FBS) のために濃縮作業が困難であることが予想された。

そこで、FBS の分子量 (約 67 kDa) に着目し、回収した培養上清のうち「100 kDa 以上の画分」と「50 kDa 以下の画分」を濃縮することにした。FBS を含有する分画については、別途対策を立てることとした。

分子量 100 kDa 以上画分の培養上清濃縮液および 50 kDa 以下の培養上清濃縮液を得た後、TAGE 定量のための SB 法の条件検討をした。

濃縮液を一定量分取して、何の処理も施さずに SB 分析した場合、蛋白質のメンブレン膜への吸着力が弱いために、検出が困難であることが予想された。

そこで、研究代表者が、細胞ライセート用に開発した新規 SB 法を応用して、尿素・チオ尿素系の細胞溶解液を調製し、培養上清濃縮液に添加して SB 法を行った。

この方法においても、細胞溶解液の添加量や、培養上清濃縮液の量などには検討すべき点が多かったが、対照および 4 mM GA 添加 24 時間後の PANC-1 から得た「100 kDa 以上の培養上清濃縮液」の TAGE 量を定量する予備試験を行

うことができた。

その結果、4 mM GA を添加した PANC-1 の「100 kDa 以上の培養上清」には、対照よりも多くの TAGE が存在することがわかった。この事実は、TAGE 生成 / 蓄積 PANC-1 が細胞死を迎えることにより、細胞内 TAGE が細胞外へと逸脱 / 放出している可能性を示唆する。

細胞外へと逸脱・放出した TAGE は、他の細胞の RAGE と結合し、TAGE-RAGE 系を介してダメージを与える可能性、癌の増悪をもたらす可能性があるかと推測するが、今後の研究課題である。

#### (4) 柑橘類由来化合物ナリンジンの PANC-1 への添加のための濃度検討

柑橘類に含有される化合物であり、2 型糖尿病モデルラットの諸症状を改善することが報告されているナリンジェニン (*Food Chemistry* 2013;141:4115) に着目した。ナリンジェニンはヒト体内で代謝され、ナリンジンが生成する。ナリンジンが PANC-1 細胞の TAGE 生成 / 蓄積阻害効果を調べるための実験を組むために、ナリンジン自身が細胞毒性を示さない濃度を検討する必要があった。

過去、ナリンジンを PANC-1 に添加して WST-8 法により細胞生存率を求めた実験データをもとに、細胞毒性を示さない濃度を検討した。

今後、ナリンジンを前処理した PANC-1 に、GA を添加し、TAGE の生成 / 蓄積を解析する実験を行う予定である。

#### 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)

(論文雑誌)(計 4 件)

Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takino J, Takata T, Ueda T, Tsutsumi M. Toxic AGEs (TAGE) theory in the pathogenesis of NAFLD and ALD. *Int. J. Diabetes Clin. Res.*, 2 巻, 2015, 4, 査読有.

URL:<http://clinmedjournals.org/International-Journal-of-Diabetes-and-Clinical-Research.php>

Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T, Ueda T, Takino J, Tsutsumi M, Hyogo H, Yamagishi S. Serum levels of toxic AGEs (TAGE) may be a promising novel biomarker in development and progression of NASH. *Med. Hypotheses*, 84 巻, 2015, 490-493, 査読有.

DOI:10.1016/j.mehy.2015.02.002

URL:[http://www.medical-hypotheses.com/article/S0306-9877\(15\)00069-9/fulltext](http://www.medical-hypotheses.com/article/S0306-9877(15)00069-9/fulltext)

竹内正義、瀧野純一、逆井(坂井)亜紀子、高田尊信、上田忠司. 生活習慣病の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与: -新たな予防戦略- ~ 食事性 AGEs および糖毒性の真実 ~. *金医大雑誌*. 40 巻, 2015, 95-103, 査読有.

URL:<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/select?jo=dr6knzmd&UserID=202.209.18.102>.

Takeuchi M, Takino J, Sakasai-Sakai A, Takata T, Ueda T, Tsutsumi M, Hyogo H, Yamagishi S. Involvement of the TAGE-RAGE system in non-alcoholic steatohepatitis: Novel treatment strategies. *World J. Hepatol.* 6 巻, 2014, 880-893, 査読有.

DOI:10.4254/wjh.v6.i12.880

<http://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v6/i12/880.htm>

ISSN 1948-5182 (online)

(学会発表)(計 2 件)

高田尊信、逆井(坂井)亜紀子、上田忠司、竹内正義「ヒト膵管癌培養細胞における細胞内 TAGE 蓄積と細胞障害関連蛋白質の探索」日本薬学会第 136 年回、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

上田忠司、高田尊信、竹内正義「培養心筋細胞における細胞内 TAGE 生成 / 蓄積と心筋細胞障害」日本薬学会第 136 年回、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

高田 尊信(TAKATA, Takanobu)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号: 20515308