

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：32723

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860115

研究課題名(和文)脂質代謝を標的にした膵癌新規治療法へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to new therapeutic strategy against pancreatic cancer by targeting lipid metabolism

研究代表者

西 弘二(Nishi, Koji)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00398249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂質代謝を標的とした膵癌治療の新規開発を目的として、脂肪酸合成阻害剤、コレステロール合成阻害剤、PPAR 作動薬およびPPAR 拮抗薬を用いて各種検討を行った。膵癌細胞株にはMiapaca-2、PANC1、AsPC1およびBxPC3を用いた。その結果、阻害剤の中でも特に、脂肪酸合成阻害剤(TOFA、セルレニン、イルガサン)に強いアポトーシス誘導および増速抑制効果が見られた。しかし、PANC1に対してのみいずれの阻害剤も効果を示さなかった。これらの結果は、一部の膵癌細胞種に対して脂質代謝阻害が有効な治療法であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of various lipid metabolism inhibitors on proliferation and viability of human pancreatic cancer cells for developing new therapeutic strategy. In used inhibitors, inhibitors to fatty acid synthesis (TOFA, Celurenin, Irgasan) especially showed the remarkable induction of apoptosis and suppression of proliferation. This result indicates that the pathway of fatty acid synthesis is very important for pancreatic cancer cells. On the other hand, these inhibitors did not showed such effects only to PANC1 cell. These result suggest that inhibition of fatty acid synthesis is partially critical to pancreatic cancer cells and can be effective target for chemical therapy.

研究分野：分子薬物動態学

キーワード：膵癌 脂質代謝 アポトーシス

### 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が、化学療法の奏効率は極めて低い。近年、脂肪酸合成酵素阻害剤や Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\alpha$  や PPAR  $\gamma$  の作動薬にも、抗癌活性があることが分かってきた。これらの知見は、脂肪酸合成のみならず、癌細胞内の脂質代謝が細胞増殖抑制や細胞死誘導のための標的となりうることを示している。このような背景から申請者は、「様々な脂質代謝経路における阻害剤の効果を網羅的に評価し、膵癌細胞内の脂質代謝メカニズムを理解することができれば、ゲムシタピンとの併用も視野に入れた膵癌化学療法の奏効率向上を目指した最適な脂質代謝阻害ターゲットを明らかにすることができる」のではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、膵癌細胞に対する脂質代謝阻害剤の抗癌効果を網羅的に評価し、膵癌細胞における脂質代謝メカニズムを明らかにすることで、膵癌治療における新たな治療標的を同定し臨床への応用を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、膵癌細胞に対する各種脂質代謝阻害剤の効果を網羅的に評価し、膵癌細胞の脂質代謝に重要な代謝経路を同定することで、膵癌細胞内の脂質代謝メカニズムの解明および膵癌治療における脂質代謝阻害ターゲットを明らかにする。

研究計画の進め方として、以下の点について詳細に検討を行った。

(1) 膵癌細胞に対する脂質代謝阻害剤の効果とその程度を網羅的に調べる。細胞内の脂質代謝の中から、脂肪酸合成経路、コレステロール合成経路、PPAR 関連経路について着目し、脂肪酸合成阻害剤として TOFA、セルレニンおよびイルガサン、コレステロール合成阻害剤 (HMG-CoA 還元酵素阻害剤) として、シンバスタチンおよびプラバスタチン、PPAR 作動薬としてベザフィブラートおよびフェノフィブラート、PPAR 作動薬としてロシグリタゾンおよびトログリタゾンを用いて各種検討を行った。また膵癌細胞株として汎用されている Miapaca-2、PANC1、AsPC1 および BxPC3 を用いた。効果の評価に MTS アッセイを用いた。96 ウェルプレートに各ウェル 3000 個の細胞を播種し、一晚放置後、10 nM から 100  $\mu$ M までの各濃度に調製した各種薬剤を添加した。添加 72 時間後に MTS 試薬を添加する。MTS 試薬は正細胞数によってのみ代謝され、吸光度が上昇することを利用して、間接的に生細胞数を測定した。

(2) 膵癌細胞に効果を示す阻害剤を同定し、どのような効果を示すか検討する。(1) の検討で膵癌細胞に効果的な阻害剤によりアポトーシス誘導効果を評価した。評価にはアネキシン V および 7-ADD を用いたフローサイトメーターによる解析を行った。またカスパーゼ活性では、カスパーゼ 3 の基質 (Ac-DEVD-AFC) の分解に伴う蛍光を測定することにより、カスパーゼ 3 活性を特異的に定量した。さらに、アポトーシス時に分解されることが知られる PARP (Poly ADP ribose

polymerase) の分解物をウエスタンブロッティングにより評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 各種脂質代謝阻害剤の効果

各種脂質代謝阻害剤の効果は、MTS アッセイにより行った。その結果、いずれの薬剤も高濃度では細胞数の減少が認められたが、特に TOFA、セルレニンおよびイルガサンでは他の薬剤と比べて著しい細胞数の減少が観察された。さらに、TOFA に関しては、最も低濃度で効果を示した。これは、これらの薬剤が膵癌細胞に対して毒性を示した結果、あるいは細胞増殖を抑制した結果によるものであると考えられた。また TOFA は Acetyl-CoA carboxylase (ACC) の阻害剤、セルレニンおよびイルガサンは脂肪酸合成酵素阻害剤であり、いずれも脂肪酸合成経路の阻害剤であることから、膵癌細胞の生存や増殖には、脂質代謝の中でも特に脂肪酸合成が重要であることが示唆された(図1)。

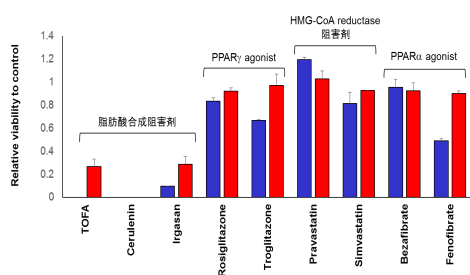


Figure 3 Effect of various lipid metabolism inhibitor (10  $\mu$ M, 72 hr) on growth of MiaPaca-2 (■) and PANC-1 (■). Cells were seeded into 96-well plates at 3000 cells/well. After incubation overnight, cells were incubated with various inhibitors at 10  $\mu$ M for 72 h. Viable cells were assessed by MTS assay. Data indicates the mean from three independent measurements.

##### (2) 抗腫瘍効果のメカニズム評価

(1) の結果から、膵癌細胞の生存に脂肪酸合成経路が重要な役割を持ち、有効な治療標的となりうる可能性が示唆された。そこで、

効果の見られた TOFA について、膵癌細胞に対してどのように抗腫瘍効果を発揮しているか評価するために各種検討を行った。

始めに、TOFA によるアポトーシス誘導効果を評価するために、アネキシンVおよび7-ADDを用いた検討を行った。MiaPaca-2 に TOFA を添加後、24 時間、48 時間に細胞を回収し、フローサイトメーターにより測定した。その結果、TOFA による有意なアポトーシス誘導効果が観察され、この効果は濃度依存的、および時間依存的であった。次に、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ3の活性を評価した。その結果、TOFA により有意に MiaPaca-2 内のカスパーゼ3の活性上昇が見られた。さらに、TOFA 添加後24時間においてはPARPの分解が観察された。同様のアポトーシス誘導効果がAsPC1およびBxPC3においても観察された。興味深いことにPANC1には、アポトーシス細胞の出現は見られず、カスパーゼ3の活性化も見られず、PARPの分解物も検出されなかった。これらの結果は、膵癌細胞株の中には脂肪酸合成経路への依存度が低いものもあることを示している。今後はこのような細胞にも有効な治療標的の探索を検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

西 弘二、鈴木健太、時澤佑菜、澤本潤平、岩瀬由未子、弓田長彦、池田敏彦  
ヒト膵癌細胞株における脂質合成阻害剤の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導効果  
日本薬学会136会年会

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西 弘二 (NISHI , Koji )

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00398249