

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05877

研究課題名（和文）がん細胞に特異的な代謝リプログラミングを利用した抗腫瘍効果に関する基盤研究

研究課題名（英文）Basic study on antitumor effects using the cancer cell specific metabolic reprogramming.

研究代表者

照屋 輝一郎 (Teruya, Kiichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：10273971

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）：本研究はがん細胞の代謝リプログラミングをターゲットとすることで、がん細胞と正常細胞を厳密に識別し、がん細胞を抑制する手段の開発を目的とした。その結果、酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）高感受性がん細胞は高い乳酸生成能、低いミトコンドリア活性というWarburg効果の強い細胞株であり、LMF低感受性がん細胞は反対にWarburg効果の低い細胞株であることが判明した。がんの代謝リプログラミング関連因子であるPDK1、GLUT1、およびLDHAではLMF処理濃度依存的な発現の減少が見られたが、PDHBでは大きな変化は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は現在日本人の死因第一位であるがんに対して、がん治療の三大療法における問題点の解決に貢献するため、がん治療のターゲットである「がん細胞」と守るべき「正常細胞」を厳格に区別することのできる方法に新たな知見を加えるものである。従来の「細胞増殖活性の高さ」をターゲットとした場合では、生体機能の維持に重要な増殖力の高い正常細胞への副作用が大きな問題となる。本研究の成果は「がん細胞」と「正常細胞」を区別し、がん細胞特異的な抑制へつなげる成果であり、学術的・社会的に意義のあるものである。

研究成果の概要（英文）：This research was performed to develop the suppression of the cancer by the strict discrimination between cancer cells and normal cells. The state of reprogrammed metabolism of cancer cells was employed for this research. As results, high-sensitive cancer cells for Low molecular weight fucoidan extract (LMF) exhibited high tendency of Warburg effects with high-producing lactic acid and inactive mitochondria. On the other hand, low-sensitive for LMF exhibited low tendency of Warburg effects with low lactic acid production and active mitochondria. The reprogrammed metabolism related factors, PDK1, GLUT1, and LDHA were downregulated by LMF treatment.

研究分野：食品科学

キーワード：抗腫瘍効果 フコイダン 代謝リプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死因の約 3 割を占めている。がんの治療の中でも進行がんの治療は極めて難しいのが現状である。がん治療の三大療法である外科療法、放射線療法、化学療法のいずれも患者に対し副作用など強いストレスを与えるため免疫力を低下させ、場合によってはがんの進行を促進させることが知られている。そこで、副作用が少なく、多くの固形がんにも有効な新規のがん治療法、またはがん抑制法の開発が喫緊の課題となっている。がん治療のターゲットである「がん細胞」と守るべき「正常細胞」、この 2 つは共に患者自身に由来する細胞であり、がん細胞と正常細胞を厳格に区別すること難しさががん治療を困難なものとしている。現在のがん治療で多用されているがん細胞の「細胞増殖活性の高さ」をターゲットとした場合、生体機能の維持に重要で増殖力の高い正常細胞への副作用が大きな問題となっている。

フコイダンはコンブ、メカブ、モズクなどの褐藻類から有機酸で抽出される硫酸化フコースを主成分とする粘質多糖類の総称であり、がん細胞特異的アポトーシス誘導効果、血管新生抑制効果、腫瘍免疫増強作用の他、多彩な効果が報告されている。こうしたフコイダンの多面的な機能が、一面的に作用する分子標的医薬と異なり、変異しやすいがん細胞に対して効果的に作用すると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞に特徴的な代謝リプログラミングをターゲットとした「正常細胞とがん細胞の厳密な区別」、さらに「代謝リプログラミングを認識し、がん細胞の増殖抑制、がん細胞形質の抑制作用、あるいは脱がん形質作用」について検討を行い、がん細胞特異的ながん抑制法を開発することを目的とした。また、がんの化学療法の補助食品としての応用を目的として、酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (LMF) がもつ、がん細胞特異的な抗腫瘍効果の検討を行った。

### 3. 研究の方法

酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (LMF) は第一産業株式会社 (大阪) から入手したものを使用した。LMF を 8,000 ×g、4°C の条件下で 30 分間遠心分離し、上清を回収した。これを 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌したものを実験に使用した。実験にはヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞、およびヒト結腸腺がん由来 HCT116 細胞を使用した。各細胞の増殖は主に WST-1 assay により評価した。また、がん細胞の代謝リプログラミングに及ぼす効果に関しては、各細胞の Warburg 効果関連遺伝子の発現を定量 RT-PCR で評価し、また細胞の代謝産物を定量することで評価を行った。

### 4. 研究成果

これまでの研究においてがん細胞特異的な増殖抑制効果を有することを見出した酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (LMF) を HT1080 細胞および HCT116 細胞に処理したところ、両細胞株で LMF の処理濃度依存的な細胞数の減少が確認された。また、LMF に対して高い感受性を示したがん細胞株と低い感受性を示したがん細胞株があることが確認された (図 1)。

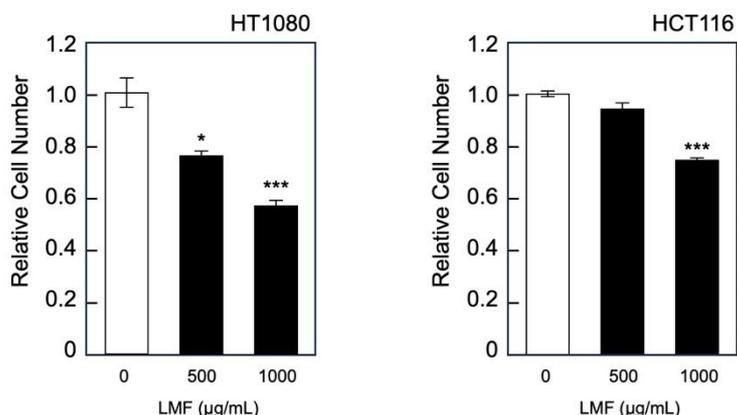


図 1 酵素消化低分子化フコイダン抽出物 (LMF) 処理によるがん細胞増殖抑制効果  
HT1080 細胞および HCT116 細胞へ LMF 処理を 48 時間行い WST-1 assay により細胞数を測定した。  
(\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ )

この LMF への感受性の違いががん細胞の代謝リプログラミング状態に関係する可能性を検討す

るため、LMF 高感受性の HT1080 細胞と LMF 低感受性の HCT116 細胞における解糖系関連生成物の一つである乳酸の産生量を調べたところ、両細胞株間で乳酸の産生量に違いがあることが判明した (図 2)。

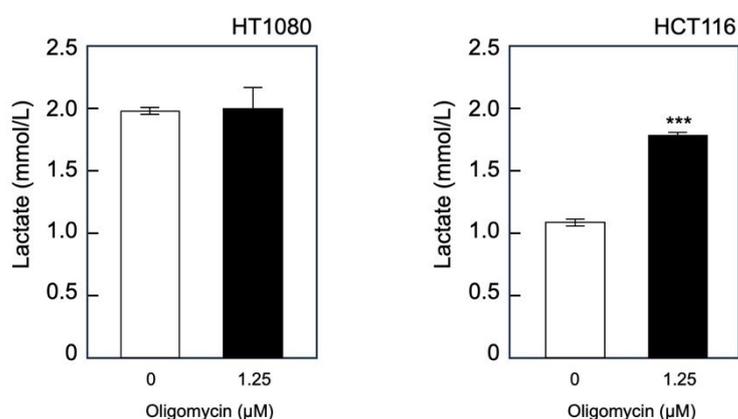


図 2 LMF 高感受性 HT1080 細胞と LMF 低感受性 HCT116 細胞の乳酸産生量

HT1080 細胞および HCT116 細胞を 48 時間培養し、培養上清中の乳酸量を Lactate Assay Kit WST (同仁化学)により測定した。 (\*\*\*:  $p < 0.001$ )

ミトコンドリア ATP 合成阻害剤 oligomycin 存在下では、HCT116 細胞において乳酸産生の増大が認められた。この結果は HCT116 細胞ではミトコンドリア ATP 産生を利用しており、oligomycin で阻害されたミトコンドリア ATP 産生の補完として解糖系での ATP 産生の増強が乳酸産生の増大として現れたことが示唆された。一方で oligomycin の影響を受けていない HT1080 細胞は主に解糖系での ATP 産生に依存し、ミトコンドリア ATP 産生は低いと考えられた。つまり、LMF 高感受性がん細胞は乳酸生成量が多く、LMF 低感受性がん細胞は乳酸生成量が低いことが明らかとなった。

また細胞ミトコンドリアにおける ATP 合成を阻害する脱共役剤 Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) を用いて検討した結果、LMF 低感受性がん細胞株において、FCCP 処理による細胞増殖の低下が顕著であり、LMF 高感受性がん細胞株では FCCP の影響を受けにくいことが判明した (図 3)。

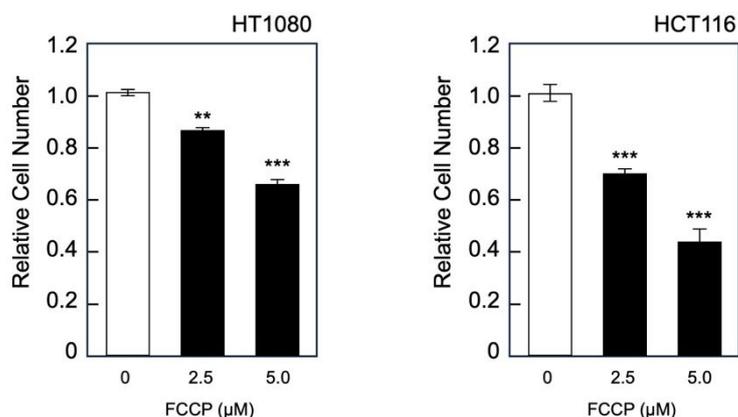


図 3 HT1080 細胞と HCT116 細胞における脱共役剤 Carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) の増殖抑制効果

HT1080 細胞および HCT116 細胞に FCCP 処理を 48 時間行い Hoeshst 33342 染色により細胞数を測定した。 (\*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$ )

また FCCP 処理によるミトコンドリア膜電位の低下は LMF 高感受性がん細胞株よりも LMF 低感受性がん細胞株において顕著であった (Data not shown)。このことからミトコンドリア使用状態の低いがん細胞が LMF 感受性が高いと考えられた。これらのことより、がん細胞の代謝リプログラミングで認められる Warburg 効果が強く表れている細胞株が LMF への感受性が高くなるものと考えられた。またこれらのがん細胞株では代謝リプログラミングの状態が異なっており、代謝リプログラミング状態のタイピングを行う系として利用できると考えられた。

次にがんの代謝リプログラミングの関連因子の遺伝子発現を調べた。細胞内にグルコースの

取り込みを促すグルコーストランスポーター1 ( GLUT1 )、そしてピルビン酸から乳酸産生を促す乳酸脱水素酵素 ( LDHA )、これらは解糖系側の関連因子である。そして、ピルビン酸からアセチル CoA 産生を促すピルビン酸脱水素酵素 ( PDHB )、PDHB を阻害するピルビン酸脱水素酵素キナーゼ ( PDK1 )、これらはピルビン酸からアセチル CoA 産生を介するクエン酸回路側の関連因子である。LMF がこれらの遺伝子発現に及ぼす効果を定量 RT-PCR で検討した結果、PDK1、GLUT1、および LDHA では LMF 処理濃度依存的な発現の減少が見られたが、PDHB では大きな変化は確認されなかった ( 図 4 )。

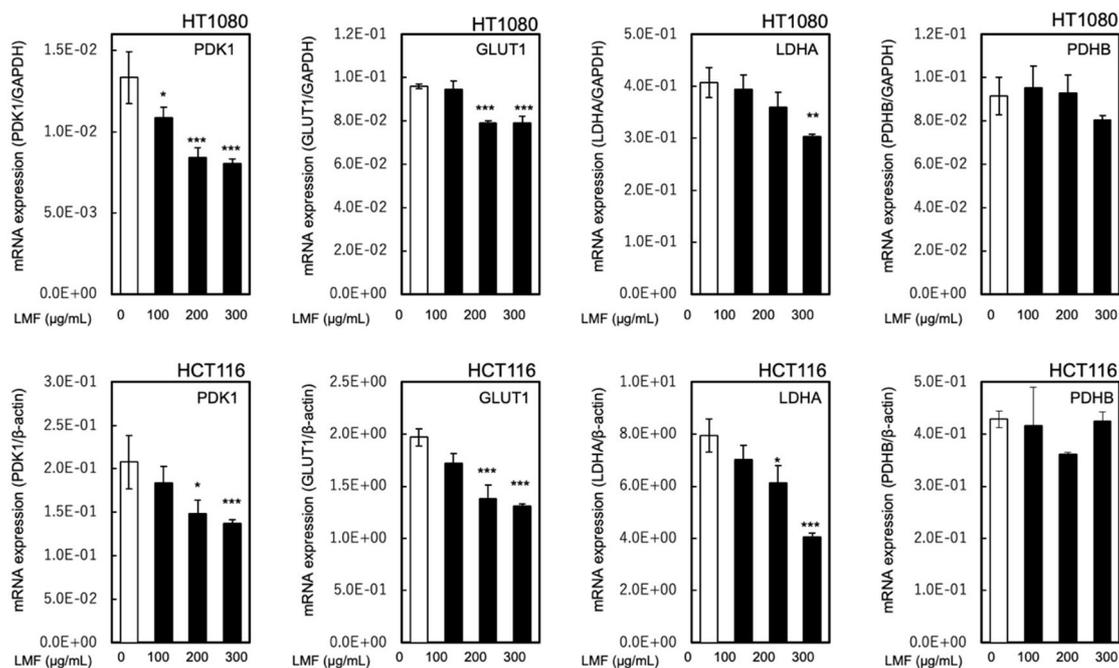


図 4 LMF 処理によるがんの代謝リプログラミング関連因子の mRNA 発現変動 ( 上段: HT1080 細胞、下段: HCT116 細胞 )

HT1080 細胞ならびに HCT116 細胞を LMF で 96 時間処理し、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ ( PDK1 )、グルコーストランスポーター1 ( GLUT1 )、乳酸脱水素酵素 ( LDHA )、ピルビン酸脱水素酵素 ( PDHB ) の各遺伝子の発現量変化を定量 RT-PCR で解析した。統計処理はそれぞれの蛍光値を  $\beta$ -actin の蛍光値で割った値から平均値を算出し、未処理 ( Control ) と比較した。 ( \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  )

これらの結果より、LMF 処理では GLUT1 発現抑制による細胞へのグルコース流入の抑制と LDHA 発現抑制による乳酸生成の抑制が予想された。また LMF 処理によって PDHB の発現は変わらないものの PDHB を阻害する PDK1 の発現が低下し、結果的に PDHB の活性が上がることを考えられた。そこで、これらに関連する代謝物の測定を試みた。その結果、HT1080 細胞および HCT116 細胞において、LMF を処理した際の細胞グルコース取り込み量を測定したところ、両細胞ともに、LMF の処理濃度に依存した低下が確認された ( 図 5 )。

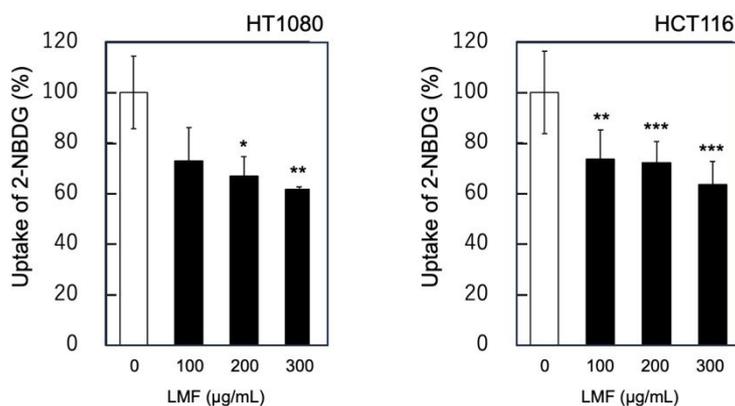


図 5 LMF 処理による HT1080 細胞と HCT116 細胞のグルコース取り込み量の変化

HCT116 細胞および HT1080 細胞を LMF 単独処理で 96 時間処理し、Control 細胞に取り込まれた 2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-Dglucose ( 2-NBDG ) の蛍光値をもとにグルコース取り込み量を評価した。 ( \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$  )

また同様に乳酸産生量について調べた結果、両細胞共に LMF の処理濃度に依存した乳酸産生量の低下が確認された (図 6)。

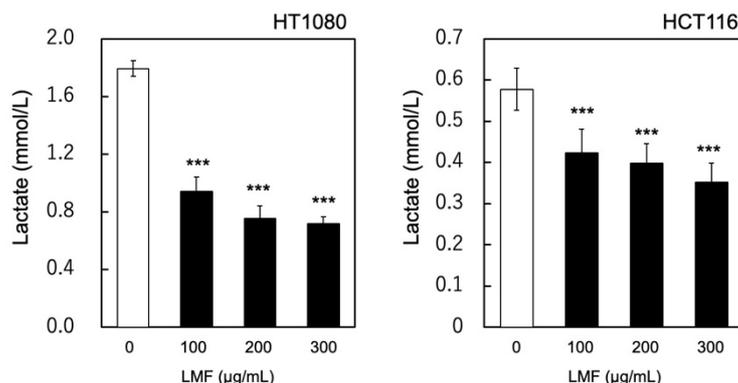


図 6 LMF 処理による HT1080 細胞と HCT116 細胞の乳酸産生量の変化  
HT1080 細胞および HCT116 細胞を 96 時間培養し、培養上清中の乳酸量を Lactate Assay Kit WST (同仁化学) により測定した。(\*\*\*:  $p < 0.001$ )

この乳酸産生量に関しては HT1080 細胞においてより強い抑制効果が見られた。LMF を処理した際の細胞内アセチル CoA の濃度については、HT1080 細胞および HCT116 細胞ともに、アセチル CoA 濃度上昇が確認できた。LMF 処理によるアセチル CoA 濃度の上昇は HT1080 細胞で顕著であった (図 7)。これらの HT1080 細胞における LMF の強い効果が、LMF 高感受性の理由の一因と考えられた。

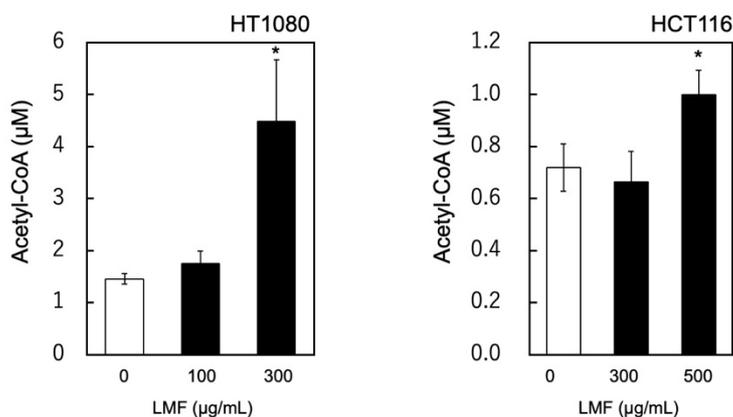


図 7 LMF 処理による HT1080 細胞と HCT116 細胞中のアセチル CoA 量の変化  
HT1080 細胞および HCT116 細胞を 96 時間培養し、細胞中の乳酸量を LC/MS/MS により測定した。( \*:  $p < 0.05$  )

本研究の代謝リプログラミング検定系により、LMF は細胞の代謝が非がん細胞の状態から乖離したがん細胞において、より強い抑制効果を示すことが明らかとなった。特に解糖系から乳酸を生成する代謝活性の高いがん細胞ほど LMF の抑制を強く受けていることが確認され、代謝リプログラミングをターゲットとした抗がん効果であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogawa Mizuki, Uono Miyako, Teruya Kiichiro, Uehara Norihisa, Katakura Yoshinori	4. 巻 13
2. 論文標題 Exosomes Derived from Fisetin-Treated Keratinocytes Mediate Hair Growth Promotion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2087 ~ 2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu13062087	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 -

1. 著者名 Hamasaki Takeki, Kashiwagi Taichi, Komatsu Takaaki, Kabayama Shigeru, Nakamichi Noboru, Teruya Kiichiro, Shirahata Sanetaka	4. 巻 9
2. 論文標題 A new colorimetric method for determining antioxidant levels using 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate (DBNBS)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 101797 ~ 101797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2022.101797	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 立石 ななえ、尾崎 健、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 酵素消化低分子化フコイダン抽出物ががん細胞の糖代謝に及ぼす効果
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有馬 樹彦、重枝 日菜子、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 皮膚における酵素消化低分子化フコイダン抽出物の機能性解明とその評価
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 日向子、木下 将人、大友 剛、徳丸 浩一郎、照屋輝一郎
2. 発表標題 筋肉細胞に及ぼす発酵乳ケフィアの効果
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国・関西支部 2021年度合同鹿児島大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 真奈、徳永 佐和、江藤 博、照屋 輝一郎
2. 発表標題 がん幹細胞に対する酵素消化低分子化フコイダン抽出物の効果
3. 学会等名 2020年度 日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部 合同大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------