

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19931

研究課題名(和文)肺扁平上皮癌におけるグルタミン代謝依存性の解析と治療法の開発

研究課題名(英文) Exploration of targeting glutaminolysis as an anticancer strategy in lung squamous cell carcinoma

研究代表者

佐藤 征二郎 (Sato, Seijiro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40646931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン(Glu)抑制培地では、肺扁平上皮癌6細胞株のうち、5つの細胞株(Sq-1、LK-2、LC-1/sq、EBC-1、RERF-LC-A1)で細胞増殖が抑えられた。一方、QG56細胞株ではほとんど細胞増殖抑制はなかった。各細胞株におけるグルタミンナーゼ1(GLS1)とグルタミンナーゼ2(GLS2)のmRNA発現を調べてみると、相対的GLS1 mRNAレベルはGLS2の発現レベルと比較して全細胞株で高発現していた。そのため、GLS1が肺扁平上皮癌細胞株のGlu分解に重要な役割を果たしているかと推測した。

研究成果の概要(英文)：Five of six lung squamous cell carcinoma cell lines exhibited glutamine-dependence. The extent of dependence was correlated with the mRNA levels of GLS1/GLS2. The proliferation of Sq-1, LK-2, LC-1/sq, EBC-1 and RERF-LCA1 cells was significantly decreased in Gln-depleted medium. In contrast, no significant inhibition of cell proliferation was observed in the QG56 cell line at either 72 or 120 h. When mRNA expression ratio of GLS1/GLS2 is essential for Gln dependence in lung squamous cell carcinoma cell lines, the relative mRNA level of GLS1 was markedly higher than that of GLS2 in all cell lines. We found that GLS1 may be also essential to glutaminolysis in lung squamous cell carcinoma cell lines.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：グルタミン代謝 肺扁平上皮癌 グルタミンナーゼ1 グルタミンナーゼ2

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞は解糖系を亢進させ増殖や転移に必要なエネルギーを産生している (Warburg 効果)。また、グルタミンの選択的消費の亢進も以前より知られていた。グルタミンをグルタミン酸に変換する酵素には腎に発現する腎型グルタミナーゼ：グルタミナーゼ 1 (Gls1) と肝に発現する肝型グルタミナーゼ：グルタミナーゼ 2 (Gls2) がある。近年、Gls1 発現亢進が c-myc により (Nature 458:762-765, 2010)、Gls2 が p53 により発現誘導され (PNAS 107:7461-7466, 2010)、がん細胞において対照的な作用をすることが明らかとなった。一方、がん細胞において酸化ストレスに反応する keap1/Nrf2 システムの活性化が、糖やグルタミンの代謝を変化させ、増殖シグナルの増強をもたらすことが明らかとなった (Cancer Cell 22:66-79, 2012)。(2) mTORC1 活性化とグルタミン代謝との関連も注目されている (Molecular Cell 47, 349-358, 2012)

### 2. 研究の目的

肺扁平上皮癌 6 株の細胞増殖における グルタミン代謝依存性 について解析すると同時に、グルタミン代謝依存性と TP53 および keap1/Nrf2 遺伝子の異常の関連を解析する。グルタミン代謝に重要な Gls1 および Gls2 発現とグルタミン代謝依存性との関連を解析する。更には、in vivo および in vitro において Gls1 を阻害剤による癌増殖抑制効果 を解析し、Gls1 が標的分子となりうるかを明らかにする。更には、グルタミン代謝依存性およびその阻害効果と mTORC1 活性の関連について解析評価する。

### 3. 研究の方法

(1) 肺扁平上皮癌 6 株におけるグルタミン依存性の解析：

細胞株をグルタミン除去した培地で培養し、細胞増殖能およびアポトーシスを MTT アッセイおよびフローサイトメーターで解析する。

(2) 腎型グルタミナーゼ (Gls1) と肝型グルタミナーゼ (Gls2) の mRNA 発現およびタンパク発現解析：

Gls1 および Gls2 の発現を real-time PCR で検討する。

(3) 肺扁平上皮癌細胞株における mTORC1 活性化とグルタミン依存性の関連：

各細胞株より、フォスファターゼ阻害剤を加えた溶液で蛋白を抽出し、mTORC1 の下流シグナルである SK6 および S6 のリン酸化タンパク抗体を用いて、各細胞株における mTORC1 の活性化の状態を調べて、グルタミン依存性との関連が

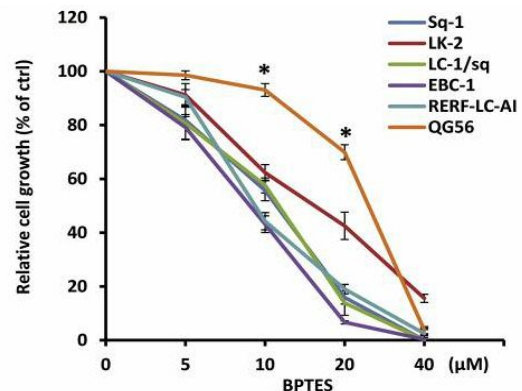
あるか評価する。

### 4. 研究成果

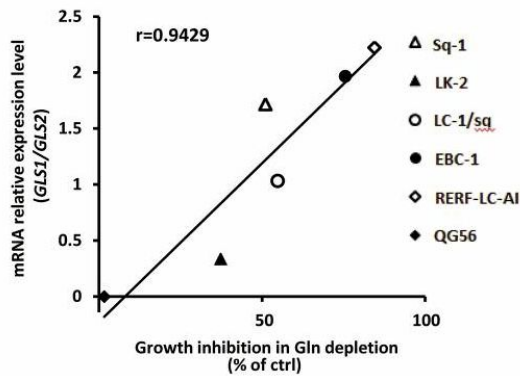
(1) 6 つの肺扁平上皮細胞癌細胞株を、完全またはグルタミン枯渇培地中で 120 時間まで培養した。Sq-1、LK-2、LC-1 / sq、EBC-1 および RERF-LCAI 細胞の増殖は、Gln 枯渇培地で有意に減少した ( $p < 0.05$ )。EBC-1 細胞株および RERF-LC-AI 細胞株において、細胞増殖は 72 時間後に 50% 以上、120 時間後に 70% 阻害された。Sq-1、LK-2 および LC-1 / sq 細胞株は、72 時間後に 30-47% 増殖抑制を示し、120 時間後には 47~62% の増殖抑制を示した。この研究では、SQ-1、LK-2 および LC-1 / sq は中間レベルで Gln 依存性を有すると考えられたが、EBC-1 および RERF-LC-AI は高度に Gln 依存性であると考えられた。一方、QG56 細胞株においては細胞増殖の有意な阻害は、72 時間または 120 時間のいずれかで観察されなかった。したがって、この細胞系は Gln 非依存性であると考えられた。

(2) GLS1 の相対 mRNA レベルは、QG56 を除いて、すべての細胞株において GLS2 の mRNA レベルよりも顕著に高かった。したがって、我々は、GLS1 が肺扁平上皮細胞癌細胞系におけるグルタミン分解にも必須であるかもしれないと仮説した。

肺扁平上皮細胞の増殖に対する GLS1 の効果を、次に GLS1-特異的なインヒビターである BPTES を用いて検討した。細胞株に、異なる濃度の BPTES (0, 5, 10, 20 および 40  $\mu\text{M}$ ) を 5 日間投与した。Gln 依存性細胞株 RERF-LC-AI および EBC-1 の増殖は強く阻害されたが、Gln 非依存性細胞株、QG56 において、細胞増殖の阻害は有意に RERF-LC-AI および EBC-1 株より少なかった。



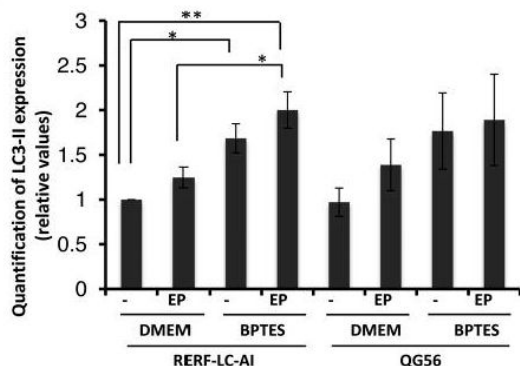
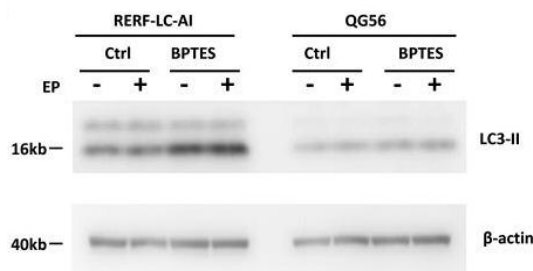
GLS1 mRNA の相対的発現が EBC-1 および QG56 細胞株においてほぼ等しいことは興味深い、Gln 依存レベルは非常に異なっていた。この現象を調べるために、肺扁平上皮癌細胞株における GLS1 / GLS2 の mRNA 発現率を評価したところ、GLS1 / GLS2 比が Gln 依存性と強く相関することが明らかになった



一方、Gln 非依存性細胞株 QG56 における LC3-II の蓄積に統計的に有意な差はなかった。BPTES による治療はまた、RERF-LC-AI における LC3-II 蓄積を増加させたが、QG56 細胞では増加しなかった。これらのデータは、グルタミン分解の阻害が Gln 依存性肺扁平上皮細胞癌細胞系における自食作用を増加させることを示す結果となった。

(3) グルタミン酸分解を阻害することにより Gln 依存性肺扁平上皮細胞癌細胞株における mTORC1 経路の阻害効果を確認した後、我々は、これらの条件下でこの細胞株においてオートファジーが活性化されたかどうかを調べた。

LC3-II のレベルは、オートファゴソーム膜との会合により、オートファゴソーム形成と有意に相関し、したがって、オートファジー活性の指標として一般に使用される。Gln 依存性細胞株 RERF-LC-AI は、Gln 枯渇培地中で培養した場合、



LC3-II 蓄積の増加を示した。

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 1 件)  
XULU YE, QILIANG ZHOU, YOSHIFUMI  
MATSUMOTO, MASATO MORIYAMA, SHUN  
KAGEYAMA,  
MASAAKI KOMATSU, SEIJIRO SATOH,  
MASANORI TSUCHIDA and YASUO SAIJO  
Anticancer Research.  
2016;36:6021-6030  
doi:10.21873/anticanres.11191

[学会発表](計 件)  
[図書](計 件)  
[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:  
取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 征二郎 (SATO, Seijiro)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・  
呼吸循環外科学・助教  
研究者番号: 40646931

(2) 研究分担者

周 啓亮 (ZHOU, Qiliang)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・  
腫瘍内科学分野  
研究者番号: 10770232

(3) 連携研究者

西條 康夫 (SAIJO, Yasuo)  
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・  
腫瘍内科学分野  
研究者番号: 10270828

(4) 研究協力者  
YE XULU