

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10594

研究課題名(和文) 初代培養と糖尿病マウスにおける膵癌細胞の増殖進展に対するAdipoRonの効果

研究課題名(英文) Effect of AdipoRon on the growth of pancreatic cancer cells in primary culture and obese prediabetic mice.

研究代表者

竹永 啓三 (Takenaga, Keizo)

千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・特任研究員

研究者番号：80260256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗糖尿病薬AdipoRonが膵癌細胞株の細胞死を惹起し抗腫瘍効果を示すという発見を基盤に、手術材料から膵癌初代培養細胞を細胞塊(スフェロイド)として得てAdipoRonの効果を検討した結果、初代培養細胞を得ることができた4例全例において細胞死(ネクローシス)の誘導が観察された。一方、AdipoRonが糖尿病の症状を軽減し、かつ膵癌の腫瘍増殖を抑制するかどうかの可能性を、マウス膵癌細胞株を同所移植した高脂肪食誘導肥満前糖尿病マウスモデル(B6J-D10マウス)を用いて検討し、糖尿病症状の軽減そのものよりも肥満の解消の方が膵癌増殖の抑制やAdipoRonの抗腫瘍効果に重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポネクチン受容体に結合し抗糖尿病作用を示す薬剤として見出されたAdipoRonが膵癌患者由来の初代スフェロイド培養系において殺細胞効果を示すことが確認され、将来の治療に資する可能性がある。また、前糖尿病および肥満が膵癌の増殖、進展に影響するかどうかを、またそれに対してAdipoRon投与がどのような効果を示すかを肥満前糖尿病モデルマウスで検証し、糖尿病症状の軽減そのものよりも肥満の解消の方が膵癌増殖の抑制やAdipoRonの抗腫瘍効果に重要であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Based on the finding that the antidiabetic drug AdipoRon induced cell death of human pancreatic cancer cells and reduced tumor growth in vivo, we examined the effect of AdipoRon on cell death in primary spheroid culture of pancreatic cancer cells isolated from pancreatic cancer patients. We found that AdipoRon induced necrotic cell death of pancreatic cancer cells in successfully established primary spheroid culture. We also examined the effect of AdipoRon on tumor growth of orthotopically implanted mouse pancreatic cancer cells in high-fat diet-induced obese prediabetic mouse model (B6J-D10). We found that amelioration of obese rather than that of diabetic condition was important for suppression of tumor growth as well as the antitumor effect of AdipoRon.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：AdipoRon 膵癌 糖尿病 肥満 腫瘍増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治性がんの最たるもので、予後も悪く、種々の治療法も奏効し難い。そのため、新たな膵癌に対する抗がん剤の開発や発見が緊急の課題である。我々は、マウスやヒト膵癌細胞の増殖抑制や細胞死を惹起する効果的な物質を探索している過程で、東京大学・門脇孝博士らが初めて見出した肥満や2型糖尿病を改善する抗糖尿病低分子化合物 AdipoRon が、ヒト膵癌細胞株 MIA PaCa-2 や Panc-1 の細胞周期を G0/G1 で停止させ、さらには処理 24 時間後までに細胞死を引き起こすことを最近見出した。AdipoRon はアディポネクチン受容体 (AdipoR1 と AdipoR2) に結合し、AMPK や PPAR- シグナル経路を活性化することが報告されている。我々も AdipoRon を処理した数種類の膵癌細胞株でこれらのシグナル経路を調べたところいずれも活性化が認められるが、興味深いことにミトコンドリア由来のスーパーオキシド (以下 ROS と記す) が多量に産生され、しかも AdipoRon による細胞死が抗酸化剤 MitoTEMPO により rescue されることを見出している。しかし、これらの基礎実験はあくまで培養細胞での観察であり、ヒト膵癌初代培養細胞に対して同様に増殖抑制や細胞死を導くかどうかは全く不明である。また最近では、初代細胞を用いた場合でも、原発巣組織から分離し単細胞として培養する従来の方法では、がん細胞が増殖しない、本来の性質や特性を失うといった問題点があり、初代細胞を小細胞塊 (スフェロイド) として培養することが薬効を調べる上で重要であることが指摘されている。我々はまた、MIA PaCa-2 細胞を移植したヌードマウスへ AdipoRon を隔日経口投与すると、体重減少などの副作用を認めずに腫瘍増殖が抑制されることを見出している。この知見は AdipoRon の膵癌治療への応用の可能性を示唆する。

一方、膵癌の発生・増殖・進展の危険因子として糖尿病がある可能性が疫学的調査によって指摘されている。膵癌における糖尿病の発症は随伴性の二次性糖尿病である可能性も否定できないが、長期の糖尿病罹患歴を持つ患者では膵癌の発症が多いという報告もある。この機序はまだ明確には解明されていないが、高血糖が膵 B 細胞を刺激し過剰分泌されたインスリンが細胞増殖を促進して癌化に至るとの説がある。実際、高インスリン血漿が肥満や高血糖とは独立してマウス移植乳癌細胞の増殖や転移を促進することや、膵癌細胞の増殖をインスリンが促進することが報告されている。また、高血糖が膵癌の転移を促進するとの報告もある。しかし、前糖尿病が膵癌細胞の増殖に及ぼす影響の検討は未だ明確な報告はない。また、もし糖尿病が膵癌の増殖・進展を促進するのであれば、AdipoRon 投与により、糖尿病の改善とともに膵癌細胞の増殖抑制、細胞死誘導という相加的あるいは相乗的な治療効果が推測される。しかしこれらの観点からなされた報告もない。

2. 研究の目的

ヒト膵癌組織からの初代スフェロイド細胞を用いて AdipoRon の効果とその機序を検討する。さらに、肥満、糖尿病が膵癌細胞の増殖に及ぼす影響について前糖尿病モデルマウスに同所移植した膵癌細胞で解析する。同時に AdipoRon 投与の効果を検討する。

3. 研究の方法

- 膵癌初代細胞培養：膵癌組織をハサミで細切し、Liberase DH で 37℃、2 時間処理した。遠心分離後、細胞をハンクス平衡塩溶液に懸濁し 100 μm 孔のストレイナーに通した。細胞を培地に懸濁し、96 ウェルプレートに播いた。
- AdipoR 発現解析：AdipoR1 および AdipoR2 の発現は RT-qPCR で解析した。
- 細胞死の計測：スフェロイドを FITC 標識 EpiCAM 抗体と Propidium iodide (PI) で染色した後、EpiCAM 陽性細胞中の PI 陽性細胞数の割合を計測した。
- D10 マウスの作成：4 週令の C57BL/6(B6) マウスに 60 Kcal% の高脂肪食とコントロールとして 10 Kcal% の低脂肪食の給餌を行ない 16 週令まで飼育することで作成した。
- 膵癌細胞株の同所移植：ルシフェラーゼ遺伝子を導入したマウス膵癌細胞株 Panc02-Luc-ZsGreen を 50% Matrigel に懸濁した後、麻酔下のマウスの膵臓に移植した。
- AdipoRon の投与：DMSO/PEG300/Tween80/PBS 溶液に懸濁した AdipoRon (3 mg/kg または 30 mg/kg) を腹腔内に投与した。
- グルコース負荷試験：マウスを 16 時間絶食させた後、腹腔内に 1g/kg のグルコースを投与した。経時的 (0, 15, 30, 60, 90, 120 分後) に血中グルコース濃度を実験動物用グルコース測定装置を用いて測定した。
- 血中インスリン濃度の測定：マウスを 16 時間絶食させた後、血中グルコース濃度と血中インスリン濃度を計測し、FOMA-IR を算出した。
- 腫瘍増殖の測定：IVIS in vivo imaging system を用いた計測を行った。また、腫瘍を摘出した後に重量を測定した。

4. 研究成果

1. 初代培養細胞を用いた検討

AdipoRon がヒト膵癌細胞株の細胞死を惹起し、動物実験でも抗腫瘍効果を示すことを見出した。この知見をさらに発展させるために、手術で摘出された膵臓癌から膵臓癌初代培養細胞を細胞塊 (スフェロイド) として得て、AdipoRon の効果を検討した。その結果、組織の線維化が顕著な症例が多く成功例が少ないが、手術検体 8 例のうち 4 例で初代培養細胞を得ることができた。

まず、これらの初代培養細胞におけるアディポネクチン受容体 (AdipoR1 と AdipoR2) の発現を qRT-PCR で調べたところ、いずれも発現されていることが判った。そこで、AdipoRon を作用させ、細胞死を FITC-EpiCAM 陽性細胞中の PI 陽性細胞の割合で算出した。その結果、全例において細胞死の誘導が観察された。この細胞死にミトコンドリア由来活性酸素が関与するかどうかを検討するために、AdipoRon とミトコンドリア活性酸素のスキャベンジャーである MitoTEMPO を同時に作用させたところ細胞死が減弱した。このことから、ミトコンドリア由来 ROS の細胞死への関与が示唆された。この時の細胞死の様式は、細胞形態学的にはネクローシスであることが推察された。

2. 肥満前糖尿病マウスを用いた検討

肥満と糖尿病また糖尿病と膵癌発生には密接な関連があることが示唆されていることから、AdipoRon が糖尿病の症状を軽減し、かつ膵癌の腫瘍増殖を抑制するかどうかの可能性を検討した。まず、ルシフェラーゼ発現マウス膵臓癌細胞を、Panc02 細胞に pHIV-Luc-ZsGreen をレンチウイルスで感染させることで樹立した (Panc02-Luc-ZsGreen 細胞)。次に、肥満前 2 型糖尿病マウスモデル B6J-D10 の作出のために、4 週令の C57BL/6 マウスに 60 Kcal% の高脂肪食とコントロールとして 10 Kcal% の低脂肪食の給餌を行ない、経時的に体重測定を行うとともに、約 3 ヶ月後 (16 週令) にグルコース負荷試験による血糖値の変動と血中インスリン濃度の測定を行った。その結果、高脂肪食群において体重が約 180% まで増加し、糖尿病の症状 (高血糖、インスリン抵抗性) も出ていることを確認した。そこで、Panc02-Luc-ZsGreen 細胞を高脂肪食群とコントロール群の膵臓に同所移植し、腫瘍増殖を IVIS in vivo imaging と腫瘍重量の計測を行うことで調べたところ、高脂肪食群において有意に腫瘍増殖速度が速いことが判った。次に、Panc02 細胞の細胞死を誘導しない低濃度 (3mg/kg) の AdipoRon を、Panc02 細胞を同所移植した高脂肪食群のマウスに腹腔内投与し、糖尿病の症状と腫瘍増殖を評価した。その結果、AdipoRon 投与により若干の体重減少と糖尿病の症状の緩和が認められたが、腫瘍増殖にはほとんど影響しないことが判った。従って、糖尿病と腫瘍増殖には明確な相関がないことが推察された。

これらの実験結果から、肥満の軽減が膵癌の腫瘍増殖抑制に重要であり、そのような状況下では高濃度 AdipoRon による抗腫瘍効果がより発揮されるのではないかと推察された。そこで、D10 マウスに Panc02 細胞を同所移植した後に高脂肪食給餌群と低脂肪食給餌群に分け、それぞれの群をさらに対照群と高濃度 AdipoRon (30 mg/kg) 投与群に分け腫瘍増殖を観察した。その結果、3 週間の実験期間中に、高脂肪食給餌群では肥満が維持されたが、低脂肪食給餌群では約 16% の体重減少が観察され、有意ではないが腫瘍増殖の遅延が認められた (Mann-Whitney U-test で $0.05 < P < 0.1$)。興味深いことに、AdipoRon 投与によって、高脂肪食給餌群においては腫瘍増殖に有意な抑制は認められなかったが、低脂肪食給餌群においては腫瘍増殖抑制傾向が認められた。これらの結果から、Panc02 細胞移植 D10 モデルマウスでは、肥満の軽減が膵癌の腫瘍増殖抑制さらには AdipoRon の抗腫瘍効果にとって重要な要因になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Akimoto M, Maruyama R, Kawabata Y, Tajima Y, Takenaga K. Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis. *Cell Death Dis.* 2018 Jul 23;9(8):804. doi: 10.1038/s41419-018-0851-z.

[学会発表] (計 1 件)

1. Akimoto M, Takenaga K. AdipoRon induces cell death of pancreatic cancer cells through triggering Ca²⁺ uptake via mitochondrial Ca²⁺ uniporter. 第 76 回日本癌学会学術総会. 2017.9.28. (パシフィコ横浜)

[図書] (計 0 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:

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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。