

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08429

研究課題名(和文) 脂肪酸代謝を標的にした新たな膵癌治療法開発へのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to developing of new pancreatic cancer therapeutic method focused on fatty acid metabolism

研究代表者

西 弘二(Nishi, Koji)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：00398249

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)：本研究は、脂質代謝を標的とした新規膵がん治療法の開発を目的として行われた。我々はこれまでに、膵がん細胞内の脂肪酸合成の阻害が最も細胞死を誘導することを見出した。しかし、膵がん細胞株の1つであるPANC-1は脂肪酸が枯渇していても細胞死が誘導されないことを見出した。このPANC-1は、グルタミン欠損培地やグルタミン代謝阻害であるBPES存在下で著しい生存率の低下を示した。さらに、脂肪酸合成阻害による効果が、BPESとの併用で増強されたことから、脂肪酸合成阻害時の代謝経路をグルタミン代謝が救済しており、重要な標的になることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは最も予後の悪い癌種であり、新たな治療法の開発が急務となっている。本研究では、膵がん治療の新たな標的として、細胞内の脂肪酸合成阻害効果に着目した。しかし、膵がん細胞の中には、脂肪酸が枯渇しても生存を続けるものがあることを見出した。興味深いことに、培養液からグルタミンというアミノ酸の一種を除去すると、著しい細胞生存率の低下が観察された。これらの知見は、膵がん治療を行う上で、脂肪酸合成阻害が有効な手段であるだけでなく、グルタミンというアミノ酸が膵がんが生存する上で重要な栄養素であり、治療標的となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a novel treatment for pancreatic cancer targeting lipid metabolism. We have found that inhibition of fatty acid synthesis in pancreatic cancer cells induced cell death. However, PANC-1, one of the pancreatic cancer cell lines, was found not to induce cell death even when fatty acids were depleted. However, PANC-1 showed a remarkable decrease in the survival rate in the presence of a glutamine-deficient medium or BPES, which is a glutamine metabolism inhibitor. Furthermore, since the effect of fatty acid synthesis inhibition was enhanced by the combined use with BPES, it was revealed that glutamine metabolism rescues the metabolic pathway during fatty acid synthesis inhibition and becomes an important target.

研究分野：薬物動態学

キーワード：膵がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは最も予後の悪い固形がんの 1 つであり、日本国内でも膵がんによる死亡数は男女ともに年々増加傾向にある。膵がんの化学療法には、従来のゲムシタピン単独療法に加え、5-FU、イリノテカン、レボホリナートおよびオキサリプラチンの併用療法 (FOLFILINOX) やアルブミン-パクリタキセル製剤療法が標準治療として用いられ始めたが、その奏効率や 5 年生存率は他のがん腫に比べて著しく低い。そのため、新規治療薬の開発が急務とされているが、未だ有効なものは見出されていない。

がん細胞のような増殖速度が非常に速い細胞は、正常細胞と比較して、脂質に対する需要が極めて高い。これは、増殖にともなう物理的需要のみならず、エネルギーとしての需要も亢進しているためでもある。これまでに、様々な脂質代謝 (脂肪酸合成およびコレステロール合成) の阻害剤や、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α および γ 作動薬が、がん細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することが報告されている。興味深いことに、我々はこれまでに、上記の代表的脂質代謝阻害剤を用いた膵がん細胞の増殖抑制効果についての検討から、脂肪酸合成阻害剤が最も効果的であり、この効果が脂肪酸添加により抑制されたことを見出した。これは、脂肪酸合成阻害が、脂肪酸を減少させ、細胞死誘導や増殖抑制を発揮することにより、新たな治療標的となり得るだけでなく、直接的あるいは間接的に膵がん細胞内の環境を大きく変化させ、さらに新たな治療標的を出現させている可能性があることを意味している。そこで本研究では、脂肪酸合成阻害が誘導する細胞死メカニズムの解明を目的に各種検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、膵がん治療の新しい標的探索を目的として、脂肪酸合成酵素の 1 つである Acetyl CoA carboxylase (ACC) の阻害による細胞死誘導メカニズムを明らかにするために各種検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

ヒト膵がん細胞として、AsPC1、BxPC3 および PANC1 を American type culture collection より購入して使用した。培養は AsPC-1 および BxPC3 については RPMI1604 を、PANC1 については Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) をそれぞれ 10% ウシ胎児血清存在下および 5% CO₂ 下で行った。脂肪酸合成酵素 ACC 阻害剤、グルタミナーゼ阻害剤および解糖系阻害剤として、5-(Tetradecyloxy)-2-furoic acid (TOFA)、Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES) および 2-Deoxyglucose (2-DG) をシグマ社より購入した。

(2) アネキシン V 染色細胞の評価

アポトーシス細胞および生細胞は、MUSE Annexin V and Dead Cell kit (Millipore; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) および MUSE cell analyzer を用いて判別した。細胞を、6 ウェルプレートに 2.0×10^5 細胞/ウェルとなるように播種し、12 時間後に細胞を TOFA と一緒に、ウシ胎児血清を含まない培地でインキュベートした。次に、PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理し、MUSE Annexin V and Dead Cell kit とよく混合したものを測定した。

(3) カスパーゼ-3 活性の評価

カスパーゼ-3 活性は、カスパーゼ-3 / CRP32 フルオロメトリックアッセイキット (Biovision、Mountain View、CA、USA) を使用して測定した。細胞を、6 ウェルプレートに 2.0×10^5 細胞/ウェルとなるように播種し、12 時間後に細胞を TOFA と一緒に、ウシ胎仔血清を含まない培地でインキュベートした後、細胞をトリプシン処理し、細胞溶解バッファーと混合して、氷上で 10 分間インキュベートした。次に、カスパーゼ-3 の基質、N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin を細胞溶液に加え、37 °C で 2 時間インキュベートした。それぞれのサンプルは、励起波長 400 nm、蛍光波長 505 nm で測定し、コントロール細胞に対する蛍光強度として分析した。

(4) 細胞増殖アッセイ

生細胞数の評価は、トリパンブルーを用いて行った。6 well プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように各細胞を播種し、一晚培養した。その後、24 ~ 72 時間、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養し、トリパンブルーで染色し生細胞および死細胞を計測した。

4. 研究成果

(1) TOFA によるアポトーシス誘導効果

ACC 阻害剤である TOFA によるヒト膵がん細胞株へのアポトーシス誘導効果について検討した (Fig. 1A)。TOFA は AsPC1 および BxPC3 に対しては、濃度依存的にアネキシン V に陽性を示す細胞の割合を増加させた。その一方、PANC1 についてはそのような効果は見られなかった。また TOFA は AsPC1 および BxPC3 に対して時間依存的にアネキシン V に陽性を示す細胞の割合を増加させたものの、PANC1 においてはそのような現象は観察されなかった (Fig. 1B)。

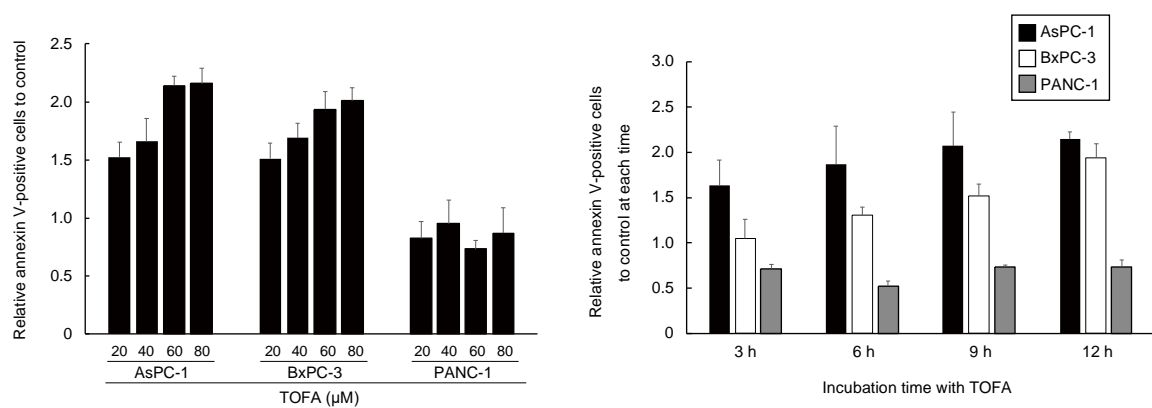


Figure 1 TOFA による濃度 (A) および時間依存的 (B) アネキシン V 陽性細胞増加効果

次にアポトーシス誘導時に活性の増強が見られるカスパーゼ-3 の活性を評価した。その結果、アネキシン V についての検討結果同様、PANC1 においては有意なカスパーゼ-3 の活性増強は観察されなかった (Fig. 2)。

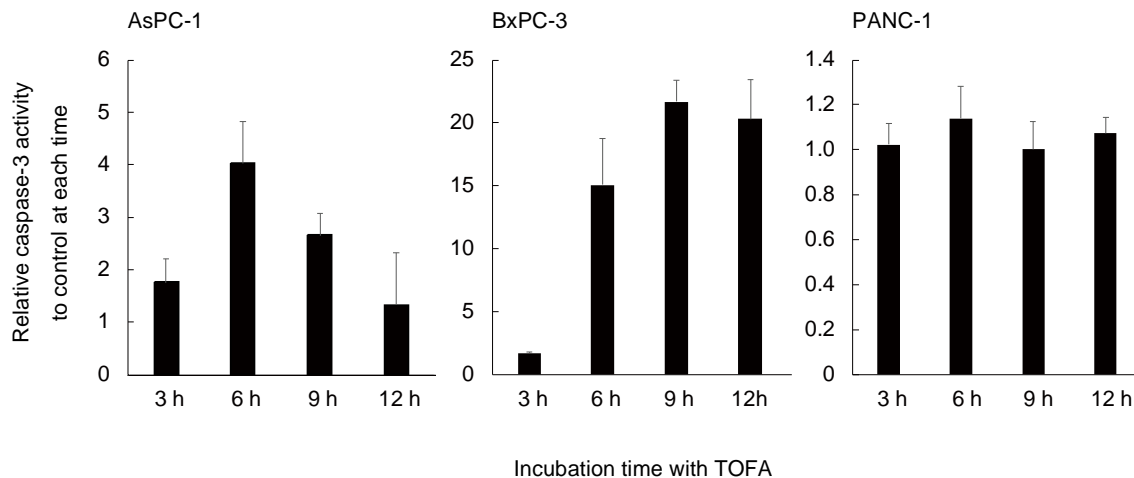


Figure 2 TOFA によるカスパーゼ-3 活性化評価

このように AsPC1 および BxPC3 に対する TOFA の効果が脂肪酸合成を阻害したことによる細胞内脂肪酸量の減少によるものであるかどうか検討するために、パルミチン酸添加の影響について検討した。その結果、パルミチン酸添加により、TOFA の効果は有意に抑制された。この結果から、TOFA によるアポトーシス誘導効果は、脂肪酸の減少によるものであることが明らかとなった。一方、PANC1 に関しては、TOFA による ACC 阻害効果が観察されなかったことから、ACC 発現量が多い、または脂肪酸等の栄養飢餓に対する耐性を有する可能性が考えられた。ACC の発現量に関しては、AsPC1 や BxPC3 と比べて、むしろ ACC 発現量は低いことが明らかとなった。さらに、これまでに PANC1 は栄養飢餓に対して耐性を有することが報告されていることから、TOFA の効果が観察されなかったことには PANC1 の栄養飢餓耐性が関与しているかも知れない。事実、最近の報告では膵がん細胞は、細胞内代謝を環境適応させ、栄養飢餓に耐性を有している可能性が報告されている。そのため、PANC1 の栄養飢餓耐性を明らかにすることが膵がんの新しい治療法開発につながると考えられた。

(2) 細胞増殖における血清、アミノ酸およびグルコースの影響

細胞培養時には、一般的には 10% 程度のウシ胎児血清が用いられる。血清には、脂質、アミノ酸、ビタミン、タンパク質など多くの栄養素が含まれている。そこで、PANC1 細胞の増殖に関して、血清がどの程度寄与しているか検討した。その結果、栄養飢餓耐性である PANC1 において、無血清培地では有意な細胞増殖の低下が観察された。そこで、血清に含まれるアミノ酸がどの程度関与しているかを検討するために、透析処理された血清(アミノ酸やビタミンなどの低分子が除去された血清:アミノ酸除去血清)を用いて同様の検討を行った結果、通常血清と有意な差は観察されなかった。また、PANC1 の増殖における培地中のグルコース濃度の影響について検討を行った結果、低濃度および高濃度グルコースいずれにおいても有意な差は観察されなかった。

(3) 細胞増殖におけるグルタミンの影響

アミノ酸の中でもグルタミンは、細胞内の栄養状態を保つために非常に重要であることが知られており、オートファジーのような現象においてもキーとなる分子の一つである。そこで、

PANC1 の細胞増殖におけるグルタミンの影響について、グルタミン不含培地を用いて検討を行った。その結果、無血清、通常血清またはアミノ酸除去血清いずれを用いた場合も細胞増殖の抑制が観察された。これらの結果は、PANC1 の生存にグルタミンまたはグルタミン代謝が重要な役割を果たしていることを示唆している。そこで、グルタミンからグルタミン酸を産生するグルタミナーゼの阻害効果について検討した (Fig. 3)。その結果、グルコース除去の結果と同様、2-DG による解糖系阻害の効果は観察されなかった。また、グルタミン除去の結果と同様、BPTES はグルタミン除去と同等の効果を示した。興味深いことに、BPTES やグルタミン除去は、TOFA の効果を増強することが明らかとなった。グルタミン代謝により合成されるグルタミン代謝は細胞内の核酸合成やクエン酸回路に重要な代謝物であることはよく知られている。そのためこれらの結果から、PANC1 は通常は、グルタミンに依存した細胞増殖性を示しており、グルタミンを除去したことによりグルタミン代謝が阻害され、核酸代謝やクエン酸回路によるエネルギー産生が低下することにより増殖が抑制されることが示唆された。さらに、このときに PANC1 が初めて脂肪酸に依存するようになるために、TOFA がグルタミン代謝阻害時に細胞死誘導効果を発揮することが出来たものと思われる。

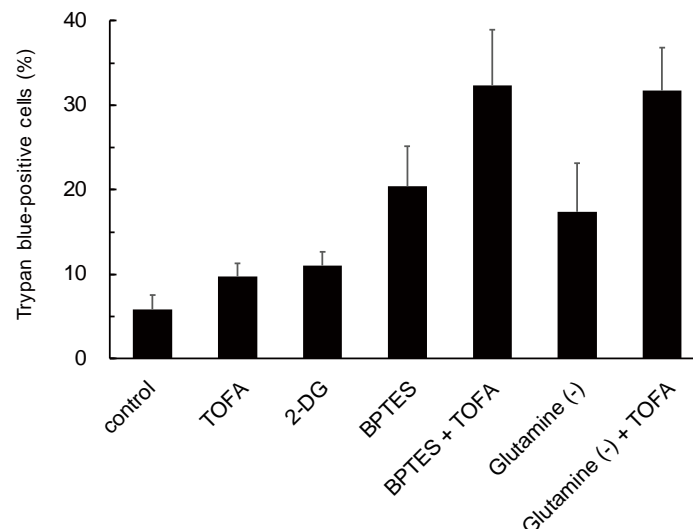


Figure 3 PANC1 の生存におけるグルタミン代謝の影響

本研究で得られた結果では、膵がん治療において脂肪酸合成阻害が有効である可能性が示唆された。しかし、一部の栄養飢餓耐性を有する腫瘍細胞においては、脂肪酸合成阻害だけでは不十分で、これに加えて、グルタミン代謝阻害を加えることで有効な効果を得られることが示唆された。今後は、グルタミン代謝阻害や脂肪酸合成阻害時の細胞内代謝を明らかにすることで、これらを標的にした新しい治療法の可能性を検討していく必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Nishi K, Suzuki M, Yamamoto N, Matsumoto A, Iwase Y, Yamasaki K, Otagiri M, Yumita N. | 4. 巻 38 |
| 2. 論文標題 Glutamine Deprivation Enhances Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor-induced Death of Human Pancreatic Cancer Cells. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Research | 6. 最初と最後の頁 6683-6689. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.13036 | 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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Koji Nishi, Mina Suzuki, Noriko Yamamoto, Yumiko Iwase, Nagahiko Yumita |
| 2. 発表標題 Involvement of Glutamine in Tolerance of Human Pancreatic Cancer Cell to Inhibition of Fatty Acid Synthesis |
| 3. 学会等名 American association of cancer research annual meeting（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西 弘二、大石あかね、神戸幹哉、布施雄也、岩瀬由未子、弓田長彦 |
| 2. 発表標題 ヒト膵癌細胞PANC-1の脂肪酸飢餓耐性におけるグルタミンの関与 |
| 3. 学会等名 日本生化学会年会 |
| 4. 発表年 2017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 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 岩瀬 由未子 (Iwase Yumiko) (00521882) | 横浜薬科大学・薬学部・准教授 (32723) | |

