

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10594

研究課題名(和文) 低酸素下胃癌細胞の脂肪酸代謝変容に着眼した新規薬物療法の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of novel therapeutic strategy focusing on fatty acid metabolism alteration of gastric cancer cells under hypoxia

研究代表者

能城 浩和 (Noshiro, Hirokazu)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：90301340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：2種類の胃癌細胞株(As9、MKN74)を用いてHIF-1 ノックダウン(KD)株およびコントロール(Sc)株を作製し、低酸素環境下におけるHIF-1 阻害による抗腫瘍効果、さらにパルミチン酸(PA)およびカルニチン付加による抗腫瘍効果増強を確認した。また、HIF-1 阻害剤であるYC-1でも、KD株と同様の結果が得られた。その際、活性酸素の増加傾向が確認された。これまでのin vitro実験結果から、HIF-1 が脂肪酸酸化の抑制およびROS制御の中心的因子であり、HIF-1 の阻害、さらに脂肪酸および低分子カルニチンを付加することで低酸素下アポトーシスを増強できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は低酸素環境下における癌の脂肪酸代謝に着目した独創的な胃癌薬物療法の確立を目指すものである。依然として仮説検証の実験中ではあるが、これまでの結果より、HIF-1 を阻害に加えて脂肪酸代謝を促進するパルミチン酸およびカルニチンを投与することによって抗腫瘍効果が増強されることを確認しており、今後の仮説検証に期待の持てるものとなっている。手術不能胃癌患者は経口接種困難な場合が多く、長期低栄養状態は癌悪液質を来し生命予後を悪化させる。将来的には、経静脈的に脂肪乳剤(脂肪酸含有)およびHIF-1 阻害薬+カルニチン併用療法が栄養改善と抗腫瘍効果を併せ持つ画期的胃癌治療薬となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：HIF-1 knockdown (KD) and control (Sc) cells were prepared using two types of gastric cancer cell lines (As9 and MKN74) by transfected technique. Antitumor effect by HIF-1 inhibition under hypoxic environment was confirmed. Moreover, additional of palmitic acid (PA) and carnitine enhanced antitumor effect. The HIF-1 inhibitor, YC-1 also showed similar results to the HIF-1 KD cells even when adding PA and carnitine. At that time, reactive oxygen species (ROS) increased in HIF-1 KD cells and cells treated by YC-1, and PA and carnitine tended to enhance ROS production. From our results of the in vitro experiments, HIF-1 is a central factor in the inhibition of fatty acid oxidation and ROS regulation, and inhibition of HIF-1 and addition of fatty acid and low molecular weight carnitine induce hypoxia-induced apoptosis.

研究分野：消化器外科

キーワード：HIF-1 活性酸素 脂肪酸合成 低酸素環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形癌内の低酸素環境は癌悪性度を増強する。低酸素誘導因子 (HIF-1) は低酸素環境 癌悪性度増強の中心的転写因子であり浸潤・転移能亢進・抗がん剤耐性に関与する一連の遺伝子群発現を低酸素依存性に誘導する。よって有効かつ副作用の無い HIF-1 阻害剤開発は高悪性度を有する低酸素領域癌に対する分子標的治療薬となる。近年、HIF-1 は低酸素環境下癌細胞のエネルギー代謝変容にも寄与している事が明らかになっている。われわれの研究グループはこれまでに胃癌細胞株 58As9 の HIF-1 ノックダウン (HIF-KD) 株が低酸素環境 (1%O₂) において過剰 ROS 産生によりアポトーシスを誘導することを明らかにし、さらに HIF-KD 株へのグルコース (G) + インスリン (I) 添加が G uptake 増強 ROS 産生増加 アポトーシス増強することを in vitro および in vivo で証明し、その機序を明らかにした (PLoS One. 2015, Sci Rep. 2017)。

今回、われわれは脂肪酸代謝変容に焦点をあて「低酸素環境下胃癌細胞を標的とした YC-1 plus 脂肪酸 (パルミチン酸: PA) + カルニチン併用療法の基礎的研究」を立案した。低酸素環境において 酸化は抑制されており、脂肪酸合成 lipogenesis へと代謝変容すること (Mol & Cell Oncol 2015) が知られている。近年、低酸素環境では HIF-1 による脂肪酸 酸化の直接的抑制効果が報告されている。低酸素下癌細胞における脂肪酸 酸化の抑制は「癌の Warburg 効果」と同様、電子伝達系で産生される過剰 ROS を抑える低酸素環境適応反応であり、HIF-1 はその中心的因子と推測した。以上より、我々は HIF-1 発現が抑制されることで低酸素下胃癌細胞に脂肪酸 酸化が強制作動される結果、過剰 ROS 産生を惹起し、アポトーシスを誘導するという治療仮説を想定した。さらに脂肪酸 (パルミチン酸: PA) および進行癌患者での不足が報告されている低分子カルニチン (Gastro-Intestinal Tumors 2015) を付加することで低酸素下アポトーシスをさらに増強できると推測した。

2. 研究の目的

腫瘍内に生じる低酸素環境は、癌エネルギー代謝変容に作用し、低酸素誘導因子 (HIF-1) がその中心的な役割を演じている。本研究の目的は、低酸素環境下胃癌細胞の脂肪酸代謝変容 (酸化抑制) に着目し、HIF-1 阻害剤 YC-1 (3-[5'-hydroxy methyl-2'-furyl]-1-benzylindazole) (分子量 304.4) 少量投与による低酸素環境下での強制的脂肪酸 酸化発動 過剰活性酸素 (ROS) 産生 アポトーシス誘導機序を立証すること、脂肪酸 (パルミチン酸: PA) および 酸化進行に必須であるカルニチンを付加することで YC-1 のアポトーシス誘導を増強する機序を明白にすること、ヌードマウス皮下腫瘍モデルにて低容量 YC-1 plus PA+カルニチン併用が低酸素下胃癌細胞を標的とした新規胃癌治療薬となることを立証すること、である。

3. 研究の方法

2 種類の胃癌細胞株 (58As9, MKN74) を用いて低濃度 YC-1 投与が低酸素環境 (1%O₂) での HIF-1 発現抑制 過剰 ROS 産生 アポトーシス誘導に作用するかを解析する。さらに PA+カルニチン付加が YC-1 の低酸素特異的アポトーシス誘導効果を増強するかにつき解析・検討する。
(具体的な方法)

・低濃度 YC-1 による低酸素特異的アポトーシス解析:

胃癌細胞株: 58As9, MKN74, HIF-1 ノックダウン (KD) 株 (58As9-KD, MKN74-KD) (10, 42) を常酸素 (20%O₂) および低酸素 (1%O₂) にて培養する。低濃度 YC-1 (10 μM) 処理 58As9, MKN74 が低酸素環境で HIF-1 発現を抑制し過剰 ROS 産生によるアポトーシスを惹起するか解析する。同時に常酸素環境では YC-1 (10 μM) によるアポトーシス効果はみられない事も確認する。アポトーシス positive control 株として 58As9-KD, MKN74-KD を使用する (10, 42)。アポトーシスは cleaved-caspase3/PURP 発現を Western blot (WB) にて評価する。ROS 産生量は ROS 解析キットを用い FACS にて定量解析する。

・パルミチン酸 (PA) + カルニチン付加によるアポトーシス増強効果についての解析:

58As9, MKN74 に PBS, YC-1 (10 μM) 単独、YC-1 plus PA+カルニチンを常・低酸素下で添加し、MTS 法にて cell viability を解析する。尚、PA および L-カルニチン濃度は 1 μM, 10 μM, 100 μM を設定し、最終的に至適有効濃度を決定する。YC-1 plus PA+カルニチンが YC-1 単独に比し、低酸素特異的な増殖抑制効果を増強するかを解析・立証する。さらにアポトーシス効果についても cleaved caspase3, cleaved PURP 発現を WB にて比較解析する。

・低濃度 YC-1 plus PA+カルニチン併用による脂肪酸代謝変容の立証:

細胞内アセチル CoA およびアシル CoA 濃度を測定する事により、YC-1 単独および YC-1 plus PA+カルニチン併用投与が低酸素下胃癌細胞株の脂肪酸 酸化を活性化することを立証する。

脂肪酸 酸化促進に寄与する遺伝子群 (ACS, CPT1, CPT2, CAD) の発現・機能解析を行う。

(具体的な方法)

・HIF-1 による ACS, CPT1, CPT2, CAD 発現抑制の証明:

胃癌細胞株として 58As9, MKN74 およびそれぞれの HIF-1 ノックダウン (KD) 株 (58As9-KD, MKN74-KD) を使用し、脂肪酸 酸化を促進する酵素遺伝子 ACS, CPT1, CPT2, CAD を常酸素・低酸素下での発現を 58As9 vs 58As9-KD および MKN74 vs MKN74KD で比較解析 (RT-PCR, WB) する。それによって、ACS, CPT1, CPT2, CAD 遺伝子のいずれ (あるいは全て) が低酸素環境で HIF-1 による抑制を受けるかを明らかにする。さらに 58As9, MKN74 を YC-1 (10 μM) 処理 (HIF-1 発現阻

害)した場合、control (PBS) に比し低酸素下での ACS、CPT1、CPT2、CAD mRNA のいずれ (あるいは全て) が発現復帰するかにつき解析・立証する。その後タンパク発現を WB にて確認する。これらの解析により、低酸素下での脂肪酸 酸化促進因子 (4 遺伝子) の発現抑制が HIF-1 により制御されていること、HIF-1 ノックダウン (KD) および YC-1 による HIF-1 抑制により発現復帰することを立証する。

ヌードマウス皮下腫瘍モデルによる低容量 YC-1 plus PA+カルニチン併用療法の効果判定 (具体的な方法)

ヌードマウス背部皮下に胃癌細胞株を接種し腫瘍 (5mm 程度まで) 形成 (58As9、MKN74 共に皮下腫瘍形成能あり) させ、その後、Control (PBS)、YC-1、YC-1 plus PA+カルニチンを腹腔内注入 (n=5、1 回/日 10~14 日間) し定期的に腫瘍径を計測する。また、摘出した腫瘍に対し、HIF-1 免疫染色および WB 解析、低酸素領域染色、cleaved caspase3 免疫染色および WB 解析、ROS 測定 (8-OHdG の免疫染色) などを行う。

4. 研究成果

・2 種類の胃癌細胞株 (58As9、MKN74) を用いて HIF-1 ノックダウン (KD) 細胞株を作製 (図 1)。KD 細胞株では低酸素環境で cell viability が低下することが確認された (trypan blue 法)。その際、過剰に ROS が産生 (FACS および confocal microscopy) し、アポトーシスが誘導されていること (Western blot) が確認された。

・また、HIF-1 阻害剤である YC-1 を使用した場合も、KD 細胞株と同様の実験結果が得られた。さらに前述の仮説に基づき、PA+カルニチン付加によるアポトーシス増強効果について解析を行った。PBS、YC-1 単独、YC-1 plus PA+カルニチンを常・低酸素下で添加し、cell viability を解析したところ、YC-1 plus PA+カルニチンが YC-1 単独に比し、低酸素特異的な増殖抑制効果を増強する傾向にあった。

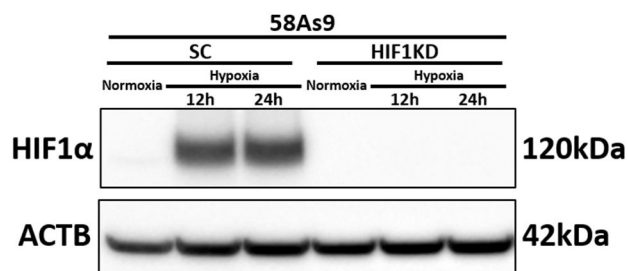
・PA およびカルニチン付加の至適濃度を設定すべく、様々な濃度条件下で抗腫瘍効果 (trypan blue 法) の増強効果を評価した。本実験にて PA は 50microM、カルニチンは 200microM が至適濃度であると設定された。また、胃癌細胞株の親株に YC-1 を使用して HIF1- を阻害する条件下でも、PA およびカルニチンの至適濃度は前述と同様であった。なお、PA は単独付加でも細胞死の増強を認め、カルニチンの単独付加では認められなかった。ただし、PA+カルニチン付加では PA 単独付加を上回る細胞死の増強を認め、カルニチンによる相乗効果が示唆された (図 2)。

・また、FACS や WB (Caspase-3 や PARP) にて、PA 単独付加および PA+カルニチン付加によるアポトーシス増強効果が確認され、その効果は PA 単独 < PA+カルニチンであった。

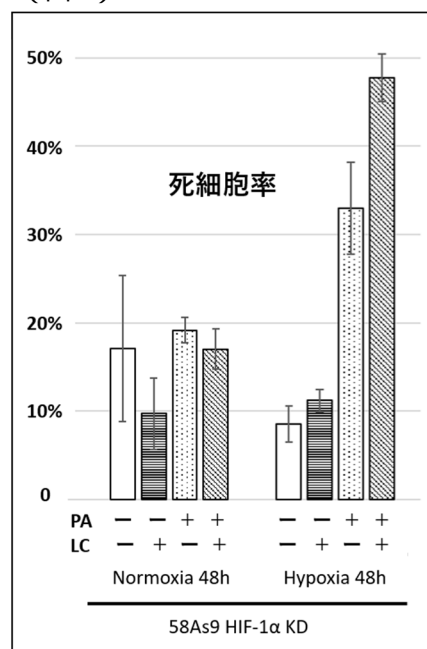
・現在、PA およびカルニチン付加による浸潤能や遊走能の変化、さらに細胞内活性酸素の変化を評価するとともに、細胞内アセチル CoA およびアシル CoA 濃度の測定、また、脂肪酸 酸化促進に寄与する遺伝子群の発現解析を行っている。さらに、生体内での効果を評価すべく、動物実験の準備を進めている。

・本研究の派生実験として、肝癌細胞株を用いて同様の実験を行ったところ、より顕著な抗腫瘍効果および PA+カルニチン付加による効果増強が認められた。本結果は、元来肝細胞が脂肪の主要な代謝器官であることに起因すると推測され、肝癌治療にも応用できる可能性があると考えられた。

(図 1)



(図 2)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	北島 吉彦 (Kitajima Yoshihiko) (30234256)	佐賀大学・医学部・客員研究員 (17201)	
研究分担者	田中 智和 (Tanaka Tomokazu) (60781903)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	