

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11680

研究課題名(和文)オレイン酸によるがん細胞増殖機構を解明し健康科学に発展させる基盤研究

研究課題名(英文)Health science-oriented study for molecular mechanisms of cancer cell proliferation induced by oleic acid

研究代表者

福島 伸之 (Fukushima, Nobuyuki)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：10254161

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)：これまで、がん細胞への脂肪酸曝露が細胞生存や増殖に影響することが報告されてきたが、オレイン酸の作用はがん細胞の種類により相反している。我々はオレイン酸がHNOA卵巣がん細胞において、解糖系の亢進により細胞生存を促進することを報告してきた。本研究では、オレイン酸の作用機序解明をおこなった。オレイン酸はPPAR $\alpha$ を介して細胞周期を亢進した。オレイン酸による解糖系刺激にはBRD4-L-MYC-GLUTの経路が関わっていた。しかしながら、L-MYCもBRD4も細胞周期亢進には関与していなかった。したがって、オレイン酸はPPAR $\alpha$ を介して異なる2経路、解糖系と細胞周期亢進を促進することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外来摂取した脂肪酸とがんの関連が報告されている。例えば、魚油に豊富に含まれる $\omega$ -3脂肪酸の摂取が、がん治療や予防に役立つことが示唆されている。オレイン酸はオリーブ油等に豊富な脂肪酸であり、その働きも健康科学的にも注目されている。しかしながらオレイン酸はがん細胞に対して、抑制的に作用するだけでなく、促進的に作用することも示されているが、その詳細は未解明である。本研究では、オレイン酸がある卵巣がん細胞において、細胞内の糖代謝に関わる遺伝子の機能を変化させ細胞増殖を促進することを見出した。オレイン酸や脂質の適切な摂取ががんの予防や治療に有効となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：So far, many studies have demonstrated that exposure of cancer cells to fatty acids (FAs) affects cell survival or proliferation. Oleic acid (OA) has somewhat controversial effects in cancer cells, with both pro- and anti-cancer effects, depending on cell type. Our prior findings suggested that OA enhances cell survival in serum starved HNOA ovarian cancer cells by activating glycolysis, but not beta-oxidation. Here, we examined the cellular mechanisms by which OA enhances cell survival and stimulates glycolysis. OA enhanced cell cycle progression through PPAR $\alpha$  activation in HNOA cells. OA-induced glycolysis seemed to involve activation of BRD4/L-MYC/ GLUT axis. However, L-MYC and BRD4 were unlikely involved in OA-induced cell cycle progression. These results suggested that OA could activate PPAR $\alpha$  to stimulate two independent pathways: glycolysis and cell cycle progression.

研究分野：脂質生物学

キーワード：オレイン酸 PPAR $\alpha$  解糖系 MYC BRD4 細胞周期 卵巣がん細胞

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸は、細胞膜構成成分や生体のエネルギー源として働いているが、シグナル分子として細胞の機能を調節していることが注目されつつあった。すなわち、シグナル分子としての脂肪酸の合成および受容機構の破綻や異常が疾患発症に関与すると考えられたため、これらの機構の制御が疾患の予防や治療に結びつくことが期待されていた。

シグナル分子の脂肪酸の由来は不明であるが、外来摂取した脂肪酸とがんの関連が報告されていた。例えば、疫学研究、臨床研究および動物実験において、魚油に豊富に含まれる $\omega$ -3脂肪酸の摂取が、がん治療や予防に役立つと考えられつつあった (Br. J. Cancer, 2017, 116, 1627 など)。 $\omega$ -3脂肪酸のがん抑制作用が細胞への直接作用なのかは不明であるが、細胞実験では多種類のがん細胞の細胞死を誘導することが知られており、動物実験と相関していることも報告されていた。

一方、オリーブ油に豊富なオレイン酸 (OA) も、 $\omega$ -3脂肪酸と同様に健康に有益とされているが、がんとの相関については、細胞および動物実験のいずれにおいても相反する結果が示されていた。すなわち、OA によるがんの抑制と促進の両方が報告されていた (Nutr. Hosp. 2012, 27, 1860、Clin. Exp. Metastasis, 2010, 27, 505、Pancreatology. 2018, 18, 655)。一般に、OA の標的分子として脂肪酸受容体 (FFAR1、FFAR4) や脂肪酸輸送体 (CD36) などが知られているが、OA による種々のがん細胞反応がこれらの受容体を介しているかどうか、さらに細胞内の情報伝達機構や物質代謝に対する影響は明らかではなかった。われわれも OA が HNOA 卵巣がん細胞の増殖を促進することを見出していたが、その分子機構は明らかではなかった (BBRC. 2013, 439, 280)。

## 2. 研究の目的

がん細胞の OA 受容機構はどのようなものなのか、この機構に基づく OA の摂取が OA 応答性がん細胞の増殖に影響するのかを解明することが、適切な脂質摂取ががん治療や予防に有効であるという健康科学的知見になりうると期待される。本研究では、われわれが検討してきた、OA による HNOA 卵巣がん細胞の細胞増殖促進機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験には HNOA 卵巣がん細胞を用いた。細胞の継代では 10%牛胎仔血清を含む D-MEM を用い、脂肪酸の効果調べる実験では、脂肪酸添加 1 日前に無血清 D-MEM に交換して使用した。細胞数の測定には SF 試薬を用いた。

免疫細胞染色では細胞をホルマリン固定後、抗リン酸化ヒストン H3 抗体と反応させた。続いてビオチン化 2 次抗体と反応させ、CF488 ストレプトアビジンで蛍光標識を行った。BrdU 染色では、細胞に 20  $\mu$ M の BrdU を 2 時間添加したのちアルコール固定した。続いて exonuclease III で処理し、抗 BrdU 抗体と反応させ、上記と同様に蛍光標識をした。rhodamine-phalloidin と DAPI を用いてそれぞれアクチンおよび核 DNA を対比染色した。RT-PCR は既報に従って行った。定量 RT-PCR は FastStart Essential DNA Green Master を

用い、解析にはLight cycler analysis software を使用した。またリファレンス遺伝子には *CYCLOPHILIN A* を利用した。

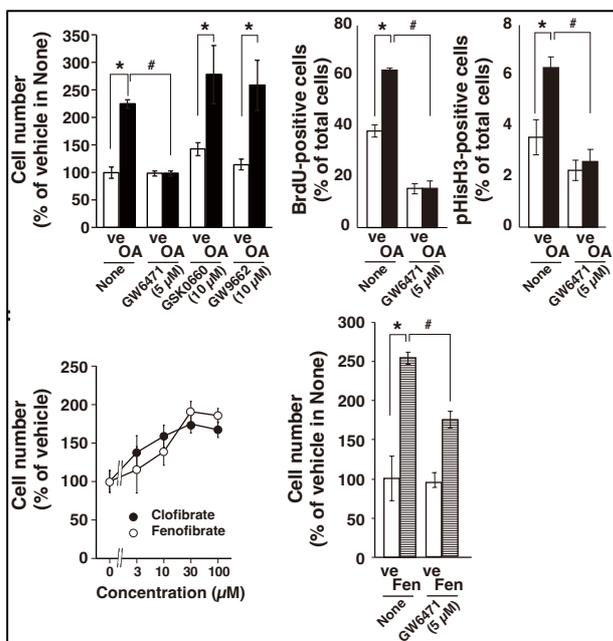
グルコース取り込み実験には $[^3\text{H}]-2\text{-DG}$  を用いた。細胞を洗浄後抽出液の放射活性を測定した。あらかじめ SF 試薬で細胞数を測定し、放射活性の校正に用いた。

細胞内の ATP 総量の測定には CellTiter-Glo luminescence cell viability assay kit を用いた。

#### 4. 研究成果

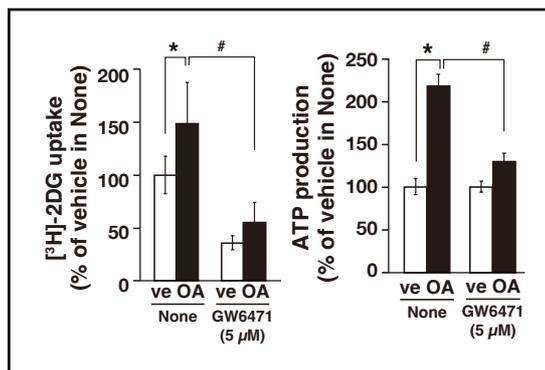
##### OA は PPAR $\alpha$ を介して HNOA 細胞の増殖を促進する

無血清下、HNOA 細胞に OA を添加すると、一過性の細胞数の増加が認められた。BrdU 取り込みおよびリン酸化ヒストン H3 陽性細胞の増加により、OA は細胞周期を駆動することがわかった。CD36 の阻害剤である SS0 を用いた予備検討から、OA の作用に CD36 が関与していると当初予想されていたが、意外にも HNOA 細胞における CD36 の遺伝子発現が認められなかった。また、複数種の抗 CD36 抗体を用いた検討でも発現が見られなかったことから、OA の作用には SS0 が阻害する CD36 以外の分子の関与が考えられた。そこで、OA の標的分子を同定するため、候補となる分子の遺伝子発現を RT-PCR で調べたところ、PPAR $\alpha$  の発現が認められた。続いて PPAR $\alpha$  アンタゴニスト (GW6471) を用いて OA の細胞増殖に対する効果を調べたところ、OA の作用は GW6471 により完全に抑制された。PPAR $\beta$  アンタゴニスト (GSK0660) および $\gamma$  アンタゴニスト (GW9662) は OA の作用に影響しなかった。一方、PPAR $\alpha$  のアゴニスト (clofibrate、fenofibrate) は濃度依存的に細胞数の増加を引き起こし、fenofibrate の作用は GW6471 により抑制された。

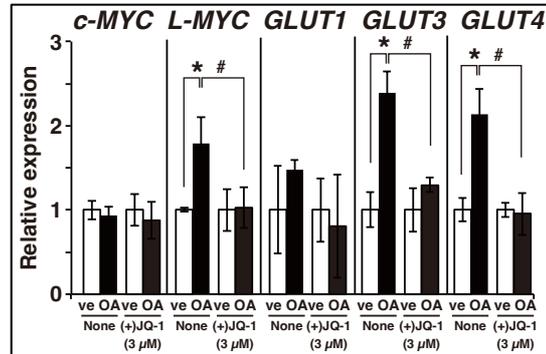


##### OA は BRD4-L-MYC-GLUT 経路を活性化し細胞数増加をもたらす

OA による HNOA 細胞の細胞数増加はヘキソキナーゼ阻害剤の 2-デオキシグルコース (2-DG) により抑制された。そこで、グルコース取り込みやグルコース代謝への作用を調べたところ、OA は $[^3\text{H}]-2\text{-DG}$  取り込みに加え ATP 産生も増加させることがわかった。また、これらの作用は GW6471 により阻害された。しかしながら、OA 添加によるヘキソキナーゼ活性の変化は見られなかった。これらのことから、OA は PPAR $\alpha$  を介してグルコースの取り込みを増加させ、その結果 ATP 産生が亢進して細胞数の増加に至ることがわかった。



グルコースの取り込み上昇がグルコース輸送体 (*GLUT*) 遺伝子の発現増加によるのかどうかを定量 RT-PCR により調べた。HNOA 細胞は *GLUT1*、*GLUT3* および *GLUT4* を発現しており、いずれの遺伝子も OA 添加により発現増加した。*GLUT* 発現は原がん遺伝子の *MYC* により調節されること、さらに *MYC* の転写は転写因子の *BRD4* により制御されていることが知られている。そこで両分子の関与について、*MYC* 阻害剤の 10058-F4 および *BRD4* 阻害剤の (+)-JQ1 を用いて検討した。10058-F4 は OA による *GLUT* 発現増加を抑制した。また、OA により *L-MYC* の発現上昇が見られたが、(+)-JQ1 は *L-MYC* および *GLUT* の発現上昇も抑制した。さらに両阻害剤は OA による [<sup>3</sup>H]-2-DG 取り込み上昇および細胞数の増加のいずれも抑制した。しかしながら、両阻害剤は OA による細胞周期促進作用には影響しなかった。



### まとめ

本研究では、OA は PPAR $\alpha$  を介して細胞周期亢進とグルコース代謝の活性化を引き起こすことがわかった。PPAR $\alpha$  は cell cycle dependent kinase (CDK) を活性化することから、HNOA 細胞においても OA が CDK を活性化して細胞周期駆動をもたらす可能性がある。PPAR $\alpha$  が *BRD4*-*L-MYC*-*GLUT* 経路の活性化機構は不明であるが、PPAR $\alpha$  による *MYC* 転写促進が報告されている。今後はこれらの点を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kado, T. Iwamori, M. Fukushima, N.
2. 発表標題 CD36 mediates oleic acid-induced CDK activation to stimulate cell cycle progression and glucose transporter transcription in ovarian cancer cells
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉置 彪流, 福嶋 伸之
2. 発表標題 オレイン酸はRMG-1卵巣がん細胞のグルタミン代謝を調節し細胞増殖を促進させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------