

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14301  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K18166  
研究課題名(和文) パルミトイル化を鍵とした、脂肪酸が卵巣癌の悪性性質を変容するメカニズムの解明  
研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism by which fatty acids alter the malignant features of ovarian cancer in terms of palmitoylation.  
研究代表者  
山ノ井 康二 (Yamanoi, Koji)  
京都大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70868075  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内にふんだんに見られる長鎖脂肪酸であるパルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸が卵巣癌細胞に及ぼす影響を *in vitro* にて検証した結果、ステアリン酸が複数の卵巣癌細胞を明らかに抑制することがわかった。*in vivo* でも同様の結果を得た。さらに不飽和化酵素(SCD1)の抑制により、腫瘍増殖抑制効果が著しく増強することも確認できた。  
メカニズムとしては、DNA障害が明らかに生じていることがわかり、加えて小胞体ストレスが生じている可能性も示唆される。またリボソームタンパク質のアシル化も関連している可能性がある。特に後者がDNA障害に関与するメカニズム解明を、今後目指したい。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、長鎖脂肪酸の中でもステアリン酸が特に、卵巣癌細胞に対する強い細胞障害を及ぼすことが初めて明らかになった。*in vivo* でも効果を確認したのは本研究が初めてである。特にステアリン酸リッチな食事による細胞増殖抑制効果は、大きな社会的意義を持つと考えられる。  
ステアリン酸はパーム脂など日常の食事にふんだんに含まれるものであり、これを軸とした食事治療は十分導入が現実的に検討できる。癌治療の中で初めて、具体的なエビデンスを持った食事治療を提唱する、一つの根拠になると考えられる。メカニズムの探索をさらに行うことで、ステアリン酸に着目した食事療法の可能性をさらに高めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The effects of palmitic acid, oleic acid, and stearic acid, which are long-chain fatty acids abundant in the body, on several ovarian cancer cell lines were examined *in vitro*, and stearic acid was found to apparently inhibit several ovarian cancer cell lines. This effect was also confirmed *in vivo*. Furthermore, inhibition of desaturating enzyme, SCD, markedly enhanced the tumor growth inhibitory effect *in vivo*. Mechanistically, DNA damage is clearly observed by exposure of stearic acid. Furthermore, it is also suggested that endoplasmic reticulum stress can be induced. Among these two mechanisms, DNA damage seems to be the main factor. LC-MS analysis showed that acylation of ribosomal proteins by stearic acid can be involved. We would like to elucidate the mechanism by which acylation of ribosomal proteins by stearic acid is involved in DNA damage process.

研究分野：産科婦人科学

キーワード：飽和脂肪酸 ステアリン酸 DNA障害 アシル化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年癌罹患患者数が増加している背景に、食事の西洋化が与える影響が指摘されている。具体的には、高脂肪食 (High Fat Diet: HFD) が、癌化や癌の悪性性質に深く関与しうるとする、疫学研究や基礎研究が複数報告されている。

上皮性卵巣癌は、婦人科臓器に発生する悪性腫瘍の中で、未だに予後が不良である。大きな要因の一つが、容易に獲得する治療抵抗性と、背景としての遺伝子発現パターンが多様で、いわゆる precision medicine が困難なことである。そのような卵巣癌についても、HFD が播種能力や化学療法抵抗性など悪性性質に関わるとする報告が複数ある。申請者の研究室もこれまで、食事内容の変化で腫瘍の増殖能力が変化することを報告している (Taha AAA et al. Oncotarget, 2018)。しかし、HFD など食事内容の変化と癌の悪性性質を直接繋げるメカニズムについては、ほとんど明らかになっていない。そのため、特に担癌患者に対して、科学的にエビデンスがあって具体的に推奨される食事療法は、現状存在しない。

パルミトイル化とは、パルミトイル酸に代表される長鎖脂肪酸がタンパク質に付加する、翻訳後修飾機構の一つである。Mass Spectrometry を用いた網羅的な解析で、多くのタンパク質がパルミトイル化を受ける可能性が示唆されている。しかし、リン酸化やアセチル化など他のタンパク質翻訳後修飾とは異なり、パルミトイル化に関する研究はあまり進んでいない。近年 STAT3 や TEAD など、癌細胞で重要なタンパク質がパルミトイル化修飾を受け、それがタンパク質の機能に大きく関わるのが、申請者の留学先より報告された (Niu J, et al. Nature 2019. Chan P, et al. Nat Chem Biol, 2016)。しかし卵巣癌において、タンパク質のパルミトイル化と悪性性質の関連を研究した報告は、これまでのところ見られない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、そのパルミトイル化によって卵巣癌の悪性性質に大きく関与するタンパク質を同定し、HFD と卵巣癌の悪性性質を直接結びつける因子を同定することとした。まず様々な種類の長鎖脂肪酸が卵巣癌細胞にどのような影響を及ぼすか検証し、大きく機能を変容する調査脂肪酸の同定を試みた。そして、具体的に及ぼす機能変化のメカニズム探索を行った。

### 3. 研究の方法

#### ・細胞株、長鎖脂肪酸、試薬、マウス

ヒト卵巣癌細胞株 ; OVCAR5, OVCAR8, ES2, SKOV3, OVCAR3, KURAMOCI) を使用した。既報の通り、RPMI1640+10%FBS 培地で培養した。特に長鎖脂肪酸を用いたアッセイの際は、FBS に含まれる長鎖脂肪酸の影響を排除するため、遊離長鎖脂肪酸が含まれない BSA を代わりに用いた。

長鎖脂肪酸は、水に溶けにくいいため、BSA に conjugate してから培地に添加した。

不飽和化酵素阻害剤として、CAY10566 を使用した。コントロールは DMSO を用いた。

マウスは BALB/c-nu マウスを用いた。皮下に細胞を接種する Xenograft モデルにて評価した。腫瘍径は 3 方向の長さ測定し、ABC/2 method を用いて体積を推測した。

#### ・in vitro cell proliferation assay (IC-50 calculation).

細胞を一定数 96-well plate に播種して、翌日から長鎖脂肪酸や試薬を添加し、24 時間後、48 時間後、72 時間後の生細胞数を、WST-8 試薬を用いて測定した。算出した細胞数から dose-

response curve を書いて、IC50 値を算出した。

・マウス脂肪食

マウスに与える食事を、通常の食事と、飽和脂肪酸リッチな食事として比較を行った。飽和脂肪酸リッチな食事に含まれる脂肪酸の多くは、ステアリン酸の比重が最も多いものを使用した。

・長鎖脂肪酸の測定

ステアリン酸、オレイン酸の測定は、LC-Mass spectrometry 法を用いて行った。測定は京都大学医学部共通機器室の協力を得て行った。

・Co-IP と Mass spectrometry

ステアリン酸が付加するタンパク質を、共免疫沈降(Co-IP)法を用いて行った。C18:0 にアルキル基を付加した改変 probe を用いて、metabolic labelling を行った。アルキル基を streptavidin beads をクリック法にて結合させた上で沈降し、回収した。それを gel に流し、回収できたタンパク質を mass spectrometry を用いて同定した。回収できたタンパク質が、どのような機能を有するものが多く含まれるか、DAVID を用いてクラスタリングを行ない、推測した。

#### 4. 研究成果

##### 1. ステアリン酸 (C18:0) は、複数の卵巣癌細胞に対して強い細胞障害効果を持つ

複数ある長鎖脂肪酸のうち、生体内で特に豊富なパルミチン酸 (C16:0)、C18:0、オレイン酸 (C18:1) について検討することとした。これらを複数のヒト卵巣癌細胞株の培地に様々な濃度で添加し、細胞障害性を調べて dose-response curve を作成して IC50 値を算出した。

表 1 : ヒト卵巣がん細胞株の IC50 値 (uM, 72hr)

	OVCAR5	ES2	SKOV3	OVCAR3*	OVCAR8*	KURAMOCHI
C16:0	1450	3010	1193	1756	72.0	1646
C18:1	2923	1735	1631	2506	976.4	1498
C18:0	110	110.3	49.8	226.8	37.6	516.6

その結果、上記のように C18:0 の IC50 は C16:0, C18:1 と比べて格段に低く、強い細胞障害性作用を持つことが示唆された。長鎖脂肪酸の違いでこれほど大きな違いがあることは予想しておらず、興味深い結果であった。特にステアリン酸による細胞障害性は、そのまま治療につながる面もあると考えられた。そこで、これについて深く検討することとした。

##### 2. 内因性の C18:0 から C18:1 への変化を抑制することで、さらに細胞障害効果が高まる。

C18:0 は不飽和化酵素(SCD1)により、生体内で直接 C18:1 に変換される。表 1 のように、C18:1 は細胞障害性をあまり持たないことから、添加した C18:0 が C18:1 に変換されることが何かの影響を及ぼさないか検証した。

表 2 : ヒト卵巣がん細胞株の IC50 値 (uM, 72hr)

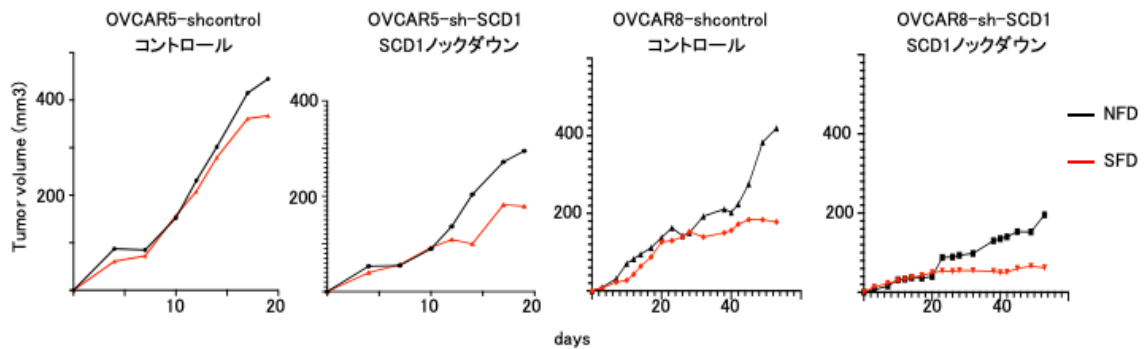
	OVCAR5	ES2	SKOV3	OVCAR3	OVCAR8	KURAMOCHI
C18:0+DM	110.0	110.3	49.8	226.8	37.6	516.6
C18:0+CAY	47.7	47.8	50.5	124.1	20.9	352.1

DM: DMSO, CAY: CAY10566, SCD1 inhibitor. 1uM 投与。

SCD1 の投与で、外因性の C18:0 が C18:1 に変換されることを阻害すると、ほとんどの細胞株でステアリン酸の IC50 値は低下した。すなわち、SCD1 の機能抑制によって C18:0 の細胞障害性が増強されることが確認できた。ステアリン酸リッチな状況が、確かに in vivo でも腫瘍増殖を抑制するのか、検討を行った。

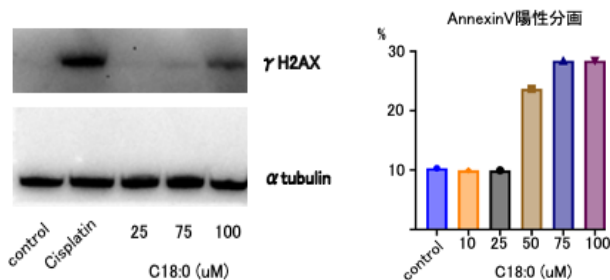
3. C18:0 リッチな食事と SCD1 の機能抑制にて、in vivo 腫瘍増生は有意に抑制される。

ヒト卵巣癌細胞を nude mice に接種する In vivo xenograft model を用い、通常食(Normal fat diet; NFD)と C18:0 リッチ食(Stearic acid-fat diet: SFD)による腫瘍増殖能の違いを評価した。また腫瘍の SCD1 の発現を shRNA の導入にて抑制し、内因性の C18:1 への変化を抑制した際の効果も検証した。



SFD によって NFD と比べて有意に in vivo でも腫瘍増生は抑制された。そして腫瘍での SCD1 発現を抑制した際は、その効果がさらに強くなった。すなわち、外因性にステアリン酸リッチな環境として、腫瘍でのステアリン酸からオレイン酸への変換を抑制すると、最も強く腫瘍増生を抑制できることがわかった。以上より、長鎖脂肪酸の中でも特にステアリン酸が、強い細胞障害効果を持って、治療に即つながりうるということがわかった。そこで、ステアリン酸と細胞障害のメカニズム探索を行うこととした。

4. C18:0 の添加は、容量依存性に卵巣癌細胞のアポトーシスと DNA 障害を起こす。



ステアリン酸を様々な濃度で添加した際の、DNA 障害とアポトーシスの程度を評価した。DNA 障害を  $\gamma$ H2AX の Western blotting にて評価したところ、容量依存性に DNA 障害が強くなることが示された。またアポトーシスについては AnnexinV 陽性分画を Flow cytometry にて評価した。その結果、やはり容量依存性にアポトーシスが增強することが示された。

ステアリン酸は多くの面に作用するが、中でも、タンパク質に直接付加するアシル化による側面がどうか、検討を加えることとした。

5. ステアリン酸はリポソーマルプロテインの多くに付加する。

C18:0-alkyne probe を用いた labelling から、ステアリン酸が付加するタンパク質を Mass spectrometry を用いて網羅的に回収し、検討した。付加したタンパク質は 700 種類余り見られた。それらにどのようなタンパク質が多く含まれるか、DAVID を用いて clustering を行なって分類した。その中で最も濃縮したグループを下の表に示す。

表 3 : 最も Enrichment score が高かったグループの内訳

Enrichment score:54.4

Term	Count	%	PValue
------	-------	---	--------

GO:0006413~translational initiation	91	9.86984816	1.21E-88
GO:0022626~cytosolic ribosome	69	7.48373102	4.77E-82
GO:0006614~SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	74	8.02603037	3.14E-81
GO:0002181~cytoplasmic translation	70	7.59219089	7.59E-75
GO:0000184~nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay	78	8.45986985	2.87E-72
GO:0019083~viral transcription	72	7.80911063	1.62E-66
KW-0687~Ribonucleoprotein	112	12.1475054	6.41E-62
GO:0006412~translation	82	8.89370933	1.17E-50
GO:0006364~rRNA processing	74	8.02603037	5.09E-47
GO:0005840~ribosome	68	7.37527115	4.41E-43
GO:0003735~structural constituent of ribosome	71	7.70065076	7.74E-42
KW-0689~Ribosomal protein	71	7.70065076	1.51E-38
GO:0022625~cytosolic large ribosomal subunit	40	4.33839479	2.26E-38
has03010:Ribosome	70	7.59219089	1.12E-35
has05171:Coronavirus disease – COVID-19	78	8.45986985	5.11E-30
GO:0022627~cytosolic small ribosomal subunit	31	3.36225597	5.82E-30

結果に示すように、リボソームに関連するタンパク質、そしてリボソームで行われる、mRNA からタンパク質へと翻訳される過程の経路に含まれる因子が多くみられた。リボソーマルタンパク質の機能障害は DNA 障害を及ぼすことが知られており、一つの原因ではないかと推測された。

本研究により、長鎖脂肪酸の中でも特にステアリン酸が突出して異なる影響を与えること、その影響は細胞障害に及ぼすものが大きく、in vivo でも明らかな腫瘍増殖抑制をもたらすことが、初めて示された。メカニズムとして DNA 障害によるアポトーシスが大きな因子と推測された。アシル化に着目した解析で、リボソーマルタンパク質へのステアリン酸付加が、DNA 障害の一つの原因ではないかと推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 小椋淳平、山ノ井康二
2. 発表標題 The effect of high-fat-diet on malignant phenotypes of ovarian cancer through elevation of long chain fatty acid.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋淳平、山ノ井康二
2. 発表標題 The effect of high-fat-diet on malignant phenotypes of ovarian cancer cells through elevation of unsaturated fatty acid.
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋淳平、山ノ井康二
2. 発表標題 Stearic acid may induce apoptosis via DNA damage to ovarian cancer cells.
3. 学会等名 第64回日本婦人科腫瘍学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小椋淳平、山ノ井康二
2. 発表標題 The effect of high-fat-diet on acquisition of malignant phenotypes of ovarian cancer through elevation of long chain fatty acid.
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋淳平、山ノ井康二
2. 発表標題 Stearic acid, a long-chain fatty acid, may induce apoptosis through the accumulation of DNA damage in ovarian cancer cells.
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------