

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23179

研究課題名（和文）グルタミン代謝がアスピリンの抗腫瘍効果に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of glutamine metabolism on the anti-tumor effects of aspirin

研究代表者

朴 将源（BOKU, Shogen）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30755616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：既存のデータベースを用いた解析により、PIK3CA変異大腸がんにおいて、アスピリンがグルタミン代謝と低酸素刺激に関連していることを見出した。網羅的遺伝子発現解析により、PIK3CA変異大腸がんにおいてはアスピリンがグルタミン代謝を亢進させていることと、ミトコンドリアを標的としている可能性が示唆された。アスピリンが転写因子ATF4を介してグルタミン代謝関連分子の発現を誘導していることを分子レベルで解明した。さらに、アスピリンとグルタミン代謝阻害剤を併用することでがん細胞を効果的に抑えることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗血小板薬であるアスピリンは、がんの予防・治療を目的としたドラッグ・リポジショニングの候補薬として注目されている。一方で、アスピリンにも消化性潰瘍や出血といった副作用が存在するため、アスピリンの効果が高い集団を見つけること、ならびにアスピリンをがん治療薬として効果的に使用する試みが必要である。本研究を基盤とすることで、アスピリンを用いた『がんの精密医療（プレジジョン・メディシン）』を確立するためにはグルタミン代謝に着目する必要があることが見出された。

研究成果の概要（英文）：Using bioinformatic approach, we found that aspirin is associated with glutamine metabolism and hypoxic stimulation in PIK3CA-mutated colorectal cancer. Comprehensive gene expression analysis suggested that aspirin enhances glutamine metabolism and may target mitochondria in PIK3CA mutant colorectal cancer. We elucidated that aspirin induces the expression of glutamine metabolism-related molecules via the transcription factor ATF4. Furthermore, we showed that aspirin in combination with an inhibitor of glutamine metabolism effectively suppresses cancer cells.

研究分野：がん生物学

キーワード：アスピリン グルタミン PIK3CA遺伝子 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アスピリンは抗血小板薬として広く使用されているが、臨床試験の大規模後方視的解析により、がん死亡抑制効果が認められており、特に PIK3CA 変異大腸がんの死亡率を大きく低減することが知られている。

(2) PIK3CA 変異はがん遺伝子であり、種々の化学療法抵抗性の原因となるなど、大腸癌の予後不良因子であると報告されているが、PIK3CA 変異に伴う解糖系、グルタミン代謝などの代謝異常が、腫瘍抑制のための治療標的となることが近年注目されている。

2. 研究の目的

(1) PIK3CA 変異大腸癌のグルタミン代謝への影響を指標にアスピリンの抗腫瘍効果を明らかにする。

(2) アスピリンを効果的に使用するためのバイオマーカーを発見するために遺伝子発現およびタンパク質発現の挙動を解明する。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期解析

PIK3CA 変異ならびに野生型大腸癌細胞株を用いて、アスピリン処理およびグルタミン枯渇による細胞周期への影響を、フローサイトメトリーを用いて解析した。

(2) グルタミン代謝阻害剤との相互作用

グルタミンナーゼ阻害剤、アミノ基転移酵素阻害剤、アミノ酸トランスポーター阻害剤などを用いて培養癌細胞のグルタミン代謝を修飾し、アスピリンの細胞増殖抑制効果に及ぼす影響を Cell Counting Kit-8 およびコロニー形成能試験により検証した。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

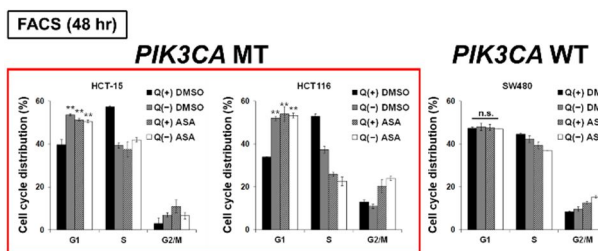
PIK3CA 変異大腸癌細胞株に対しアスピリン処理を行い、網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を実施することで、アスピリンによるグルタミン代謝関連パスウェイへの影響を検証した。

(4) タンパク質発現解析

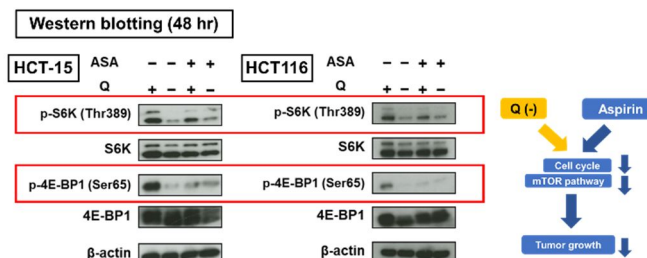
ウエスタンブロッティングにより PIK3CA 変異大腸癌細胞株のグルタミン代謝関連酵素・受容体の発現解析を行い、アスピリンによるグルタミン代謝へのタンパクレベルでの影響を探索した。

4. 研究成果

まず、ヒト大腸がん細胞株のグルタミン(Q)への増殖依存性を、Cell Counting Kit-8 により評価した。PIK3CA 変異を有する HCT-15 細胞および HCT116 細胞においては、グルタミン濃度依存性の増殖を認める一方で、PIK3CA 野生型である SW480 細胞の増殖は、培地中のグルタミン濃度の影響を受けなかった。次に、グルタミン除去によるアスピリン(ASA)の細胞増殖抑制効果への影響を検討したところ、HCT-15 細胞および HCT116 細胞において、グルタミン存在下ではアスピリンによる濃度依存性の増殖抑制効果を認める一方で、グルタミン除去下ではアスピリンの増殖抑制効果は減弱した。さらに PIK3CA 変異型および野生型の isogenic cell line である SW48 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、やはりグルタミン除去下においては、PIK3CA 変異 SW48 細胞特異的にアスピリンの増殖抑制効果が減弱した。次に、アスピリン処理およびグルタミン除去が細胞周期に与える影響について、flow cytometry にて解析したところ、HCT-15 細胞および HCT116 細胞においてアスピリン処理ならびにグルタミン除去は G1 期停止を誘導する一方で、SW480 細胞においては、アスピリンは細胞周期への影響は及ぼさなかった。



次にアスピリン処理ならびにグルタミン除去が影響を及ぼす分子メカニズムについて Western blotting にて解析したところ、HCT-15 細胞および HCT116 細胞においてアスピリン処理ならびにグルタミン除去はともに、mTORC1 の主な基質である S6K と 4E-BP1 のリン酸化を抑制した。以上のことから、アスピリンはグルタミン除去と同様に、PIK3CA 変異特異的に、mTOR 経路を抑制し、G1 期停止を誘導するものと考えられた。

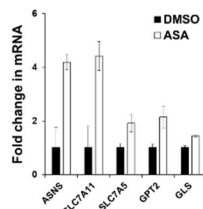


続いて、アスピリンがグルタミン代謝に及ぼす影響を評価するために、公共データベースを用いたバイオインフォマティクス解析を実施した。HCT-15 細胞と遺伝学的に相同である DLD-1 細胞ならびに SW480 細胞と同患者由来である SW620 細胞に対してアスピリン処理後の遺伝子発現について、マイクロアレイ解析データを再解析したところ、DLD-1 細胞においてのみアミノ酸代謝経路に変化が認められ、PIK3CA 変異細胞においては、アスピリンがグルタミン代謝を活性化させることが示唆された。さらに HCT-15 細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析 (RNA-seq) を行い、パスウェイ解析を実施したところ、アスピリン処理により、アミノ酸トランスポーター経路がエンリッチされた。実際、RT-PCR 法ならびに Western blotting により、アスピリン処理により、ASNS、GPT2、GLS といったグルタミン代謝関連遺伝子群の発現誘導が確認された。

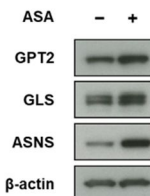
RNA-seq
Cell line: HCT-15
Condition: DMSO or ASA 2 mM (24 hr)

Gene Set Name of "GO Biological Process"	NES	#Genes	adj.P-value
Cellular response to glucocorticoid stimulus	2.2644	28	0.0016
Amino acid transmembrane transport	2.2541	36	0.0016
Amino acid transport	2.2231	59	0.0016
Neutral amino acid transport	2.2093	18	0.0029
Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress	2.205	20	0.0029
Cellular response to dexamethasone stimulus	2.1821	17	0.0035
Response to dexamethasone	2.1778	20	0.0029
Cellular response to corticosteroid stimulus	2.1701	30	0.0029
Positive regulation of cofactor metabolic process	2.1378	15	0.0039
Protein kinase B signaling	2.1225	106	0.0016

real time RT-PCR (48 hr)

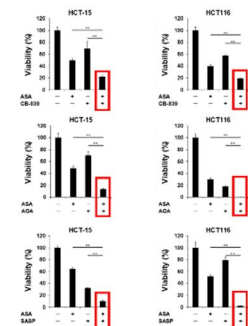
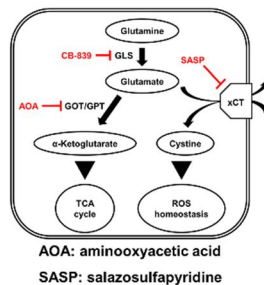


Western blotting (48 hr)



最後に、アスピリンにより活性化されたグルタミン代謝が新規治療標的となる可能性を考え、グルタミン代謝阻害剤とアスピリンとの併用効果について検証した。HCT-15 細胞および HCT116 細胞において、グルタミンナーゼ阻害剤である CB-839、シスチン/グルタミン酸トランスポーター阻害剤である salazosulfapyridine、グルタミン酸トランスアミナーゼ阻害剤である aminooxyacetate は、いずれもアスピリンと併用することで増殖抑制効果の上乗せを認めた。また、薬剤の長期暴露の影響を評価するためにコロニー形成試験を行ったところ、先のいずれのグルタミン代謝阻害剤はアスピリンと併用することで、有意にコロニー形成能を抑制した。

WST-8 assay (72 hr)



以上の通り、報告者は、アスピリンが特に有効であるとされる PIK3CA 変異大腸がんにおいてグルタミン代謝環境により抗腫瘍効果が減弱する可能性を示し、アスピリンの効果予測因子として、腫瘍内におけるグルタミン代謝にも注目する必要性を示した。さらに PIK3CA 変異大腸がんにおいて、アスピリンとグルタミン代謝阻害薬が併用療法として有望である可能性を示した。本研究は、今後、動物実験ならびに臨床データを用いた更なる検証を行うことで、「がんゲノム・がん代謝の双方を標的としたアスピリンによるがん精密医療」の確立に寄与するものと期待される。

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 Boku S, Watanabe M, Sukeno M, Yaoi T, Hirota K, Iizuka-Ohashi M, Itoh K, Sakai T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Deactivation of Glutaminolysis Sensitizes PIK3CA-Mutated Colorectal Cancer Cells to Aspirin-Induced Growth Inhibition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12051097.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shogen Boku
2. 発表標題 Combinatorial treatments of aspirin with glutaminolysis-targeting agents against PIK3CA-mutated colorectal cancer cells
3. 学会等名 JSMO2021
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Shogen Boku
2. 発表標題 Combinatorial treatments of aspirin with glutaminolysis-targeting agents against PIK3CA-mutated colorectal cancer cells
3. 学会等名 7大学連携個別化がん医療実践者養成プラン 第4回国際がん研究シンポジウム
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 朴将源
2. 発表標題 PIK3CA変異大腸癌細胞においてグルタミン代謝阻害がアスピリンに対する感受性を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021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
---------	---------