

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07195

研究課題名（和文）ミトコンドリアカルシウムに着目したがんへの新たなアプローチ

研究課題名（英文）A new approach to cancer focusing on mitochondrial calcium

研究代表者

後藤 信治（Goto, Shinji）

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：50186889

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）：我々は、酢酸代謝、フマル酸呼吸、グルタミン代謝などのがん特有のエネルギー代謝をそれぞれの経路毎ではなく俯瞰的に捉えることにより、ミトコンドリアCa²⁺が複数の異なる代謝系の共通の重要な因子として位置づけられるのではないかと考えた。そこで、ミトコンドリアへのCa²⁺の流入阻害により、異なる代謝経路に依存するがんでも、増殖抑制や細胞死が誘導できるのではないかと予想した。今回の研究によって、ミトコンドリアへのCa²⁺流入の阻害が種々のがん細胞の代謝を抑制し、細胞死を誘導すること、抗がん剤との併用で細胞死をより強く誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エネルギー代謝を標的とするがん治療は有望であると考えられるが、治療対象のがんの特有な代謝を特定する必要があること、同じがん種なら代謝系も同じとは限らないことなど、治療応用への壁は高い。本研究によって、ミトコンドリアCa²⁺が、複数のがん細胞の代謝に影響する共通の因子の一つであることが明らかとなった。本研究成果は、ミトコンドリアCa²⁺の動態制御を介するミトコンドリア内代謝の阻害が、がん細胞に対する殺細胞効果を有することを示すと共に、ミトコンドリアを標的とする新たながん治療研究の展開を誘導するものであると考える。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that mitochondrial Ca²⁺ could serve as a pivotal factor shared among multiple metabolic systems, as evidenced by our examination of cancer-specific energy metabolism, including acetate metabolism, fumarate respiration, and glutamine metabolism, from a holistic perspective rather than through individual pathway analysis. Consequently, we anticipated that inhibiting Ca²⁺ influx into the mitochondria would impede proliferation and trigger cell death in cancers reliant on diverse metabolic pathways. This study aims to elucidate whether mitochondrial Ca²⁺ functions as a universal master regulator of multiple metabolic pathways and to ascertain whether its dynamic regulation curtails cancer proliferation and survival. Our findings demonstrate that blocking Ca²⁺ influx into the mitochondria hampers the metabolism of various cancer cells, leading to cell death, with even greater efficacy observed when combined with an anticancer drug.

研究分野：病態生化学

キーワード：がん 代謝 グルタミンオリシス 低栄養 低酸素 ミトコンドリア カルシウムイオン

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般に、多量の糖を獲得できる状況にあるがん細胞は、解糖系に依存したエネルギー代謝(ワーブルグ効果)を行う。しかし、貧栄養・貧酸素状態ではがん特有の代謝である、酢酸代謝、フマル酸呼吸、グルタミン代謝などを行うことが報告されていた。酢酸代謝ではアセチル CoA シンターゼ(ACSS2)を、フマル酸呼吸では NADH-フマル酸還元酵素 (NADH-FR)を、グルタミン代謝(グルタミノリシス)ではグルタミン酸脱水素酵素 1 (GLUD1)をそれぞれ標的として阻害剤等で酵素活性を低下させると、増殖抑制や殺細胞効果が認められることも報告されている。これらの知見に基づけば、エネルギー代謝を標的とするがん治療は有望であると考えられるが、治療方法への応用には至っていない。我々は、これまでに、大腸がん株化細胞からがん幹細胞マーカーである CD44、CD133 の陽性/陰性細胞を分離し、放射線や抗がん剤などに対する耐性機構について研究を進めてきた。その研究過程で、CD44、CD133 共陽性細胞(HCT8CD44(+)/CD133(+))だけが低糖状態でも増殖し、糖枯渇状態でも一定期間生存できることを見出している。解析の結果、HCT8CD44(+)/CD133(+))は、核酸や脂質の合成を維持しつつ、グルタミン代謝やオートファジーを増強して ATP を産生することが示唆された。さらに、放射線、抗がん剤、低栄養などによるストレス下では、HCT8CD44(+)/CD133(+))のミトコンドリアカルシウムイオン(Ca^{2+})量が有意に増加することを観察していた。がん特有の代謝系において、代謝産物はオーバーラップするものが複数あるが、代謝経路中の重要な酵素自体はそれぞれ個別であり接点はない。このような状況で、それぞれ独立しているがん特有のエネルギー代謝系に、「治療の標的となる共通のマスターレギュレーター」と言えるような重要な因子があるのか否かを明らかにすることは重要であると考えられるが、その存在は不明のままであった。

2. 研究の目的

酢酸代謝ではピルビン酸脱水素酵素複合体、フマル酸呼吸ではリンゴ酸酵素、グルタミン代謝では α -ケトグルタル酸脱水素酵素複合体が、 Ca^{2+} や 2 価の陽イオンで活性化されることは以前から知られていた。そこで、我々は、がんのエネルギー代謝をそれぞれの経路毎ではなく俯瞰的に捉えることにより、ミトコンドリア Ca^{2+} が複数の異なる代謝系の共通の重要な因子として位置づけられるのではないかと考え、ミトコンドリアへの Ca^{2+} の流入阻害により、異なる代謝経路に依存するがんでも増殖抑制や細胞死が誘導できるのではないかと予想した。本研究の目的は、ミトコンドリア Ca^{2+} が、上記の共通のマスターレギュレーターであるか否かを明らかにし、その動態制御が、がんの増殖・生存を抑制するか否かを検証することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

がん細胞として、PANC-1 (膵臓がん細胞株)、A549 (肺腺がん細胞株)、MCF7 (乳がん細胞株) 並びに我々が以前に樹立した、大腸がん細胞株 HCT8 を親株とする CD44 と CD133 を強発現している HCT8CD44(+)/CD133(+))を用いた。これらの細胞は、RPMI1640 培地に終濃度 10%の牛胎児血清(FBS)を加えた培地を用いて培養した。

また、PANC-1 から貧栄養状態でも増殖する細胞を分離するために、グルタミン欠乏 RPMI1640 培地に終濃度 10%の透析済 FBS を加えた培地、または、グルコース欠乏 RPMI1640 培地に終濃度

10%の透析済 FBS を加えた培地を用いた。

(2) ミトコンドリア Ca²⁺の動態解析

各実験条件下での細胞質とミトコンドリアの Ca²⁺は、Fluo4-AM と Rhod2-AM をそれぞれ用い、フローサイトメーターで解析した。

(3) ミトコンドリアへの Ca²⁺の流入阻害

ミトコンドリア Ca²⁺ユニポートの阻害剤である Ruthenium Red と Ruthenium 36(Ru 360)を用いて、ミトコンドリアへの Ca²⁺の流入を阻害した。パイロット実験で阻害効果が高かった Ru 360 を以後の実験には用いた。

(4) Ca²⁺ユニポーター阻害剤が及ぼす影響の解析

Ru 360 の各細胞の大きさに対する影響、HCT8CD44 (+) /CD133 (+) のドキシソルピシン排出能に及ぼす影響は、Ru 360 添加後、経時的に細胞を採取しフローサイトメーターを用いて検討した。また、ドキシソルピシンやゲムシタピンの殺細胞効果に及ぼす影響は、トリパンブルー染色後、生細胞数を計測して評価した。

(5) 貧栄養状態下でも増殖する細胞の分離

PANC-1 細胞をグルタミン欠乏 RPMI1640 培地で繰り返し培養し、生き残った細胞を通常の培地で培養した。増殖した細胞を再度、グルタミン欠乏 RPMI1640 培地で繰り返し培養し、生き残った細胞を通常培地で培養することを、90日間に亘って繰り返した。同様に、グルコース欠乏 RPMI1640 培地と通常培地を用いて上記と同様の培養を90日間に亘って繰り返した。

4. 研究成果

(1) PANC-1、A549、MCF7、HCT8CD44(+)/CD133(+)に Ru 360 を投与し、通常の RPMI1640 培地で培養した場合、48時間まではこれらの細胞に大きな変化は観察されなかった。これは、これらの細胞が、グルコースが豊富に存在する条件下においては、主にエネルギー代謝を解糖系に依存し、ミトコンドリア Ca²⁺の低下がエネルギー代謝に大きな影響を与えないためと考えられた。しかし、同様の条件の培養を継続すると、実験に用いた全てのがん細胞の大きさが小さくなることを観察した。これは、グルコースが枯渇してくると、ミトコンドリアを介する代謝への依存度が増すことにより、Ca²⁺の低下がより強く影響することを示唆していると思われる。

(2) 我々は、HCT8CD44(+)/CD133(+)細胞が、ABC トランスポーターである ABCB1 を強く発現し、ドキシソルピシンなどの抗がん剤を細胞外に排出することで、親株の HCT8 に比べて有意にドキシソルピシン耐性を獲得していることを明らかにしてきた (Goto et al., Stem Cells Int. 2020 Aug 12;2020:8868849. doi: 10.1155/2020/8868849.)。細胞外への抗がん剤排出を担う ABC トランスポーターのエネルギー源は ATP である。そこで、ミトコンドリアにおける ATP 産生に及ぼす Ca²⁺の影響を解析するために、HCT8CD44(+)/CD133(+)細胞に Ru 360 を前投与した後ドキシソルピシンを投与し、Ru 360 無投与の場合と比較してドキシソルピシンの細胞内蓄積量がどのような影響を受けるか、フローサイトメーターで解析した。その結果、Ru360 の前投与により、有意にドキシソルピシンの細胞内蓄積量が増加し、細胞死が有意に誘導されることを観察した。このことは、抗がん剤排出に必須である ATP の産生に、ミトコンドリアへの Ca²⁺流入が必

要であることを示唆していると共に、薬剤排出能の亢進が、抗がん剤耐性の重要な要因となっている細胞に対して、ミトコンドリアへの Ca^{2+} 流入を阻害することが殺細胞効果を増強し、抗がん剤耐性を克服する上で非常に重要であることを示唆している。また、PANC-1 に対するゲムシタピンの殺細胞効果に関しても相加的に増強することを観察した。

(3) 低栄養状態でも生存するがん細胞におけるミトコンドリア Ca^{2+} の役割を解析するために、低栄養状態でも増殖・生存することが可能な細胞の分離を試みた。膵臓がん細胞、PANC-1 細胞をグルタミン欠乏 RPMI1640 培地と通常培地で培養することで低栄養状態でも生き残る細胞を分離した。この細胞は、グルタミン欠乏培地中でも増殖能を有していた。通常培地を PBS で 10 倍に希釈した培地では、親株の PANC-1 は培養開始から 5 日後にはほとんど死滅したのに対し、この細胞は培養開始後 2 週間経てもほとんど死なないことを観察した。グルタミン欠乏培地を PBS で 10 倍に希釈した培地においても同様であった。興味深いことは、グルタミン欠乏培地を用いて分離したこの細胞が、貧グルコース状態でも生存することである。しかし、この細胞の栄養飢餓状態を生き残る機構に関しては不明であると共に、研究期間中にこの細胞を用いて、低栄養状態でも生存するがん細胞における、ミトコンドリア Ca^{2+} の役割を解析することは終了しなかった。なお、これまでに得られた知見を発表する論文の投稿準備を進めている。また、明らかにできなかった点を解明すべく、関連研究を続行している。

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	李 桃生 (Li Tao-sheng) (50379997)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授 (17301)	

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