

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ~ 2012
 課題番号：23780132
 研究課題名（和文）
 代謝状態の変換によるがん抑制効果
 研究課題名（英文）
 Anti-cancer effect by metabolic conversion
 研究代表者
 北浦 靖之 (KITAURA YASUYUKI)
 名古屋大学・生命農学研究科・助教
 研究者番号：90442954

研究成果の概要（和文）：

がん細胞は独特の代謝状態にあり、それを変換することにより細胞死を誘導できることから、本研究では、分岐鎖アミノ（BCAA）代謝促進による細胞死誘導効果と、その分子メカニズム、がん抑制効果について明らかにすることを目的とした。BCAA代謝を促進する薬剤のうち中鎖脂肪酸であるカプリル酸（炭素数8）を用いたところ、正常細胞に対する毒性が低い濃度でも、がん細胞に対して細胞死を誘導することを明らかにした。さらに、炭素数6から12の各種中鎖脂肪酸のがん細胞に対する細胞死誘導効果を調べたところ、炭素数12のラウリン酸で最も強い効果が示された。しかし、ラウリン酸のBCAA代謝促進効果はほとんどないことから、ラウリン酸による細胞死誘導は、BCAA代謝促進によるものではなく、別の経路により引き起こされる可能性が示唆された。さらに、ラウリン酸に不飽和脂肪酸を組み合わせることにより、細胞死誘導効果が促進されることを見いだした。この効果を様々ながん細胞を用いて調べたところ、がん細胞種により違いが見られ、また、活性化される細胞死誘導因子が異なることが示唆された。一方、それぞれの細胞に共通して脂肪滴の蓄積がみられたことから、その原因について解析したところ、ラウリン酸には長鎖脂肪酸の取り込みを促進する効果が認められた。また、ラウリン酸と様々な不飽和脂肪酸を用いて評価したところ、不飽和脂肪酸の不飽和度を大きくすることでがん細胞の生存率が著しく低下し、がん抑制効果が認められた。このことから、ラウリン酸と不飽和脂肪酸の組み合わせによる新たながん治療法として期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Shifting unique metabolism in cancer cells from glycolysis to glucose oxidation can decrease their cell viabilities. We investigated whether altering branched-chain amino acid (BCAA) metabolism also killed cancer cells. Medium-chain fatty acid, caprylate (C8) which activates BCAA metabolism induced cell death of cancer cells with no effect on normal cells. We found that the most effective MCFA was laurate (C12) which had no effect on BCAA metabolism. The treatment of laurate with oleate dramatically decreased the cell viabilities of several cancer cells. Laurate increased the uptake of oleate and the excess amount of intracellular oleate that induce cell death by lipotoxic stress response, which vary by cell type. Moreover, intraperitoneal administration of laurate with unsaturated fatty acid to Ehrlich ascite tumor-bearing mice significantly inhibited the accumulation of ascitic fluid in the peritoneal cavities and increased the survival rate of mice. These results suggest that the combination of laurate and unsaturated fatty acid has a great potential for the anti-tumor activity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：がん、脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は一般に正常細胞とは異なる独特の代謝状態にあり、主要なエネルギー源であるグルコースのほとんどを解糖系でのみ利用している。そして、解糖系の最終産物であるピルビン酸は乳酸に変換され、ミトコンドリアでの酸素を利用した酸化リン酸化による完全酸化がほとんど起こらない状態にある。ミトコンドリアはエネルギーを生産する細胞内小器官であると同時に、活性酸素種 (ROS) の産生や細胞死誘導因子を放出する細胞内小器官でもある。このようにがん細胞では細胞死が起こりにくく、増殖に好都合な状態である。

近年、このがん細胞特有の代謝状態を変換することにより、がん細胞の細胞死を誘導し、がん組織の萎縮に成功した研究が報告された。この研究では、ピルビン酸をアセチル-CoA に変換するピルビン酸脱水素酵素 (PDH: pyruvate dehydrogenase) を活性化して、がん細胞におけるピルビン酸から乳酸に変換する代謝状態をアセチル-CoA に変換することにより、TCA 回路による完全酸化と酸化リン酸化を活性化した。PDH はその特異的リン酸化酵素 PDH kinase (PDK) により不活性化される。PDK の阻害剤であるジクロロ酢酸 (DCA: dichloroacetate) を細胞に作用させると、PDH が活性化され、グルコースが TCA 回路により完全酸化される。その結果、グルコース代謝の変換が起こり、がん細胞の細胞死誘導に成功したのが上述の報告である。

また、グルコースだけでなく、一部のアミノ酸や脂肪酸も代謝されるとアセチル-CoA を生成し、TCA 回路に供給される。その中で、分岐鎖アミノ酸 (BCAA: ロイシン、イソロイシン、バリン) は、体内で酸化分解されやすいアミノ酸であり、運動などのエネルギー代謝が高まる時には分解が促進し、TCA 回路に対する補充効果をもつアミノ酸として知られている。BCAA 代謝の律速酵素は分岐鎖 α -ケト酸脱水素酵素 (BCKDH: branched-chain α -ketoacid dehydrogenase) であり、その特異的リン酸化酵素 (BDK: BCKDH kinase) により BCKDH 活性が阻害されることにより、BCAA 代謝が抑制される。BDK 活性を阻害し、BCAA 代謝を促進する薬剤として、高脂血症薬クロフィブレート、 α -クロロイソカプロン酸、中鎖脂肪酸であるカプリル酸が知られている。がん細胞にこれらの薬剤を作用させる、ま

たは BDK をノックダウンすることにより、細胞死が誘導され、がん細胞数が減少するという予備的知見を得ていた。

2. 研究の目的

本研究では、BCAA 代謝に注目し、グルコースとは別の経路で代謝を変換させることにより、TCA 回路を介した酸化リン酸化を促進させ、がん細胞の細胞死誘導が可能ではないかと考えた。そこで、BCAA 代謝促進による細胞死誘導効果とその分子メカニズムの解明、さらにマウスモデルを用いたがん抑制効果を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞死誘導効果の解析

BCAA 代謝を促進する薬剤としてクロフィブレート、 α -クロロイソカプロン酸、カプリル酸を用いた。使用するがん細胞は、ヒト T 細胞白血病由来細胞 Jurkat、ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa、ヒト繊維芽肉腫由来細胞 HT1080、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いた。また、代謝状態が、がん細胞と異なる増殖停止状態の細胞として、ヒト正常 2 倍体繊維芽細胞 MRC-5 をコンフルエントにし、増殖を停止させたものを用いた。これらの細胞をそれぞれ薬剤を含む培地で一定期間 (24-48h) 培養した後、MTT 法により細胞生存率を調べた。

(2) 細胞死誘導メカニズムの解析

アポトーシス実行因子である Caspase-3 の活性化、ミトコンドリアの膜電位の消失、細胞内活性酸素種 (ROS) の産生、脂肪滴の蓄積はそれぞれ特異的蛍光基質または蛍光プローブとフローサイトメトリーを用いて蛍光強度を検出した。また、小胞体ストレス反応因子の活性化は、それぞれ特異的抗体を用いた Western blotting により解析した。

(3) 脂肪酸の取り込みの解析

1 位の炭素を ^{14}C でラベルした脂肪酸 ([$1-^{14}\text{C}$] -C12, 16, 18:1) と各種脂肪酸を添加した培地で細胞を一定時間 (1-3h) 培養した後、細胞を回収し、液体シンチレーションカウンターで ^{14}C の放射活性を測定した。

(4) 移植がんモデルマウスに対する癌抑制効果の解析

Ehrlich マウス腹水癌モデルを用いた (ドナー細胞: Ehrlich、レシピエントマウス: ddY)。Ehrlich 細胞 (1×10^5 cells) を ddY マウス (7 週齢・雌) の腹腔内に移植し、翌日から 5 日間連続で薬剤を腹腔内に投与した後、一定期間おきに体重を測定するとともに、腹水がん発症率と生存率を調べた。

4. 研究成果

(1) 様々な細胞に対する BCAA 代謝促進剤の影響

HeLa、Jurkat、MRC-5 をクロフィブレート (CF)、カプリル酸 (C8) で処理し、24 時間後の細胞生存率を調べた。その結果、CF では正常細胞である MRC-5 においても細胞死誘導効果がみられたのに対し、C8 では MRC-5 ではその効果はみられず、がん細胞においてのみ細胞死誘導効果がみられた。また、様々な中鎖脂肪酸による細胞死誘導効果を調べたところ、ラウリン酸 (C12) が最も細胞死誘導効果が大きかった。

(2) ラウリン酸とオレイン酸の組み合わせによる影響

オレイン酸 (C18:1) などの不飽和脂肪酸はパルミチン酸 (C16) などの長鎖飽和脂肪酸の細胞死誘導効果を抑制する働きが認められるが、C12 などの中鎖脂肪酸に対する効果については不明である。そこで、C12 に C18:1 を組み合わせ、細胞を処理し、24 時間後の細胞生存率を調べた。その結果、C18:1 の共存では、長鎖脂肪酸である C16 の細胞死誘導効果が抑制され、過去の報告と一致した。しかしながら、中鎖脂肪酸である C12 においては、C16 とは反対に C18:1 との共存によって細胞死誘導効果が促進された。また、中鎖脂肪酸であるカプリン酸 (C10) についても、C18:1 との共存により細胞死がカプリン酸単独処理に比べ促進された。

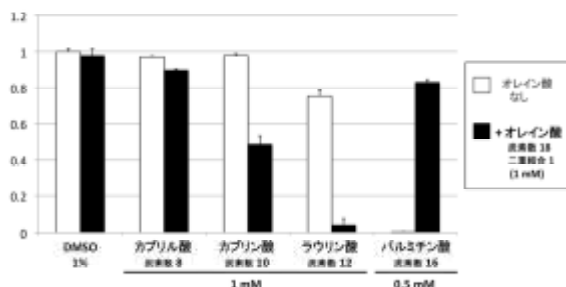


図 1. 各種脂肪酸による HeLa 細胞の細胞死誘導に対するオレイン酸の影響。48 時間後のコントロール (DMSO・オレイン酸なし) の生細胞数 = 1 とした場合のそれぞれ処理における細胞生存率を示す (n=3)。

(3) ラウリン酸とオレイン酸の組み合わせによる細胞死誘導メカニズムの解明

Jurkat 細胞においてはラウリン酸 (C12) にオレイン酸 (C18:1) を添加することで Caspase-3 の活性化が促進され、パルミチン酸 (C16) に C18:1 を添加すると Caspase-3 の活性化が抑制された。しかし、HepG2 細胞、HT1080 細胞では 8 時間の時点において、ほとんどの細胞で Caspase-3 の活性化がみられない、またはこれらの細胞の細胞死誘導経路に Caspase-3 の活性化が寄与する割合が小さいことが考えられた。

HepG2 細胞、Jurkat 細胞において、細胞死が誘導される C12+C18:1、C16 単独投与ではミトコンドリア膜電位の低下した細胞が増加し、ミトコンドリアを介した細胞死が引き起こされる可能性が示唆された。しかしながら、HT1080 細胞ではミトコンドリアの膜電位の変化はほとんどみられなかったことから、ミトコンドリアに障害がおこっておらず、HepG2 細胞、Jurkat 細胞とは異なる経路で、ミトコンドリア非依存的な細胞死が誘導されることも考えられる。

HT1080 細胞、Jurkat 細胞において、細胞死が誘導される C12+C18:1、細胞死が抑制される C16+C18:1 で ROS を産生する細胞の割合が増加した。よって、細胞死に ROS の産生が直接関係しているかは不明である。どちらも C18:1 を加えた場合に上昇しているため、C18:1 に他の脂肪酸と組み合わせる場合 ROS の産生を促す効果があるとも考えられる。一方、HepG2 細胞では、C12 で最も ROS を産生する細胞の割合が増加し、C16 では ROS の産生はみられなかったため、HepG2 細胞においては ROS の産生が細胞死に関与する割合が小さいことが考えられる。

HepG2 細胞、HT1080 細胞、Jurkat 細胞において、細胞死が誘導される C12+C18:1 においては著しく脂肪滴を細胞内に形成するが、C16 単独添加では脂肪滴を形成する量が少ないという対照的な結果を示した。そのため、脂肪滴の形成をうながすことで細胞死を抑制するという、C16 に C18:1 を添加した際に細胞死を抑制する原因として挙げられていた理由と一致しない結果となった。細胞死を抑制する C16+C18:1 添加より顕著に C12+C18:1 で脂肪滴の形成がみられたため、大過剰の脂肪滴の形成が細胞死に影響を及ぼすことも考えられるが、脂肪滴の形成量が細胞死に及ぼす影響は不明である。

HT1080 細胞では C12 単独、C12 と C18:1 同時添加により ATF4 が活性化されたが、CHOP が活性化は C12+C18:1 添加でのみ見られた。しかしながら C16 ではこれらの発現はみられなかった。また、HepG2 細胞においては、C12、C12 と C18:1 同時添加、C16 により ATF4 と CHOP の両方が活性化された。

(4) ラウリン酸の脂肪酸の細胞内取り込みに対する影響

HepG2細胞、HT1080細胞ともにラウリン酸(C12)の¹⁴C細胞内放射活性がパルミチン酸(C16)、オレイン酸(C18:1)に比べて低かったことから、長鎖脂肪酸にくらべて中鎖脂肪酸の取り込みは低いことが示唆された。

次に、C12による長鎖脂肪酸の取り込みに対する影響について調べたところ、C16にC12、C18:1を加えた場合、細胞内放射活性が高くなり、C18:1にくらべてC12のほうが高くなったことから、C16の細胞内への取り込みは、C16自身による影響は小さく、C12、C18:1で促進され、最もC12が強いことが考えられる。また、C18:1自身によりC18:1の取り込みが促進し、それよりもC12を組み合わせるほうが強く促進されること示唆された。

(5) ラウリン酸と種々の不飽和脂肪酸の組み合わせによる生細胞数の変化

ラウリン酸(C12)と様々な不飽和脂肪酸の組み合わせによる生存率を調べたところ、1価の不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18:1n9)、パルミトオレイン酸(C16:1)、バクセン酸(C18:1n11)、エイコセン酸(C20:1)の間では炭素数、二重結合の位置による効果の違いが見られなかった。一方、一価の不飽和脂肪酸であるC18:1に比べて、2価のリノール酸(C18:2)、3価の α -リノレン酸(α C18:3)、 γ -リノレン酸(γ C18:3)のほうが、より低濃度で強力にがん細胞の生存率を低下させる効果が見られ、その効果は不飽和度が大きいほど強いことが明らかとなった。

また、様々ながん細胞を用いて、同様に効果を調べたところ、すべてのがん細胞においてC12との組み合わせによる細胞死誘導効果の相乗効果が見られた。しかし、HepG2はC12単独でも効果がある一方、A549やCaco2は不飽和脂肪酸の種類により大きな違いが見られないなど、がん細胞種により細胞死誘導効果に違いが見られた。

(6) ラウリン酸と不飽和脂肪酸の組み合わせによるがん抑制効果

Ehrlichマウス腹水がんモデル(ドナー細胞:Ehrlich、レシピエントマウス:ddY)を用いて、*in vivo*での抗腫瘍効果を評価した。ラウリン酸(C12)とオレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、または α -リノレン酸(α C18:3)の組み合わせによるがん抑制効果を調べたところ、C12とC18:1の組み合わせでは、腹水がん発症(腹水の蓄積を伴う体重増加)の抑制効果はみられず、C18:2投与ではコントロール(PBS)に

比べ腹水がん発症までの期間が短く、発症の割合が高くなり、C12との組み合わせにより悪化した。一方、 α C18:3はC12との組み合わせにより、顕著な腹水がん抑制効果が認められた(図2)。

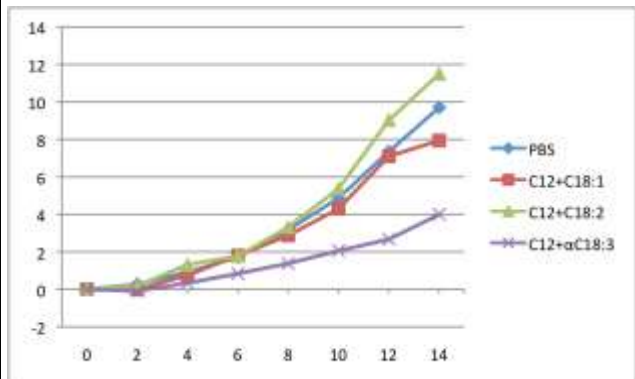


図2. ラウリン酸(C12)とオレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)、または α -リノレン酸(α C18:3)の組み合わせによるがん抑制効果。Ehrlich腹水がん細胞移植後の体重変化を示す(n=8)。

今後、*in vivo*での効果を検証するためには、脂肪酸の組み合わせとその投与方法についてさらなる検討が必要である。また、今回用いたがん細胞の中で、繊維芽肉腫および肝癌由来細胞において効果が見られたことから、上記投与方法を検討したのち、これらのがん発症モデルマウスを用いて抗腫瘍効果を確認していく予定である。また、がん細胞種により効果が異なる原因について、脂肪酸刺激により活性化される細胞内シグナル伝達経路、遺伝子発現などについても調べる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

現在、投稿準備中。

〔学会発表〕(計4件)

(1) ラウリン酸による癌細胞の細胞死誘導効果. ○井上 花菜¹⁾、北浦 靖之¹⁾、青山 敏明²⁾、下村 吉治¹⁾. ⁽¹⁾名古屋大・生命農、⁽²⁾日清オイログループ株式)
第65回日本・栄養食糧学会大会 2011年5月・東京

(2) Oleate promotes laurate-induced apoptosis of cancer cells.

Yasuyuki Kitaura¹⁾, Kana Inoue¹⁾, Toshiaki Aoyama²⁾, Yoshiharu Shimomura¹⁾.

⁽¹⁾ Nagoya University, ⁽²⁾ The Nisshin Oil Group, Ltd)

The XI Asian Congress of Nutrition (ACN)

2011年7月・シンガポール

(3) ラウリン酸と多価不飽和脂肪酸との組み合わせによる癌抑制効果

○ 河東 直規、井上 花菜、松下 なほみ、北浦 靖之、下村 吉治 (名大院 生命農・応用分子生命科)

第67回日本・栄養食糧学会大会 2013年5月・名古屋

(4) The effect of combination of Lauric and Oleic acids on lipotoxicity.

Yasuyuki Kitaura, Kana Inoue, Naoki Kato, Nahomi Matsushita, Yoshiharu Shimomura (Nagoya University)

IUNS 20th International Congress of Nutrition 2013年9月・グラナダ (スペイン)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 細胞死誘導効果を有する中鎖飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸を含有する組成物

発明者: 下村 吉治、北浦 靖之、井上 花菜

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類:

番号: 特許出願2011-93212

出願年月日: 2011年4月19日

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~nutr/shimomura/yan_jiugurupuTop.html

名古屋大学新技術説明会 2011年11月・東京

「異なる脂肪酸を組み合わせることで強力にがん細胞を死滅させる」

第4回名古屋大学医学・バイオ系知財フェア 2011年12月・名古屋

「中鎖脂肪酸と不飽和脂肪酸による癌細胞死誘導に対する相乗効果」

日刊工業新聞 2012年1月20日

中部地区医療・バイオ系シーズ発表会 2012年12月・名古屋

「異種脂肪酸の組み合わせによる癌細胞死誘導効果」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北浦靖之 (KITAURA, Yasuyuki)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号: 90442954