

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659369

研究課題名(和文)細胞内ATPセンサーを用いた癌幹細胞の動態解析法の開発

研究課題名(英文)Development of the analytical method of the cancer stem cell using the ATP sensor in the cell

研究代表者

藤澤 浩一 (FUJISAWA, Koichi)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00448284

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内エネルギー物質であるATPのダイナミクス解析とエネルギー代謝に関わる分子の解析を検討した。エネルギー代謝に関わる遺伝子発現の調節の解析ではアデニル酸キナーゼアイソザイムの発現を解析した。またフラックスアナライザーを用いた評価でアデニル酸キナーゼのノックダウンで酸素消費速度が変化することがわかり、メタボローム解析ではフマル酸などのTCAサイクルに含まれるメタボライトの変化が認められた。代謝におけるアデニル酸キナーゼの重要性が示され、アデニル酸キナーゼの一部をATPセンサーとして用いることができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the analysis of energy metabolism of the ATP. Adenylate kinase isozyme expression was related to energy metabolism. In addition, an oxygen consumption rate changed by a knockdown of the adenylate kinase was evaluated by using the flux analyzer, and the change of the metabolic syndrome light included in TCA cycles such as the fumaric acid was recognized by the metabolome analysis, and importance of the adenylate kinase in the metabolism was shown.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：アデニル酸カイネース

1. 研究開始当初の背景

生体においてエネルギー代謝は非常に重要であるが不明な点が多い。解糖系の亢進と酸化的リン酸化の低下は癌細胞や幹細胞で認められ、エネルギー代謝の変化が増殖能、未分化性、老化に関わっていることが近年示唆されている。

アデニル酸キナーゼ(AK)は、生体が増殖、分化、運動、代謝などの機能を正常に発揮するために必要な細胞内アデニンヌクレオチドの恒常性維持に重要な役割を担う酵素であり、細菌から動物にいたるまで広く生物界に分布する。

脊椎動物では複数のアイソザイムが存在し、それぞれ組織分布、並びに細胞内局在性が異なる。ミトコンドリアマトリックスに局在するアイソザイムは薬剤により誘導されること、癌の悪性化などに関与していることがこれまでに報告されているが、その詳細は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では細胞内エネルギー物質であるATPの恒常性維持に関わるアデニル酸キナーゼに着目し研究を行った。エネルギー代謝に関わる遺伝子発現の調節と各種阻害薬により、エネルギー代謝を改変し、細胞増殖性および未分化能を変化させるなどのエネルギー代謝制御により、新たな肝癌の治療法につなげることを目的とした。

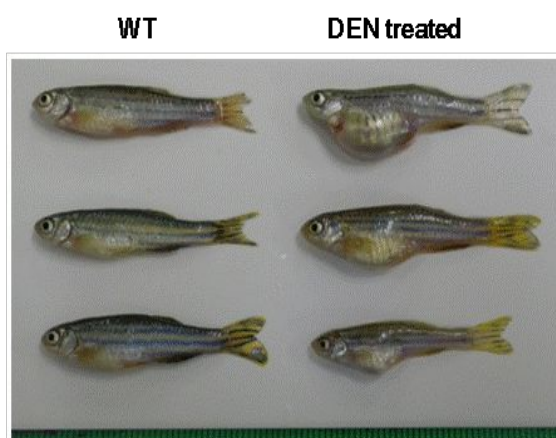
3. 研究の方法

アデニル酸キナーゼの発現解析はリアルタイムRT-PCR、マイクロアレイ解析およびウエスタンブロッティングで評価した。培養細胞を用いてshRNAによるノックダウンおよびCMVプロモーターを用いて過剰発現させたStable transformantを作製した。得られた細胞を用いてMTSアッセイで薬剤耐性の評価を行った。活性酸素種の解析はCellRoxを用

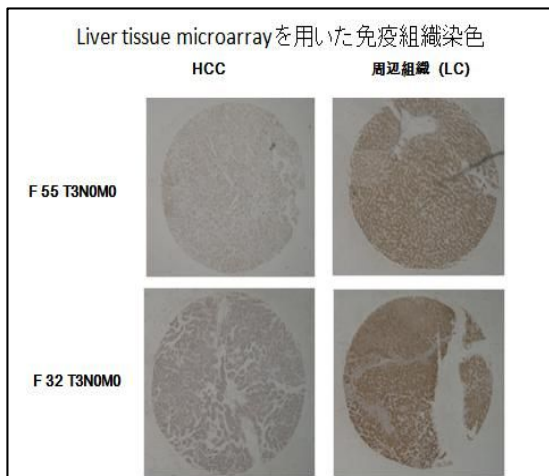
いてフローサイトメトリーで評価した。腫瘍皮下移植実験はヌードマウスに 1×10^6 個の細胞をマトリゲルと共に移植後腫瘍サイズを測定した。細胞の代謝の評価は細胞外フラックスアナライザーを用いて、Mitostress test, Glycostress testを行った。メタボローム解析はCE-TOFMSを用いて代謝物質を測定した。

4. 研究成果

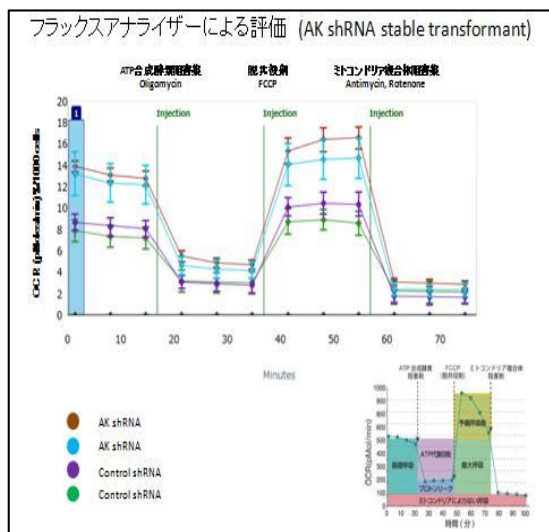
細胞内エネルギー物質であるATPのダイナミクス解析とエネルギー代謝に関わる分子の解析を検討した。エネルギー代謝に関わる遺伝子発現の調節の解析ではアデニル酸キナーゼアイソザイムの発現を解析した。アデニル酸キナーゼはATP, AMP, ADPのゼブラフィッシュではヒトの抗体がうまくクロスリアクトしなかったため、ウサギでペプチド抗体を作製した。得られた抗体はウエスタンブロッティングで確認し使用可能なものであることが確認できた。生後1年のゼブラフィッシュにジエチルニトロサミン(DEN)を投与し、数か月飼育し作製した肝癌での発現を検討したところ、癌部での発現低下が認められた(下図)。



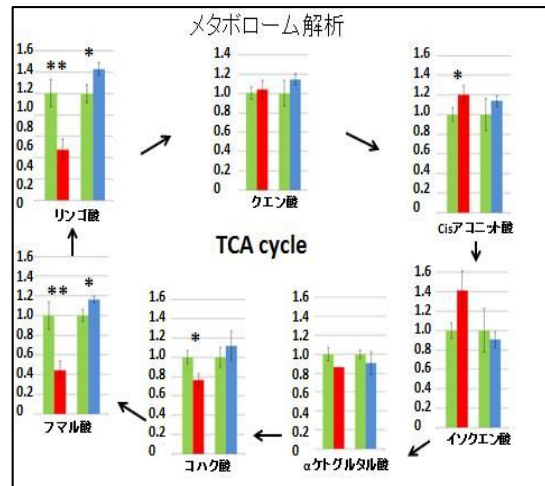
またヒトのサンプルでも評価したところ同様の結果が得られた(下図)。



また肝実質細胞と各種癌細胞でのアデニル酸キナーゼアイソザイムの発現を調べたところ、アイソザイムによって癌細胞で増加するものや低下するものがあることがわかった。さらに癌細胞セルラインでの発現解析を行ったところ、アデニル酸キナーゼアイソザイムのなかにはミトコンドリアマトリックスに局在しており、低酸素や DF0 によって発現が増加するものが存在することがわかった。低酸素、DF0、CoCl₂、四塩化炭素、CDDP やドキソルピシンなどの抗癌薬によってアイソザイムの発現が増加することから、アイソザイムは酸化ストレスを抑える働きがあること、癌の抗癌剤に対する耐性、転移などの悪性化などに関わっていることが示唆された。またフラックスアナライザーを用いた評価でアデニル酸キナーゼのノックダウンで酸素消費速度が変化することがわかった(下図)。



メタボローム解析ではフマル酸などの TCA サイクルに含まれるメタボライトの変化が認められ、代謝におけるアデニル酸キナーゼの重要性が示された(下図)。



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)

[学会発表](計1件)

藤澤 浩一、野間 隆文、高見 太郎、山本 直樹、寺井 崇二、坂井田 功
肝臓におけるアデニル酸キナーゼアイソザイムの低酸素耐性、薬剤耐性に関わるメカニズムの解明

消化器とフリーラジカル研究会

2014.3.8

京都都ホテル(京都)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
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：なし

6．研究組織

(1)研究代表者

藤澤 浩一（FUJISAWA, Koichi）
山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00448284

(2)研究分担者

寺井 崇二（TERAI, Shuji）
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00332809

高見 太郎（TAKAMI, Taro）
山口大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60511251

山本 直樹（YAMAMOTO, Naoki）
山口大学・大学教育機構・講師
研究者番号：90448283