

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16564

研究課題名(和文) 膵管癌における $\rho 0$ 形質とゲムシタピン耐性獲得との関連性の解析

研究課題名(英文) Role of $\rho 0$ phenotype on acquisition of gemcitabine resistance in pancreatic ductal carcinoma

研究代表者

谷 里奈 (Fujiwara-Tani, Rina)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20783872

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)：ゲムシタピン持続処理により樹立されたゲムシタピン耐性株は、ミトコンドリアDNAに部分的な欠失をしめす部分 $\rho 0$ 形質を有していた。この細胞は、ゲムシタピン処理により、ミトコンドリア膜電位の低下と酸化的リン酸化の抑制を介してゲムシタピンにより誘導されるミトコンドリアROS産生を抑制することによりゲムシタピン耐性を獲得していた。このように、抗癌剤耐性は抗癌剤自身が有するDNA毒性による癌細胞の部分 $\rho 0$ 化が重要な役割を果たすことが示唆された。この部分 $\rho 0$ 形質を標的とする治療法を検討することにより、より有効な化学療法が実現されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞における抗癌剤耐性の獲得に、抗癌剤の有するミトコンドリアDNAに対する毒性に起因する部分 $\rho 0$ 形質の獲得が重要な役割を果たすことが示された。この結果は、抗癌剤による化学療法そのものが耐性を惹起する内在的危険性を有することを、その機序を明らかにしたものであり、重要な知見と考えられる。今後は部分 $\rho 0$ 形質の獲得の抑制、あるいは、部分 $\rho 0$ 形質を克服する治療法を開発することにより、抗癌剤耐性の獲得を抑制し、より効果的な化学療法を可能にすることが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：The gemcitabine-resistant cell line established by continuous gemcitabine treatment had a partial $\rho 0$ phenotype, indicating a partial deletion in mitochondrial DNA. These cells acquired gemcitabine resistance by suppressing gemcitabine-induced mitochondrial ROS production through reduction of mitochondrial membrane potential and inhibition of oxidative phosphorylation by gemcitabine treatment. Thus, it was suggested that acquisition of the partial $\rho 0$ phenotype due to DNA toxicity of the anticancer drug itself plays an important role in anticancer drug resistance. It is hoped that more effective chemotherapy will be realized by investigating therapies that target this partial $\rho 0$ phenotype.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵管癌 ゲムシタピン 薬剤耐性 ミトコンドリアDNA 部分 $\rho 0$ 形質 酸化的リン酸化 活性酸素種

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は男女がん死亡の4位を占め、近年も増加を続け、予後不良の難治癌として知られている。膵癌において、診断時80%の症例はstage IVであり、治癒切除率は低く、化学療法が膵癌の治療においては特に重要性が高い。一方、ゲムシタビンは膵癌における1st lineの抗がん剤であるが、耐性が治療上の問題となっている。化学療法剤によりミトコンドリアDNAにも障害がもたらされることにより、 $\rho 0$ 化が誘導され、抗がん剤耐性を惹起し、さらに悪性形質を亢進させる可能性を示唆している。これまでに、HeLa細胞にdoxorubicinによりミトコンドリアDNA損傷がもたらされたとの報告がある(Singh KK, Oncogene, 1999)が、ゲムシタビンによるミトコンドリアDNA損傷は未報告である。

2. 研究の目的

膵管癌の臨床において、ゲムシタビン投与中はコントロールされていた病勢が耐性出現とともに他剤投与によっても制御不能になることはしばしば経験されることであり、ゲムシタビンはどのようにしてがん細胞に $\rho 0$ 形質を誘導するのか、および、 $\rho 0$ 細胞はゲムシタビンを含めた抗がん剤耐性を有するのか、の2点を解明することにより、抗がん剤耐性、悪性形質亢進、 $\rho 0$ 化を結ぶメカニズムが明らかとなり、ゲムシタビン耐性獲得の予防および耐性解除の方策の確立につながると考えられる。

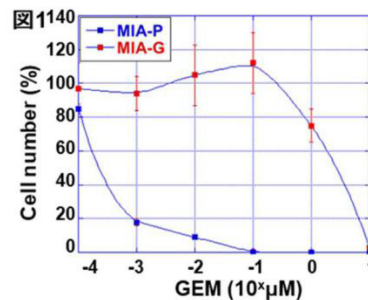
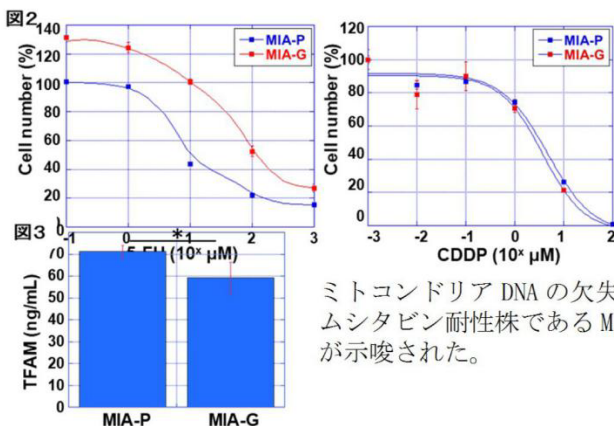
3. 研究の方法

本研究では、以下の5点について解明することを目標とする。1. $\rho 0$ 化によりゲムシタビン耐性が獲得されるか、2. ゲムシタビン耐性に関連する $\rho 0$ 化に伴う遺伝子発現や代謝変化は何か、3. $\rho 0$ 化に伴う悪性形質亢進の原因は何か、4. $\rho 0$ 化はゲムシタビン以外の薬剤耐性にも関与するのか、5. ゲムシタビンががん細胞の $\rho 0$ 化を誘導するのか。

4. 研究成果

(1) ゲムシタビン耐性株 MIA-G は部分 $\rho 0$ 形質を有する

本研究では、ゲムシタビン持続処理によりヒト膵管癌細胞株 MIA-PaCa-2 (MIA-P) からすでに樹立したゲムシタビン耐性株 MIA-G を用いて解析を行った。MIA-G は図1のように親株 MIA-P に比較し高いゲムシタビン耐性を示した。



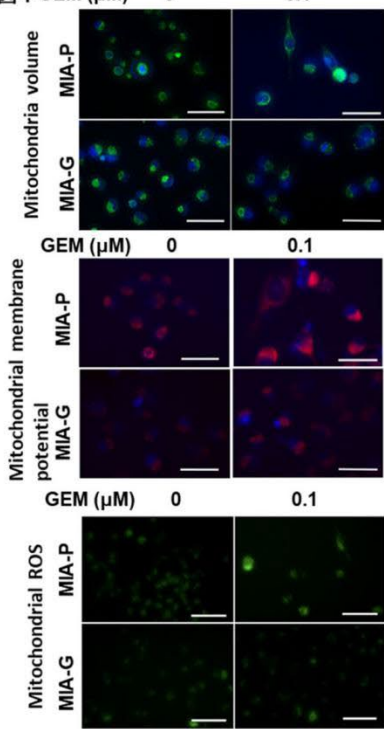
MIA-G 図2のように5-FUに対しても耐性を示したが CDDP に対しては耐性を有していなかった。

MIA-G は図3に示すようにTFAM発現は低下しており、EtBrにより染色されるミトコンドリアDNAは減少していたが、狭義の $\rho 0$ 細胞のようなミトコンドリアDNAの欠失は認められなかった。このことから、ゲムシタビン耐性株であるMIA-Gは部分的な $\rho 0$ 形質を有する可能性が示唆された。

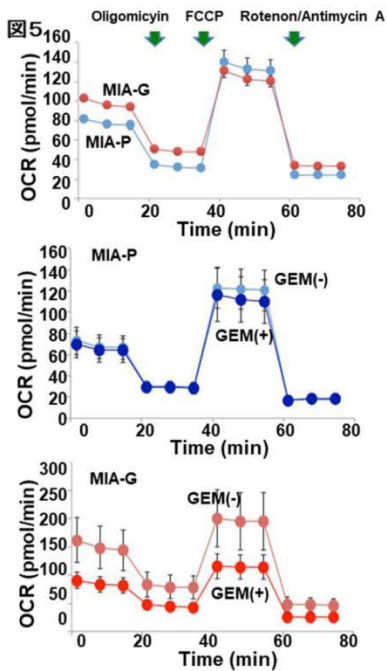
(2) ゲムシタビン耐性株 MIA-G のエネルギー代謝

次に、ミトコンドリアDNAに障害を有するMIA-Gのエネルギー代謝の特徴を検討した。図4のように、MIA-GはMIA-Pとミトコンドリア量に有意な変化は認められなかった。しかし、MIA-Gではミトコンドリア膜電位とミトコンドリアROSは減少していた。興味深いことに、MIA-Pではゲムシタビン処理により、ミトコンドリア膜電位は亢進し、ミトコンドリアROSが増大したのに対し、MIA-Gでは、ゲムシタビン処理によりミトコンドリア膜電位は低下し、ミトコンドリアROSも減少した。このような、定常状態におけるミトコンドリアエネルギー代謝の差異、および、ゲムシタビン処理時の反応の差異が部分 $\rho 0$ 形質に関連する可能性が認められた。

図4 GEM (μM) 0 0.1



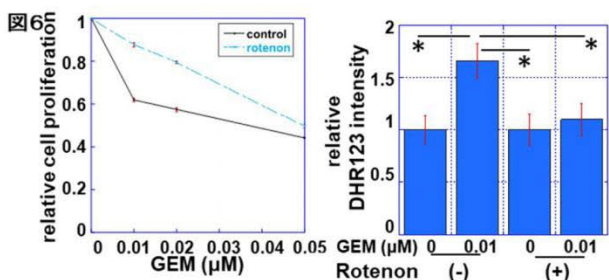
さらに、Flux 解析により MIA-G と MIA-P のエネルギー代謝を比較すると、図 5 のように定常状態では MIA-G は



MIA-P と酸化リン酸化に目立った差異は認められないのに対し、ゲムシタピン処理によっても MIA-P が酸化リン酸化を維持したのに対して、MIA-G では酸化リン酸化は抑制されていた。

このゲムシタピン処理時のミトコンドリア膜電位の低下と酸化リン酸化の抑制がミトコンドリア ROS 産生低下をもたらしたため、ゲムシタピン耐性を誘導したと考えられた。

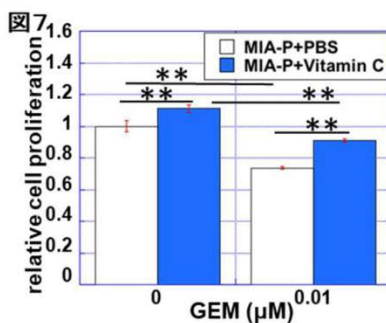
さらに、酸化リン酸化の抑制がゲムシタピン耐性を有するかを確認するために、MIA-P を電子伝達系複合体 I の阻害剤であるロテノンで処理し、ゲムシタピン感受性の変化を検討した。



すると図 6 のように、ロテノン処理により MIA-P にゲムシタピン耐性が誘導された。このとき、ミトコンドリア ROS レベルを検討すると、ロテノン処理によりゲムシタピン処理時に見られたミトコンドリア ROS の増大が消失していた。

さらに、ミトコンドリア ROS の抑制がゲムシタピン耐性を誘導するか

を検討するため、図 7 のように MIA-P を抗酸化剤であるビタミン C で処理したところ、ゲムシタピン処理による増殖抑制が回復することが確認された。このように、ゲムシタピンの細胞毒性にはミトコンドリア ROS が重要な役割を果たしており、ミトコンドリア DNA の部分的な障害を有する部分 ρ0 形質は、ミトコンドリア膜電位の低下と酸化リン酸化の抑制により、ゲムシタピンによるミトコンドリア ROS 産生を低下させゲムシタピン耐性を誘導することが明らかになった。



結論

以上の結果から、目的に示した 5 点の疑問に対して以下のような解答が得られた。

1. ρ0 化によりゲムシタピン耐性が獲得されるか：部分 ρ0 化は耐性を誘導する
2. ゲムシタピン耐性に関連する ρ0 化に伴う遺伝子発現や代謝変化は何か：酸化リン酸化の抑制が認められた
3. ρ0 化に伴う悪性形質亢進の原因は何か：ミトコンドリア ROS 産生低下が重視される
4. ρ0 化はゲムシタピン以外の薬剤耐性にも関与するのか：5-FU 耐性も誘導されており多剤耐性に関与する可能性が示唆された
5. ゲムシタピンががん細胞の ρ0 化を誘導するのか：ゲムシタピン持続処理により部分 ρ0 形質が獲得されている。このことは、DNA 障害をもたらす抗がん剤に共通して部分 ρ0 形質を誘導する可能性があり、薬剤耐性を惹起する危険性が示唆された。

このように、抗癌剤耐性は抗がん剤自身が有する DNA 毒性による癌細胞の部分 ρ0 化が重要な

役割を果たすことが示唆された。この部分 ρ 0 形質を標的とする治療法を検討することにより、より有効な化学療法が実現されることが期待される。

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24601
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K19915
研究課題名（和文）悪液質におけるクレアチン・サイクル障害の検討

研究課題名（英文）Role of creatine cycle in cancer cachexia

研究代表者

後藤 桂 (Goto, Kei)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10469554

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）：クレアチン・サイクルはミトコンドリア内のmtCKと細胞質内のCKBにより、ミトコンドリアで産生されたATPをリン酸化クレアチンの形で細胞質に移送する経路で、第3のエネルギー代謝経路として位置づけられている。大腸癌細胞でCKをDNFBで阻害すると、腫瘍増殖や幹細胞性が低下し、さらにリン酸化シグナル経路が抑制された。骨格筋細胞においては、mtCKやCKBは骨格筋分化シグナルを活性化するp38のリン酸化に関与しており、CKBの発現誘導は悪液質による骨格筋成熟障害を回復させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、クレアチン・サイクルが骨格筋分化と成熟に重要な役割を果たしていることが明らかになった。癌においてはクレアチン・サイクルの抑制は癌を抑制するが、骨格筋においても筋成熟度の低下を招く。しかし、クレアチン・サイクルの活性化は悪液質による骨格筋障害を改善する。これらの結果から、クレアチン・サイクルの骨格筋選択的な活性化により、がん性サルコペニアの改善をもたらすことが可能であり、重要な分子標的と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The creatine cycle is a pathway in which ATP produced in mitochondria is transferred to the cytoplasm in the form of phosphocreatine by mtCK in mitochondria and CKB in the cytoplasm. Then the creatine cycle is regarded as a third energy metabolism pathway. Inhibition of CKs with DNFB in colon cancer cells reduced tumor growth and stemness, and further inhibited the phosphorylation signaling pathways. In skeletal muscle cells, mtCK and CKB are involved in phosphorylation of p38, which activates skeletal muscle differentiation signaling. Induction of CKB expression restored cachexia-induced skeletal muscle maturation defects.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：クレアチン・サイクル CKB mtCK がん性悪液質 がん性サルコペニア

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん悪液質およびがん性サルコペニアは、進行癌患者に高頻度に見られ、患者の QOL を障害し治療への反応を低下させる。その中心的な病態として骨格筋のエネルギー代謝障害が重視される。われわれは、エネルギー代謝障害の一因としてクレアチン・サイクルに注目した。酸化的リン酸化からの ATP によりリン酸化されたクレアチンの高エネルギー化合物であるホスファゲンは、クレアチン・サイクルによりミトコンドリアで生成され細胞質に移送されエネルギー源として貯蔵される。クレアチンは骨格筋とがん細胞の両者が必要とされ、両者の競合の結果骨格筋にクレアチン・サイクルの障害が生じエネルギー代謝を惹起すると考えられる。一方、腫瘍微小環境は低グルコース条件にあり、その状況下で抗がん剤に対する感受性を研究し、低グルコース環境に対する耐性機序を解明することは重要である。近年クレアチンキナーゼが糖代謝を介し癌の増殖及び転移に関係するとの報告がなされてきている。

クレアチン・サイクルとは、クレアチンがミトコンドリア内でミトコンドリア・クレアチンキナーゼ (MTCK) により高エネルギー化合物であるホスホクレアチンになり細胞質に移行し、細胞質でクレアチン・キナーゼ (CK あるいは CKM) によりホスホクレアチンからクレアチンに戻るサイクルで (上図)、このサイクルによりミトコンドリア内で酸化的リン酸化により ATP の形で産生されたエネルギーが細胞質に移送される (Barclay CJ, J Muscle Res Cell Motil, 2017)。ホスホクレアチンはいわゆるホスファゲンとして知られ、ATP と異なり安定でなおかつ急速なエネルギー消費に対応できるエネルギー源である (Zervou S, PLoS One, 2017)。骨格筋においては、ホスファゲンは高負荷運動時の解糖系によるエネルギー産生が ATP の減少に伴う酸化的リン酸化にエネルギー産生がシフトする際に、ATP を補充するのに用いられる (Wallimann T, Amino Acids, 2011)。

このクレアチン・サイクルのエネルギー担体となるクレアチンは、骨格筋・がん細胞ではデオボ合成系は乏しく、肝で生成され血行性に輸送されるクレアチンを利用している (Koretsky AP, Physiol Rev, 1995)。一方、がん細胞ではクレアチン代謝が亢進しており (Bera S, FEBS J, 2008)、がん細胞におけるクレアチンと CK レベルは悪性度と相関する (Patra S, Amino Acids, 2012)。このため、がん患者においてはがん細胞によるクレアチン消費が亢進し、肝におけるクレアチン産生、および、骨格筋におけるミトコンドリア機能の障害が惹起され (Bera S, FEBS J, 2008)、骨格筋におけるクレアチン・サイクルの障害が、悪液質・がん性サルコペニアの一因となっていると考えられる。骨格筋におけるクレアチンをエネルギー代謝の観点から検討した研究は散見されるが、がん性筋萎縮との関連をがん細胞と比較検討したものは認められない。

2. 研究の目的

本研究では、「エネルギー代謝に重要な役割を果たすクレアチン・サイクルが、担がん体ではがん細胞におけるクレアチン・サイクルの亢進の影響を受けて骨格筋においては障害されており悪液質を惹起している」との仮説を証明し、クレアチン・サイクルを標的化することにより悪液質・がん性サルコペニアの予防・治療に結びつけることを目標とする。

3. 研究の方法

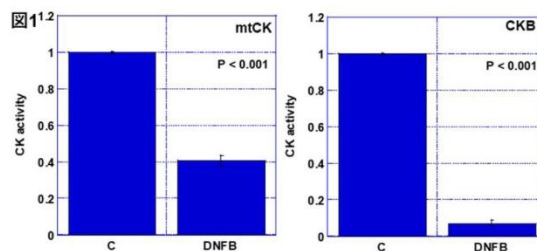
上記目標の達成のため、これまでに樹立したマウス悪液質モデルを用いてがん性筋萎縮の病態をシュミレートし、以下の5点について検討を行う。

- (1) 担がん体における骨格筋クレアチン代謝障害の評価
- (2) 担がん体における骨格筋クレアチンサイクルの障害の評価
- (3) クレアチン・サイクル促進の悪液質・がん性サルコペニアおよびがんへの影響
- (4) クレアチン・サイクル阻害の悪液質・がん性サルコペニアおよびがんへの影響
- (5) クレアチン・サイクル標的化とエネルギー代謝阻害剤との併用による悪液質・がん性サルコペニアおよびがんへの影響

4. 研究成果

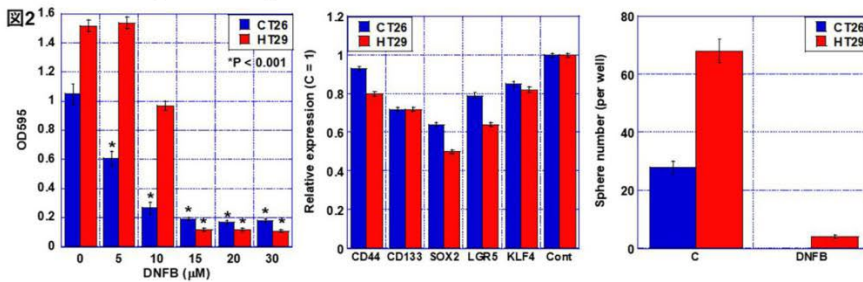
1. がん細胞におけるクレアチン・サイクルの役割

われわれは、ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) が、細胞質内の CKB、および、ミトコンドリア内の mtCK のいずれに対してもその活性を抑制することを見出した (図 1)。

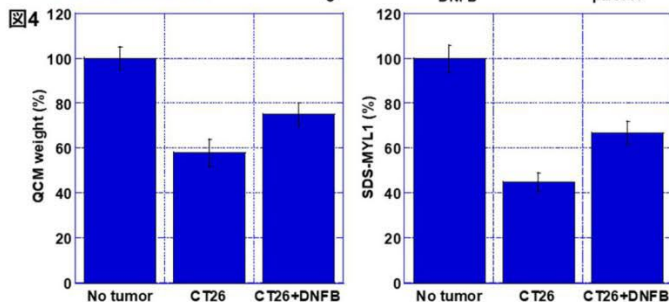
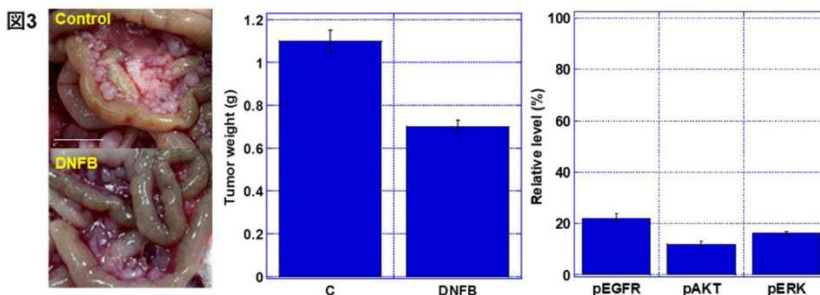


ヒト大腸癌細胞株 HT29 およびマウス大腸癌細胞株 CT26 を DNFB で処理すると、図 2 のように濃度依存性の増殖抑制、幹細胞マーカー発現の減少、および、スフェア形成能の著減が認めら

れた。このことから、がん細胞がクレアチン・サイクルに、増殖及び幹細胞性の点で強く依存していることが考えられた。



さらに、DNFB で前処理した CT26 細胞を同系の BALB/c マウスに腹腔内接種し、腹膜播種悪液質モデルを作製した。このとき、図 3 のように腫瘍増殖は抑制された。このとき、大腿四頭筋 (QCM) 重量、および、骨格筋成熟度の指標である SDS 可溶性ミオシン軽鎖 1 (SDS-MYL1) は、腫瘍群 (CT26) に比較し、いずれも CT26+DNFB 群では改善していたが、腫瘍減少に伴う変化の可能性が考えられた (図 4)。なお、腫瘍においては DNFB 処理により主要なリン酸化シグナル経路である、EGFR, AKT, ERK1/2 のいずれにおいてもリン酸化レベルが著明に低下していた (図 3) このことは、クレアチン・サイクルで、ミトコンドリア内から細胞質に移行したリン酸化クレアチンが、リン酸化シグナル経路に対する ATP の供給源となっている可能性が示唆された。



2. 骨格筋細胞におけるクレアチン・サイクルの役割

骨格筋におけるクレアチン・サイクルの役割をより明瞭にするため、マウス骨格筋芽細胞 C2C12 を用いて、in vitro で検討を行った。

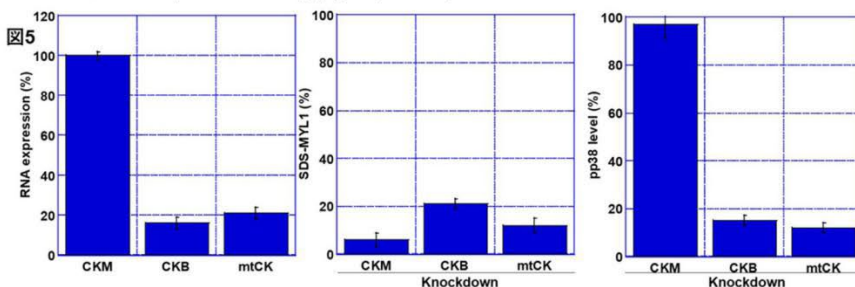
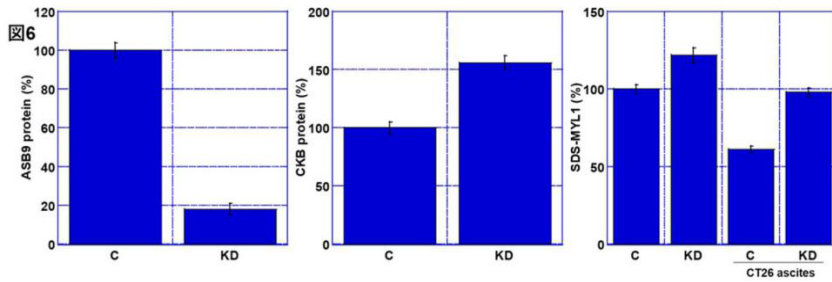


図 5 のように、C2C12 細胞における CKB および mtCK の発現レベルは、CKM に比較し当然低かった。これに対して、CKM, CKB, および mtCK をそれぞれノックダウンした時の筋成熟度を検討すると、CKB および mtCK をノックダウンしても、CKM ノックダウンと同等の成熟度の低下が認められ、クレアチン・サイクルが骨格筋成熟に重要な役割を果たしていることが明らかになった。この原因として、がん細胞で見られたクレアチン・サイクルのリン酸化シグナル経路に対する作用が関連することが考えられた。そこで、骨格筋分化に重要な役割を果たす MyoD,

MEF2, E47, MRF4 などのリン酸化シグナル経路の上流に位置する p38 のリン酸化状態を検討した。すると、CMK ノックダウンではリン酸化 p38 (pp38) レベルに変化は認められなかったが、CKB および mtCK ノックダウンでは pp38 レベルは著明に減少した。このことから、クレアチン・サイクルは骨格筋分化シグナルの伝達に重要な役割を果たしていることが示された。

これらの知見から、クレアチン・サイクルを活性化することにより骨格筋成熟を促進することが可能であると考えられた。CKB はユビキチン化により分解されることが知られている。そこで、CKB ユビキチンリガーゼである ABS9 をノックダウンし、その影響を検討した (図 6)。



ABS9 をノックダウンすると、CKB タンパクレベルは増加した。それに伴って、SDS-MYL1 レベルも増加した。さらに、C2C12 細胞を CT26 腹膜播種モデルの腹水で処理した *in vitro* 悪液質モデルでは、SDS-MYL1 は約 60%まで低下したのに対し、ABS9 をノックダウンすると SDS-MYL1 レベルはほぼ正常レベルに回復した。

これらの知見から、クレアチン・サイクルは骨格筋の成熟に必須の役割を果たしており、悪液質においてもその改善をもたらすキーファクターとなることが示唆された。