メチオニン制限が膵癌に対する抗TRAIL-R2療法の有効性に与える影響の検討

横浜市立大学医学部　消化器・腫瘍外科学

三　宅　謙太郎

Ⅰ　要　　旨

【背景・目的】

ヒト腫瘍細胞はその増殖にメチオニンを要し、正常細胞に比べてメチオニン依存性が高い。近年、遺伝子発現解析により、メチオニン制限が様々な癌における tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 2（TRAIL-R2）の発現を増加させることが報告されているが、膵癌における報告はない。メチオニン制限がTRAIL-R2の発現、および抗TRAIL-R2抗体であるtigatuzumabの抗腫瘍効果に与える影響について検証した。メチオニン制限は*in vitro*でヒト膵癌細胞株MIA PaCa-2およびBxPC-3におけるTRAIL-R2の発現を増加させ、tigatuzumabにより誘導されるカスパーゼ活性やアポトーシスを増強した。またTRAIL-R2の発現を抑制するMAGED2タンパクが、メチオニン制限により減少した。一方、ヒト胎児包皮由来正常線維芽細胞株Hs27では、メチオニン制限によるTRAIL-R2の発現増加やMAGED2の発現減少はみられなかった。MIA PaCa-2を用いた同所移植膵癌マウスモデルでは、メチオニン分解酵素（rMETase）によるメチオニン制限は腫瘍のTRAIL-R2の発現を増加させ、tigatuzumabによるアポトーシスを増強した。またrMETaseとtigatuzumabの併用療法群のみで腫瘍の縮小を認めた。メチオニン制限は膵癌においてTRAIL-R2の発現を増加することで、抗TRAIL-R2療法の効果を増強することが示唆された。

Ⅱ　目　　的

メチオニンはタンパク質合成、DNAメチル化など多くの役割を担う必須アミノ酸である。ヒト腫瘍細胞はその増殖にメチオニンを要し、正常細胞に比べてメチオニン依存性が高い。メチオニン制限は腫瘍細胞のアポトーシス誘導や、S期後期・G2期で細胞周期の可逆的停止を引き起こし、抗腫瘍作用を示すことが知られている。メチオニン制限が腫瘍にもたらす分子生物学的変化には未だ不明な点が多いが、近年メチオニン制限と化学療法や放射線療法との併用効果が報告されており今後膵癌を含む様々な疾患への適応が期待されている。

Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand（TRAIL）は、細胞膜に存在する特異的受容体への結合を介してアポトーシス誘導シグナルを細胞内に伝達する抗腫瘍性サイトカインである。特異的受容体としてはTRAIL-receptor 1（TRAIL-R1）およびTRAIL-R2が知られているが、これらは主に腫瘍細胞に発現しており、正常細胞に対する影響は非常に低いことが報告されている。近年、遺伝子発現解析により、メチオニン制限が様々な癌におけるTRAIL-R2の発現を増加させることが報告されているが[1)]、膵癌における報告はない。

我々は、以前からメチオニン制限の抗腫瘍効果、化学療法との相乗効果に着目し、膵癌細胞に関する研究も報告してきた[2)]。そこで本研究では、メチオニン制限が膵癌細胞のTRAIL-R2

Kentarou Miyake　E-mail: miyekentarou@gmail.com

発現量および抗TRAIL-R2抗体であるtigatuzumabの治療効果に与える影響を明らかにすることとした。

Ⅲ 方　法

1 *in vitro* においてメチオニン制限がtigatuzumabに誘導されるcaspase活性やアポトーシス に与える影響の検証

ヒト膵癌細胞株MIA PaCa-2とBxPC-3をコントロール培地［MET(+)培地］およびメチオニンフリー培地［MET(-)培地］で培養した。その後培地にPBS、gemcitabine、tigatuzumab（第一三共株式会社より提供）を添加して、caspase活性とアポトーシスのマーカーをウエスタンブロッティングと発光アッセイで評価した。

2 *in vitro* においてメチオニン制限がTRAIL-R2、MAGED2の発現に与える影響の検証

ヒト膵癌細胞株のMIA PaCa-2とBxPC-3、ヒト胎児由来包皮正常線維芽細胞株Hs27をコントロール培地［MET(+)培地］およびメチオニンフリー培地［MET(-)培地］で培養し、TRAIL-R2とMAGED2の発現をRT-PCRとウエスタンブロッティングにより評価した。

3 膵癌同所移植モデルマウスを用いた*in vivo* におけるメチオニン制限の抗TRAIL-R2療法の治療効果に与える影響の検証

無胸腺ヌードマウスにMIA PaCa-2-RFPの腫瘍片を移植し、膵癌同所移植モデルマウスを作成した。メチオニン分解酵素（rMETase）、tigatuzumabおよび両者の併用による治療を行い、抗腫瘍効果を比較した。免疫組織染色やウエスタンブロッティングにより、腫瘍組織におけるTRAIL-R2やMAGED2の発現、およびアポトーシスの程度を評価した。

Ⅳ 結　果

4－2 メチオニン制限はtigatuzumabによるカスパーゼの活性化とアポトーシス誘導効果を増強する

メチオニン制限が、tigatuzumabにより誘導されるcaspaseの活性化とアポトーシスに与える影響を、ウェスタンブロッティングで検証した（図1A）。MIA PaCa-2、BxPC-3両細胞株のtigatuzumab治療群において、MET(-)培地で培養した細胞はMET(+)培地で培養した細胞に比べprocaspase-3の発現が減少し、活性型caspase-3（cleaved caspase-3）の発現が増加した。さらにMIA PaCa-2では活性型caspase-3により切断される前のfull-length PARPの発現が減少し、BxPC-3ではfell-length PARPの減少と切断後のPARP（cleaved PARP）の発現が増加した。一方、メチオニン制限はGEM投与群におけるcaspase-3やPARPの動態には影響を与えなかった。

次にメチオニン制限がcaspase活性に与える影響を定量化するために、発光アッセイを用いてcaspase-3/7活性を測定した。MIA PaCa-2、BxPC-3両細胞におけるtigatuzumab治療群のcaspase-3/7活性はMET(-)培地による培養下で有意に増加した（MIA PaCa-2; $P < 0.001$, BxPC-3; $P = 0.0018$）（図1B）。一方、コントロール群とGEM治療群におけるメチオニン制限によるcaspase-3/7活性の増強効果は、BxPC-3では有意な増加はなく、MIA PaCa-2ではわずかに増加したのみであった。これらの結果より、メチオニン制限はtigatuzumabによるcaspase活性化とアポトーシス誘導効果を増強する可能性が示唆された。

2 メチオニン制限は膵癌細胞のTRAIL-R2 mRNAおよびタンパクの発現を増加させる

メチオニン制限がTRAIL-R2 mRNAの発現

に与える影響をqRT-PCRを用いて定量化した。TRAIL-R2 mRNAの発現はMIA PaCa-2、BxPC-3両細胞ともにMET(-)培地による培養下で有意に増加した（MIA PaCa-2; P = 0.003, BxPC-3; P < 0.0001）（図２A）。次に、TRAIL-R2タンパクの発現をウエスタンブロッティングで検証した。TRAIL-R2タンパクの発現はMIA PaCa-2、BxPC-3両細胞ともにMET(-)培地による培養で増加した（図２B）。一方、正常線維芽細胞Hs27では、MET(-)培地での培養によるTRAIL-R2タンパクの発現の増加はみられなかった。また、これらの結果よりメチオニン制限は正常細胞に影響を与えず、膵癌細胞特異的にTRAIL-R2タンパクの発現を増加させることが示唆された。

３　メチオニン制限は膵癌細胞のMAGED2 mRNAの発現を変化させることなく、MAGED2タンパクの発現を減少させる

メチオニン制限がTRAIL-R2 mRNAの発現に与える影響をqRT-PCRを用いて定量化した。MAGED2 mRNAの発現はMIA PaCa-2、BxPC-3両細胞ともにMET(-)培地による培養下で有意な変化を認めなかった（MIA

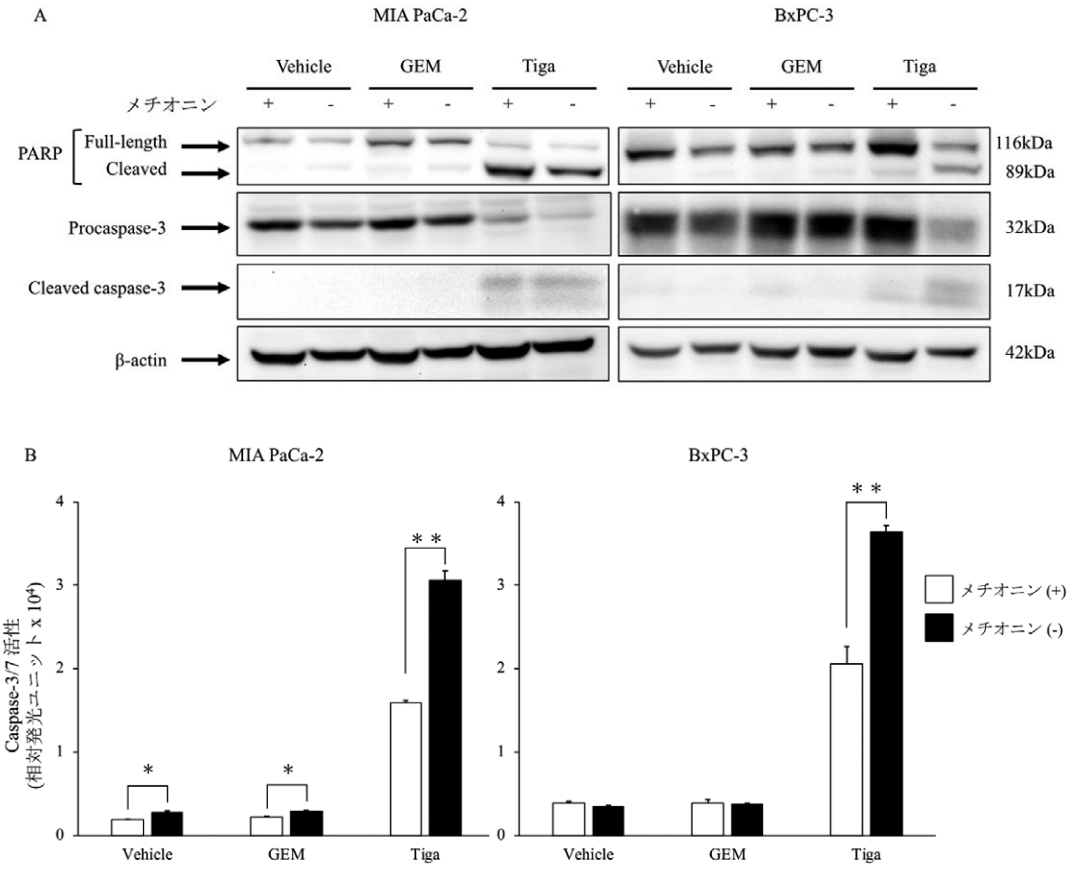


図１　*In vitro*におけるメチオニン制限がtigatuzumabによるcaspase活性化およびアポトーシス誘導に与える影響

（B: 平均±標準誤差，n = 3. *，p < 0.01，**，p < 0.001）

PaCa-2; P = 0.888, BxPC-3; P = 0.102）（図3A）。しかし、ウエスタンブロッティングにおいて、MAGED2 タンパクの発現量はMIA PaCa-2、BxPC-3両細胞ともにMET(-) 培地による培養で減少した（図3B）。正常線維芽細胞Hs27では、MET(-) 培地での培養によるMAGED2タンパクの発現の変化はみられなかった。これらの結果よりメチオニン制限は正常細胞に影響を与えず、膵癌細胞特異的にMAGED2 mRNAの転写後のタンパク発現を

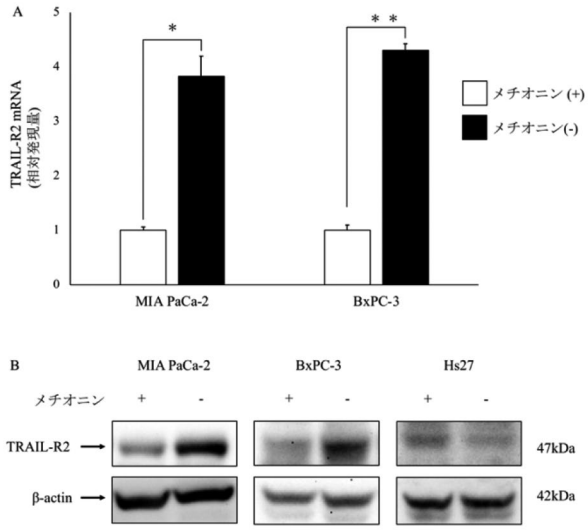


図2　メチオニン制限がTRAIL-R2発現に与える影響
（A: 平均±標準誤差，n = 3. *，p < 0.01，**，p < 0.001）

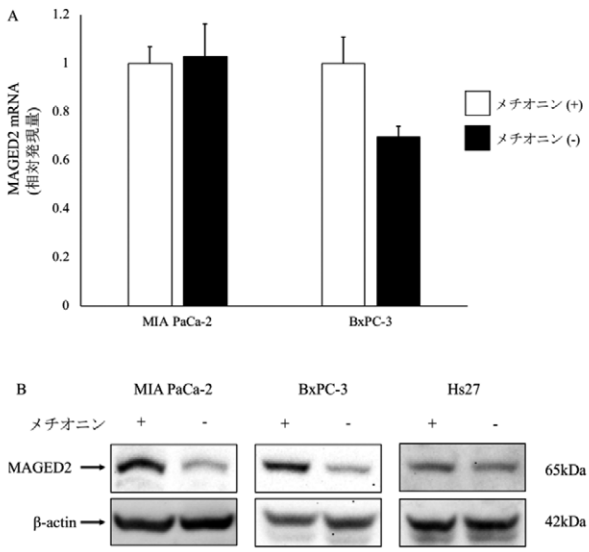


図3　メチオニン制限がMAGED2発現に与える影響
（A: 平均±標準誤差，n = 3.）

制限することが示唆された。

4　rMETase は膵癌モデルマウスの血清メチオニン値を減少させ、tigatuzumab の効果を増強する

膵癌モデルマウスにおいて、rMETase を用いたメチオニン制限が tigatuzumab の効果に与える影響を検証した。rMETase・tigatuzumab 併用群はコントロール群と比較して、有意に腫瘍増殖を抑制し（P = 0.022）、4 群のうち唯一腫瘍の縮小を認めた（図 4 A）。4 群間で治療による体重の有意な変化は認めなかった（図 4 B）。

免疫組織化学染色では、rMETase 群と rMETase・tigatuzumab 併用群で TRAIL-R2 の発現増加と MAGED2の発現低下を認めた（図 5 A）。また活性型 caspase-3陽性細胞の数は rMETase・tigatuzumab 併用群で有意に多かった（control; P = 0.003, rMETase; P = 0.012, tigatuzumab; P = 0.018）（図 5 B）。これらの結果より、rMETase によるメチオニン制限は膵癌同所移植モデルマウスにおいて、TRAIL-R2 の発現を増加させることで tigatuzumab の抗腫瘍効果を増強する可能性が示唆された。

V　考　　察

本研究で我々は、メチオニン制限は膵癌細胞における TRAIL-R2 の発現量を増加させ、tigatuzumab の治療効果を増強することを示した。腫瘍細胞の TRAIL-R2の発現量を増加させる物質として、アスピリンやアロプリノール、イブプロフェンといった薬剤がこれまでに報告されているが、出血傾向や腎障害といった有害事象が問題となる可能性がある。本研究およびこれまでに我々が行なった動物実験では、メチオニン制限による明らかな有害事象はみられなかった。またメチオニン制限自体が抗腫瘍効果を有するため、抗 TRAIL-R2療法との併用においてメチオニン制限は先の薬剤より優れていると考えられる。

本研究ではメチオニン制限により MAGED2タンパクが減少することで、TRAIL-R2の発現が増加することを明らかにした。しかしメチオニン制限による MAGED2 mRNA 量の変化は認め

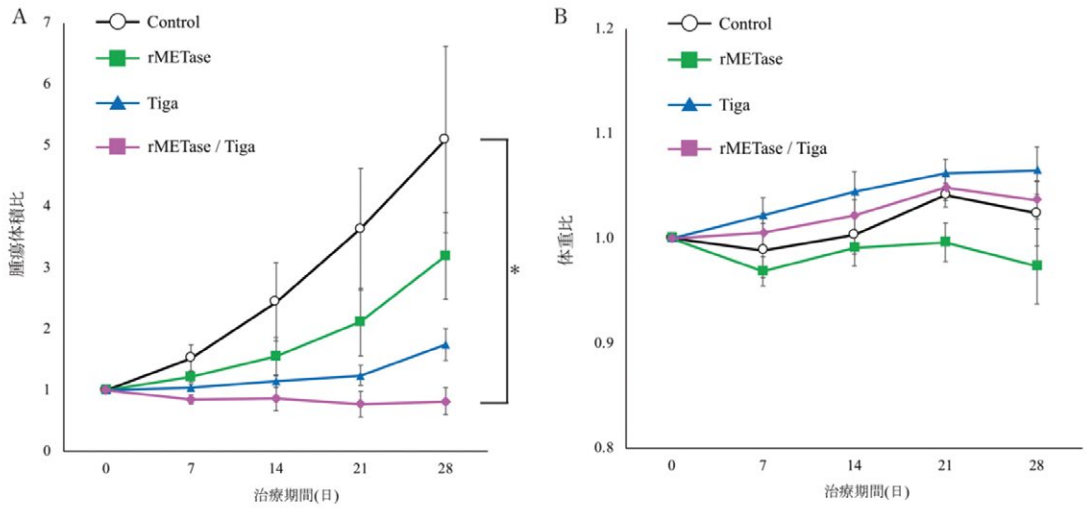


図 4　膵癌同所移植モデルマウスにおける腫瘍体積比，体重比の推移

（A,B: 平均 ± 標準誤差，n = 6, ）

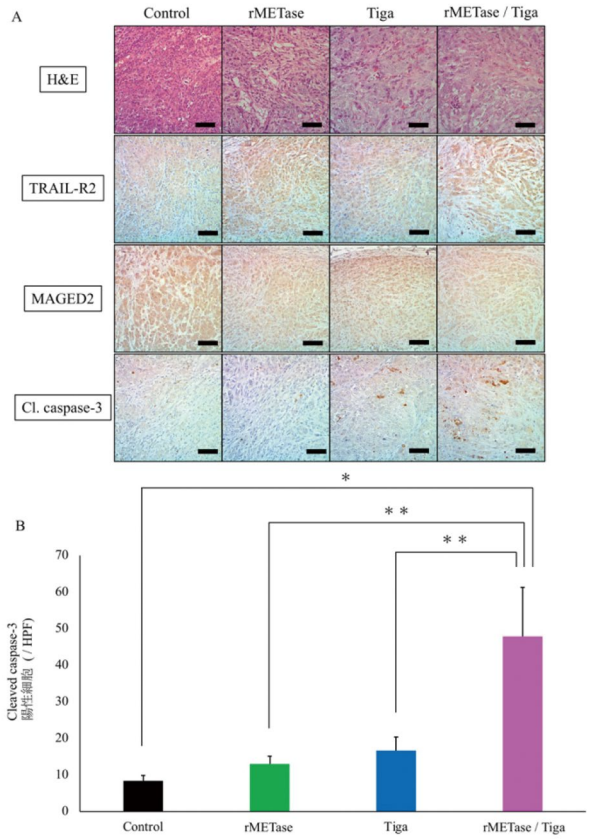


図５　膵癌同所移植モデルマウスの腫瘍の免疫組織学的検討
（A: スケール, 50 μm，B: 平均±標準誤差，n = 5）

なかったことから、メチオニン制限はMAGED2の翻訳過程に影響を及ぼす可能性が示唆されるが、機序は不明であり今後のさらなる検討が必要である。

Ⅵ　結　　語

メチオニン制限は膵癌細胞におけるTRAIL-R2の発現量を増加させ、tigatuzumabの治療効果を増強する。メチオニン制限によるTRAIL-R2発現増加の機序については今後のさらなる検討が必要である。

参考文献

1）Strekalova E, Malin D, Good DM, Cryns VL. Methionine Deprivation Induces a Targetable Vulnerability in Triple-Negative Breast Cancer Cells by Enhancing TRAIL Receptor-2 Expression. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2015;21(12):2780-91.

2）Kawaguchi K, Miyake K, Han Q, Li S, Tan Y, Igarashi K, et al. Oral recombinant methioninase (o-rMETase) is superior to injectable rMETase and overcomes acquired gemcitabine resistance in pancreatic cancer. Cancer Lett. 2018;432:251-9.