

# アミノ酸代謝制御による膵癌新規治療法の開発

東北大学病院 医学系研究科 消化器病態学分野

松本 諒太郎

## I 要 旨

本研究ではマウス及びヒト膵癌細胞でみられた、Nrf2 活性化によるグルタミナーゼ阻害への感受性増強効果が膵星細胞でも見られるか、癌細胞の増殖促進作用・膵星細胞の遊走能へ影響を与えるか明らかにするため検討を行った。マウス膵星細胞株における Nrf2 活性化はグルタミン酸欠損培地での培養・グルタミナーゼ阻害剤処理後の細胞生存率を低下させた。Nrf2 活性化後のグルタミナーゼ阻害は膵星細胞培養上清による癌細胞の増殖促進効果へ影響しなかったが、膵星細胞の遊走能を抑制することが明らかとなった。Nrf2 活性化によるアミノ酸依存性の変化は膵星細胞においても治療標的となる可能性があり、今後検討を要する。

## II 目 的

本研究の目的は、膵癌におけるアミノ酸代謝制御を可能にする介入法と、アミノ酸依存性誘導による新規治療法の実現のための基盤開発である。酸化ストレス応答の中核分子である Nrf2 の活性化は膵癌を含む様々な癌でみられるが、その効果は多面的である。我々の先行研究では、膵癌モデルマウスである膵特異的変異 K-ras/p53 発現マウス (KPC マウス) への Nrf2 欠損付加により膵発癌は抑制された<sup>1)</sup>。一方、KPC マウスに Nrf2 持続活性化を付加したマウス由来膵癌細胞は野生型 KPC マウス由来膵癌

細胞と同様の細胞増殖能を示したが、グルタミナーゼ阻害剤 CB-839 および BPTES への感受性が増強することを見出した<sup>2)</sup>。変異 K-ras 発現ヒト膵癌細胞株において Nrf2 活性化剤であるマレイン酸ジエチル (DEM) 投与は CB-839 への感受性を増加させることも確認している。以上の結果は膵癌において酸化ストレス応答の活性化が癌進展に作用するだけでなく、特定の代謝経路阻害に対しては脆弱性を誘導することを示す。当教室では野生型および Nrf2 欠損マウスから膵星細胞を樹立済みであり、膵星細胞における Nrf2 が癌促進に不可欠であることを示した<sup>3)</sup>。膵星細胞による癌促進作用が確認済みであるというアドバンテージを利用して、膵星細胞・膵癌細胞相互作用におけるアミノ酸代謝の意義を明らかにするという計画を着想した。Nrf2 活性化剤による Nrf2 活性化により膵星細胞のアミノ酸依存性が変化するかを明らかにし、新たな治療標的の同定を目指す。

## III 方 法

### 1 マウス膵星細胞における Nrf2 活性化剤の効果確認

C57/BL6 マウス膵組織より定法に従って分離した膵星細胞へ SV40 を導入して不死化し、mPSC 株とした。mPSC 細胞株を DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理後に RNA を抽出し、定量的 RT-PCR にて Nrf2 標的遺伝子の誘導を確認した。

## 2 Nrf2 活性化膀胱癌細胞のグルタミン酸枯渇培地・CB-839 への感受性

mPSC 細胞株を 96 well plate に 10000 cells/well で播種後、コントロールまたは DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理後に通常培地 (10% FBS 添加 DMEM)・グルタミン酸欠損培地・CB-839 0-10  $\mu$ M で 24 時間処理し、MTT アッセイで細胞生存率を評価した。

## 3 DEM および CB-839 処理による膀胱癌細胞の癌細胞増殖促進効果への影響

mPSC 細胞株を 10 cm dish にサブコンフルエントになるまで培養した後、コントロールまたは DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理後にコントロールまたは CB-839 10  $\mu$ M で 24 時間処理した。1% FBS 添加 DMEM へ交換後 24 時間で回収し、フィルター滅菌して condition medium (CM) とした。KPC マウス由来膀胱癌細胞株を 96 well plate へ 5000 cells/well で播種後、コントロール CM・DEM 処理 CM・CB-839 処理 CM・DEM+CB-839 処理 CM で 24 時間培養し、BrdU アッセイにて細胞増殖への影響を評価した。

## 4 DEM および CB-839 処理による膀胱癌細胞の遊走能への影響

mPSC 細胞株を 12 well plate にコンフルエントになるまで培養した後、滅菌チップで細胞間隙を作製した。10% FBS 添加 DMEM・DEM 100  $\mu$ M・CB-839 10  $\mu$ M・DEM+CB-839 で培養を継続し、24 時間後の細胞間隙への細胞遊走を比較した。

# IV 結 果

## 1 マウス膀胱癌細胞における Nrf2 標的遺伝子誘導

DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理した mPSC 細胞

株では、典型的な Nrf2 標的遺伝子である Nqo1 および Gstm の発現がそれぞれ 5 倍または 2 倍程度に増加していた (図 1)。

## 2 Nrf2 活性化膀胱癌細胞のグルタミン酸枯渇培地・CB-839 への感受性

DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理後に通常培地とグルタミン酸欠損培地で 24 時間処理した mPSC 細胞株の生存率を比較したところ、DEM 前処理後の mPSC 細胞株の生存率はコントロール処理群の半分程度に低下していた (図 2)。DEM 100  $\mu$ M で 24 時間処理後に CB-839 0-10  $\mu$ M で処理した mPSC 細胞株ではコントロール細胞株に比べ細胞生存率が低下しており、感受性が亢進していた (図 3)。

## 3 DEM および CB-839 処理後 CM による癌細胞増殖への影響

DEM 前処理および CB-839 処理の有無が KPC マウス由来膀胱癌細胞の増殖に与える影響を BrdU アッセイにて評価したが、DEM+CB-839 処理後の膀胱癌細胞 CM とコントロール処理後の膀胱癌細胞 CM では癌細胞の細胞増殖への効果に差を認めなかった (データ提示せず)。

## 4 DEM および CB-839 処理後の膀胱癌細胞の遊走能

細胞間隙作成後の mPSC 細胞株を 10% FBS 添加 DMEM・DEM 100  $\mu$ M・CB-839 10  $\mu$ M 処理下で 24 時間培養したところ、細胞間隙は遊走細胞により完全に被覆された (図 4)。DEM+CB-839 処理では細胞間隙の被覆は完全ではなく、細胞遊走は抑制されていた。

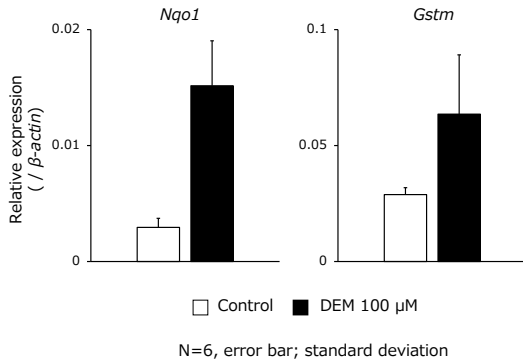


図 1 DEM 100 μM 24時間処理後のmPSC細胞株におけるNqo1、Gstm誘導

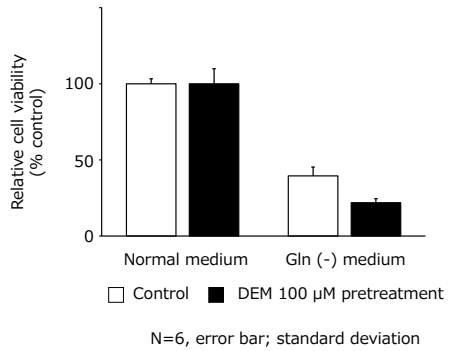


図 2 DEM 100 μM 24時間処理 → 通常培地またはグルタミン酸欠損培地 24時間処理後のmPSC細胞株の生存率

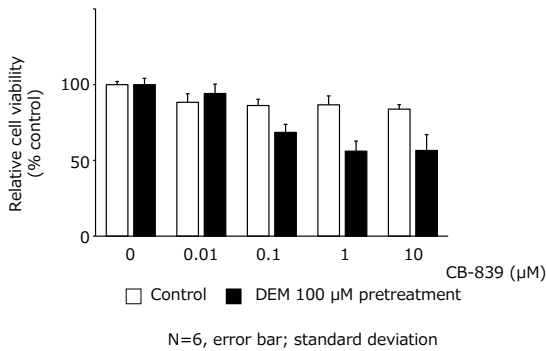


図 3 DEM 100 μM 24時間処理 → CB-839 24時間処理後のmPSC細胞株の生存率

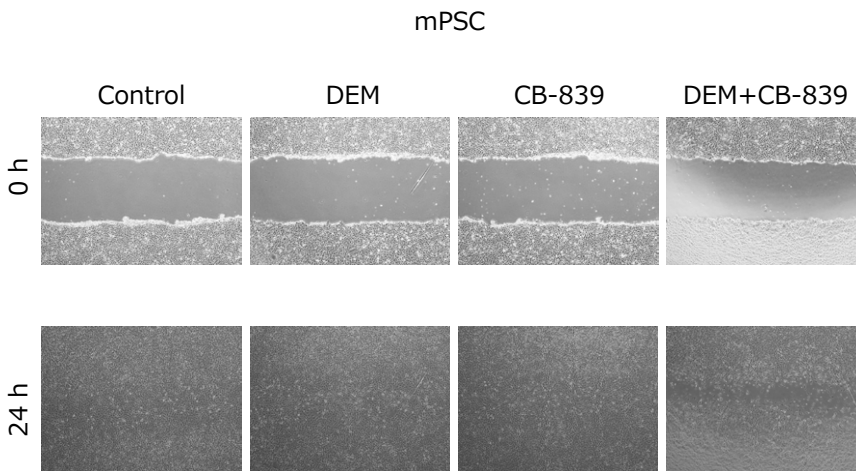


図 4 10% FBS添加DMEM・DEM 100 μM・CB-839 10 μM・DEM+CB-839処理 24時間後のmPSC細胞株の細胞遊走

## V 考 査

マウス由来膵星細胞株においても、Nrf2 活性化剤投与によるグルタミン酸枯渇またはグルタミナーゼ阻害剤による細胞生存率の低下を認めた。施行した条件では膵星細胞培養上清刺激による癌細胞の増殖促進効果を抑制することはできなかったが、膵星細胞に対する Nrf2 活性化は膵癌細胞と同様、特定のアミノ酸への依存性を誘導することを確認した。DEM による Nrf2 活性化とグルタミナーゼ阻害剤である CB-839 処理はマウス由来膵星細胞の遊走能を抑制することも確認され、両者の併用により膵星細胞の増殖と遊走の両者を抑制しうることが判明した。今後は膵癌細胞と膵星細胞で Nrf2 活性化により生じる代謝リプログラミングが同一の標的分子に依存しているか、また細胞外基質産生能への影響や免疫細胞への作用につき *in vitro* の実験系に加え *in vivo* でも明らかにする必要があると考えられる。マウス膵癌組織でのグルタミナーゼ発現、Nrf2 標的分子の発現につき予備実験に着手している。

## VI 結 語

膵癌細胞のみならず、膵星細胞においても Nrf2 活性化はグルタミナーゼ阻害への脆弱性を誘導する。膵癌細胞と膵星細胞の両者に対する dual therapy として、今後も検討が必要である。

### 参考文献

- 1) Nrf2 promotes mutant K-ras/p53-driven pancreatic carcinogenesis. Hamada S, Taguchi K, Masamune A, Yamamoto M, Shimosegawa T. *Carcinogenesis*. 2017; 38(6): 661-670.
- 2) Nrf2 Activation Sensitizes K-Ras Mutant Pancreatic Cancer Cells to Glutaminase Inhibition. Hamada S, Matsumoto R, Tanaka Y,

Taguchi K, Yamamoto M, Masamune A. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(4): 1870.

- 3) Nrf2 expression in pancreatic stellate cells promotes progression of cancer. Tanaka Y, Hamada S, Matsumoto R, Taguchi K, Yamamoto M, Masamune A. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021; 321(4): G378-G388.