

調査研究課題
アミノ酸バランスデータに基づいた
膵癌細胞増殖抑制効果についての調査および研究

崇城大学薬学部 調査研究者氏名 西 弘二
(〒860-0082 熊本県熊本市西区池田4-2-2-1 TEL: 096-326-3543)

要旨

膵がんは、最も予後の悪い癌種の1つであり、化学療法の奏効率も極めて低い。その原因の1つに膵がんが栄養飢餓に対して耐性を有していることが報告されている。我々はこれまでに膵がん細胞株の1つであることを報告している。そこで、本研究では栄養飢餓に対して耐性を有する PANC-1 の細胞増殖抑制に重要な栄養素を同定することを目的として各種検討を行った。通常血清または無血清培地を用いた検討では、無血清培地では PANC-1 の増殖に低下が観察された。しかし、アミノ酸除去血清培地では、細胞増殖の程度に影響は見られなかった。また、グルコースに関しては、高濃度または低濃度いずれにおいても増殖に有意な差は観察されなかった。さらに、グルタミン除去培地においてはわずかに増殖抑制傾向が観察された。これらの結果は、PANC-1 の栄養飢餓耐性には血清に含まれるアミノ酸以外の栄養成分が重要であるものの、通常環境ではグルタミンが重要な役割を有していることを示唆している。

今回得られた結果は、膵がん治療においてグルタミンや脂質欠損環境が有効である可能性を示している。

1、調査研究目的

膵がんは固形がんの中でも、最も予後が悪く、罹患者に対する死亡者の割合が最も高いことが知られている。その原因には、化学療法剤の奏効率が低く、効果的な治療標的が見つからないことが挙げられる。膵臓は従来他の臓器と比較して、血流量が乏しいことに加えて、腫瘍周辺の血流量が乏しいことから、膵がん細胞には十分な栄養が行き届いていないにも関わらず、生存や増殖を可能とするシステムが備わっていると考えられる。最近、ヒトの膵がん細胞は栄養飢餓に耐性を有していることが分かってきた。そこで、本研究では膵がん細胞の栄養飢餓耐性のメカニズムを解明し、新規膵がん治療

法開発のための基礎情報を得ることを目的とする。

2、調査研究方法

2-1 膵癌細胞株と培養条件

ヒト膵癌細胞株として AsPC1、BxPC3 および PANC1 を使用し、ATCC (American Type Culture Collection) より購入した。培養には 10%ウシ血清および抗生物質 (ストレプトマイシン+ペニシリン) を添加した RPMI1640 または DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) を使用し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。

2-2 細胞増殖アッセイ

生細胞数の評価は、トリパンブルーを用いて行った。6 well プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように各細胞を播種し、一晚培養した。その後、24~72 時間、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、トリパンブルーで染色し生細胞および死細胞を計測した。

3、調査研究成果

3-1 細胞増殖における血清、アミノ酸およびグルコースの影響

細胞培養時には、一般的には 10%程度のウシ胎児血清が用いられる。血清には、脂質、アミノ酸、ビタミン、タンパク質など多くの栄養素が含まれている。そこで、PANC-1 細胞の増殖に関して、血清がどの程度寄与しているか検討した (Figure 1)。その結果、栄養飢餓耐性である PANC-1 において、無血清培地では有意な細胞増殖の低下が観察された。そこで、血清に含まれるアミノ酸がどの程度関与しているかを検討するために、透析処理された血清 (アミノ酸やビタミンなどの低分子が除去された血清: アミノ酸除去血清) を用いて同様の検討を行った結果、通常血清と有意な差は観察されなかった。また、PANC-1 の増殖における培地中のグルコース濃度の影響について検討を行った結果、低濃度および高濃度グルコースいずれにおいても有意な差は観察されなかった。

3-2 細胞増殖におけるグルタミンの影響

アミノ酸の中でもグルタミンは、細胞内の栄養状態を保つために非常に重要であることが知られており、オートファジーのような現象においてもキーとなる分子の一つである。そこで、PANC-1 の細胞増殖におけるグルタミンの影響について、グルタミン不含培地を用いて検討を行った (Figure 2)。その結果、無血清、通常血清またはアミノ酸除去血清いずれを用いた場合も細胞増殖の抑制が観察された。

4、考察

本研究は、PANC-1 細胞の増殖における重要な栄養素の同定を目的として行われた。これまでの報告で、PANC-1 は栄養飢餓耐性を有することが知られている (1)。これまでの我々の検討では、栄養分を含まない飢餓培地を用いた際は 48 時間まで生存が観察された。これは、栄養素がない環境下で、PANC-1 細胞内代謝が適応させて結果かも知れない。一方、グルタミンのみを欠如させた環境下では、著しい増殖抑制を示すことも見出した (2)。これらの結果は、PANC-1 細胞は、通常栄養成分が存在する環境下で、重要な栄養素のみが欠如するとその状況に対応できなくなる可能性を示唆している。今回の検討で、PANC-1 細胞は、血清がない状態で、細胞増殖の低下を示した。血清には、タンパク質、脂質およびアミノ酸など多くの栄養素が含まれており、一般的な細胞培養には必須なものとなっている。今回の結果では、アミノ酸除去血清の影響は観察されなかった。これは、PANC-1 の増殖にアミノ酸が必ずしも必要ではないということではなく、アミノ酸やその他の低分子栄養素が存在しないことによる代謝様式の変換が行われた可能性が考えられる。データには示していないが、我々は予試験的に、PBS のような有機物が存在しない環境であっても PANC-1 は 24 時間以上生存できることを観察している。すなわち、PANC-1 は一度に多くの栄養成分が欠如してしまっている環境では、細胞内代謝を変化させ、環境適応を見せるものの、グルタミンのような一部の栄養成分のみの欠如では、その環境に適応できないと思われる。

一般に、細胞が生存するためのエネルギーは解糖系、クエン酸回路および電子伝達系で産生される。これらの代謝経路に多くのアミノ酸代謝が関与している。今回の検討では、PANC-1 の生存増殖に解糖系の寄与は小さく、グルタミン以外の重要なアミノ酸の同定には至らなかったが、アミノ酸代謝は細胞の増殖に必須であることは言うまでもなく、今後更なる検討が必要であると思われる。

5、まとめ

今回の検討により、栄養飢餓耐性を有する膵がん細胞株である PANC-1 の生存や増殖にグルタミンが重要であることに加え、重度の飢餓環境では細胞内代謝を変化させることが示唆された。これらのデータは、今後膵がんの化学療法を行う上で、栄養学的にも有用な基礎情報になるものと思われる。

6、引用文献

(1) Kato K, Ogura T, Kishimoto A, Minegishi Y, Nakajima N, Miyazaki M, Esumi H. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene*. 21: 6082-6090 (2002).

(2) Nishi K, Suzuki M, Yamamoto N, Matsumoto A, Iwase Y, Yamasaki K, Otagiri M, Yumita N. Glutamine Deprivation Enhances Acetyl-CoA Carboxylase Inhibitor-induced Death of Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res*. 38: 6683-6689 (2018).

Figure 1

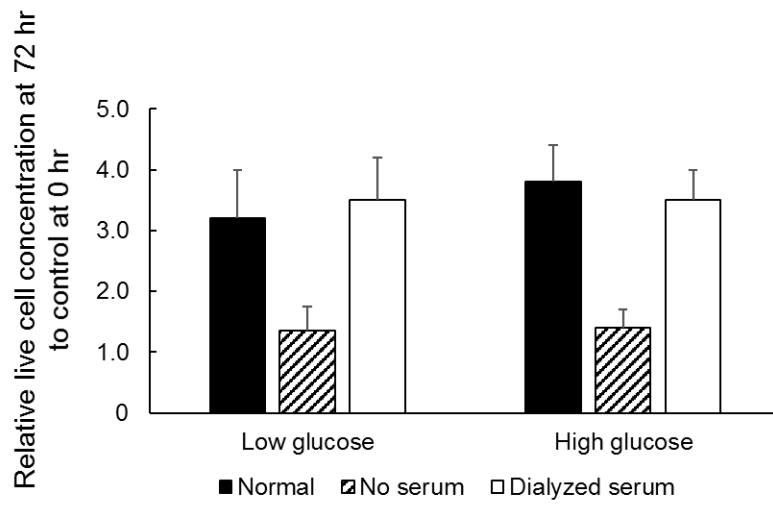
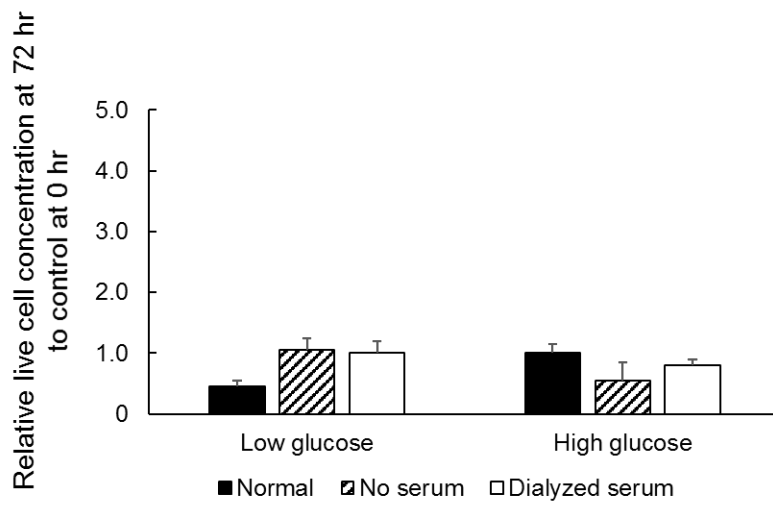


Figure 2



対象経費実支出額内訳書

別紙（２）

経費区分	経理計画	実支出額	内訳
研究事業費 (総計)	800,000	800,000	
諸謝金	0	0	
旅費交通費	60,000	67,124	○10/4-5 東京 シンポジウム参加 48,104 円 1名×1回、航空券代・二次交通費・宿泊料・食卓料 ○11/16-17 長崎 学会参加 19,020 円 1名×1回、JR 券代・宿泊料
備品費	0	0	
消耗品費	640,000	713,556	○試薬類 712,689 円 ○事務用品類 867 円)
印刷製本費	80,000	0	
通信運搬費	0	0	
会議費	0	0	
賃金	0	0	
雑役務費	0	0	
その他	20,000	19,320	○学会参加費 7,000 円 ○ウイルスバスターライセンス料 12,320 円

備考

1. 収支報告の内訳詳細は別紙をご参照ください。