

温熱耐性因子の代謝調節機構の解明と新規治療法の開発

千葉大学大学院薬学研究院臨床薬理学研究室

畠山 浩人

1. 背景

一般に“がんは熱に弱い”とされ、42～43℃で腫瘍を温める温熱療法によるがん治療の研究が進んでいる。副作用も少なく免疫系の賦活化も期待できるなど利点も多いが、期待ほどの効果が得られていないのが現状である。一方で、温熱下でがん細胞がどのような応答を示すのかや何度でどの程度のがん細胞が死滅するかについての定量的な解析はほとんどなされていなかった。我々はこれまでに、様々な温度で温熱処置を行い、その後の生存率から50%の細胞死を与える温度をmedian lethal temperature (LT50)と定義し、10種類の卵巣がん細胞についてLT50を評価したところ、細胞間でLT50は最大約4℃異なることを見出し、温熱に感受性と耐性のがん細胞が存在することを世界で初めて明らかとした (Hatakeyama H, et al., Cell Rep., 2016)。これまでの解析により、2D-LC-MS/MSによる網羅的なタンパク質発現解析により、温熱耐性細胞は温熱下で解糖系に関連する大半の酵素のタンパク質発現が減少していることが示された。Warbrug効果によりがん細胞にとって解糖系はエネルギーの獲得に最も重要な代謝経路であり、機能の応答として解糖系が停止しているのか、どのように解糖系関連酵素が制御されているか、また解糖系の停止が温熱耐性にどのように寄与するかは不明なままである。そこで本研究ではRNA発現解析をマイクロアレイにより、また細胞内代謝物をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(CE-TOFMS)を用いて網羅的に評価し、複数のオミックスの連関を解析することで温熱耐性細胞の温熱下における細胞応答メカニズムを解明するとともに、温熱耐性を感受性化する新たな分子標的を同定することで、効率的な温熱治療の確立を目的とした。

2. 方法と結果

1) CE-TOFMSによる細胞内代謝物の評価

温熱耐性細胞としてヒト卵巣がんSKOV3細胞を使用した。37℃のコントロールおよびヒートチャンバーにて46℃で1時間温熱処置し、4時間後の細胞から代謝物を抽出した。CE-TOFMS (17100CE、6230TOF-MS、Agilent)を用いて、糖、アミノ酸、核酸を中心に水溶性代謝物110種類を定量解析した。コントロールと比較して温熱処置で2倍以上上昇、2分の1以下に減少した代謝物を変動代謝物として同定した。

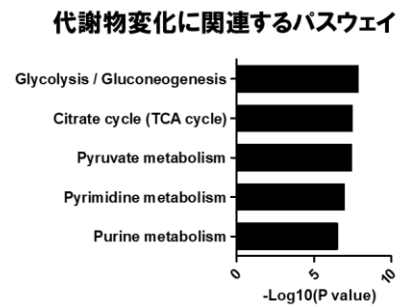
2) DNAマイクロアレイ

温熱耐性細胞SKOV3および温熱感受性細胞としてヒト卵巣がんA2780細胞を使用した。37℃のコントロールおよびヒートチャンバーにて46℃で1時間温熱処置し、2時間後の細胞からRNAを抽出した。Illumina BeadArrayにて発現を評価した。コントロールと比較して温熱処置で2倍以上上昇、2分の1以下に減少し、また統計的に有意($P < 0.05$)な遺伝子を変動遺伝子として同定した。

3. 結果・考察

1) CE-TOFMSによる細胞内代謝物の評価

温熱耐性SKOV3で定量に成功した約90の代謝物の中で、温熱処置により上昇、減少した代謝物はそれぞれ15ずつであった。これらの代謝物をMetaboAnalystにて解析したところ、解糖系やTCA回路、ピルビン酸代謝と糖代謝に関連する経路が上位に挙げられた(右図)。また解糖系に関する代謝物の多くは顕著に減少していた。これらの結果から、温熱耐性細胞は温熱下で解糖系酵素の減少に伴い、実際に解糖系代謝が抑制されていることが実証された。

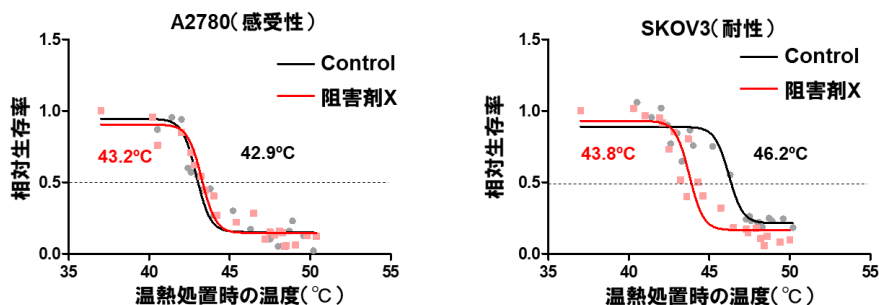


2) DNAマイクロアレイ

温熱耐性SKOV3で上昇、減少した遺伝子はそれぞれ99、23遺伝子、温熱感受性A2780で上昇、減少した遺伝子はそれぞれ121、20遺伝子であった。変動遺伝子についてIngenuity Pathway Analysis (IPA)で解析したところ、両細胞で共通の経路が挙げられた。実際に発現が上昇した遺伝子の大半は温熱の感受性に関係なくheat shock protein70など熱ストレス応答として共通していた。一方で、減少した遺伝子群に解糖系関連分子は含まれていなかった。従って解糖系酵素の発現減少は、転写調節ではないことが示唆された。

3) 耐性細胞特異的なタンパク質変動の解析

タンパク質の発現調節が転写調節に非依存的であることが示唆され、翻訳後の過程の関与を予想した。そこで、これまでの検討で実施したタンパク質の網羅的発現情報から、温熱耐性細胞で特異的に変動したタンパク質を抽出した。これらの分子をIPAで解析したところ、発現変動の上昇に伴う経路Xが抽出された。IPAによる解析から、経路Xの一部の分子は、解糖系酵素の発現調節の可能性が示唆された。経路Xに関して、キー分子を阻害したところ温熱感受性細胞では温熱感受性に変化がなかったが、温熱耐性細胞では温熱感受性が向上した(下図)。これは、本経路が温熱感受性に重要な役割を果たすことを示唆するだけでなく、がん温熱療法効果を向上させる標的分子であることが示された。また本経路の分子xは温熱下で安定化を受けることで発現量が亢進していることが示唆された。



4) エネルギー代謝路プログラミング

先述の通り、解糖系はがん細胞の主要なエネルギー代謝経路である。温熱下で解糖系が停止していることが明らかとなったが、細胞内エネルギーの指標であるATPは温熱処置後に増加していた。従って、解糖系から他の代謝経路へのリプログラミングが誘導されていると仮説を立て、IPAを用いてタンパク質および代謝物のオミクス間解析を行ったところ、代謝経路Yの関

与の可能性が示唆された。そこで経路Yの律速酵素をsiRNAにてノックダウンしたところ温熱感受性化が示された。

4. まとめ

本研究では、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を通じて、がん細胞の温熱耐性メカニズムの解明を目指した。温熱耐性細胞で観察された解糖系酵素の減少は転写調節ではなく、翻訳後の調節であることが示され経路Xの関与の可能性が示された。今後は経路Xの関与についてより詳細な解析を進める。また本経路Xは新規治療標的としての有用であることが示された。今後は本標的の阻害と温熱を組み合わせた新規温熱治療法の確立が期待される。温熱下で引き起こされる解糖系の停止のメカニズムについて解明が進んだが、一方で、なぜ解糖系の停止が温熱耐性に寄与するかの解明には至らなかった。一般に解糖系は細胞内の主要な熱産生経路と報告があり、解糖系の停止は発熱の抑制として機能しているのではないかと考えられ、更なる解析を進めたい。

謝辞

本研究は、アステラス病態代謝研究会の助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Hatakeyama H, Wu SY, Lyons YA, et al. Role of CTGF in sensitivity to hyperthermia in ovarian and uterine cancers. *Cell Report*, 17, 1621–1631 (2016)
2. Minakami S, de Verdier CH. Calorimetric study on human erythrocyte glycolysis. *Eur J Biochem*, 65, 451–460 (1976)