

Optimization of dosing schedule of chemotherapeutic agents targeting amino acid metabolism in cancer cells

白水, 翔也

<https://hdl.handle.net/2324/1931843>

出版情報：九州大学, 2017, 博士（臨床薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



Optimization of dosing schedule of chemotherapeutic agents targeting amino acid metabolism in cancer cells

(がん細胞におけるアミノ酸代謝を標的とした抗がん剤の至適投与法に関する検討)

薬剤学分野 3PS14019K 白水 翔也

【序 論】

アミノ酸は正常な細胞の機能維持のみならず、がん細胞の増殖においても必要な栄養素である。多くの細胞はがん化に伴いアミノ酸の生合成や代謝に関わる酵素の発現が変化し、アミノ酸の要求能が増加するため、その取込み過程や生合成経路は新たながん治療標的として捉えられている。一方、多くの薬物の効果や副作用には投薬時刻の違いによる差異が認められる。このような投薬時刻の違いによる差異は、様々な生体機能の概日リズムによって引き起こされるが、血中のアミノ酸濃度や、その合成・分解に関わる酵素の発現にも時刻依存的な変動が認められている。しかしながら、アミノ酸の取込み過程や生合成経路を標的とした抗がん剤の効果に投薬時刻の違いによる差異が生じるか否か詳細に検討された報告はない。そこで本研究では、まず既存のアミノ酸代謝標的薬である L-アスパラギナーゼに着目し、抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響について検討を行った。また、細胞のがん化過程において異常増殖能獲得に最も寄与するアミノ酸の探索を行い、同定したアミノ酸の取込み阻害剤の抗腫瘍効果と投薬時刻の影響について検討を行った。

【方 法】

細胞培養: マウス胎仔由来線維芽細胞 (MEF)、各種マウス由来がん細胞 (S-180、C-26、4T1)、および各種ヒト由来がん細胞 (HL-60、HeLa、SK-OV-3、HepG2、A549、H1975、MCF7、T-47D、SK-BR-3、MDA-MB-231) は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) または RPMI1640 培地中で 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。MEF にはレトロウイルスベクターを用いてがん遺伝子 (*H-Ras^{V12}* および *SV40LT*) を導入し、細胞をがん化させた。

担がんモデル動物の作製: 実験には BALB/c 雌性マウスおよび BALB/c nude 雌性マウスを使用し、自由摂食・摂水、明暗周期 (明期: 7:00-19:00) 条件下で飼育した。マウス由来乳がん 4T1 細胞を BALB/c マウスの右後肢裏皮下に移植し、モデル動物を作製した。また、ヒト由来乳がん MDA-MB-231 細胞は BALB/c nude マウスの背部皮下に移植し、担がんモデルを作製した。各実験における動物の取扱いは九州大学実験動物規定を遵守して行った。

アミノ酸含量の測定: 細胞・組織内または血漿中アミノ酸をメタノール抽出し、*o*-フタルジアルデヒドと反応させて蛍光誘導体化を行った。内部標準物質にはノルバリンを用い、4 種類の移動相 (15%、20%、50%、90%メタノール/pH7.2 リン酸緩衝液) を段階的に切り替えることで、17 種類のアミノ酸を逆相カラム HPLC により分離し、定量を行った。

siRNA 導入: HVJ エンベロープに Control siRNA または *Atf4* siRNA を封入し、がん遺伝子導入 MEF にトランスフェクトした。

タンパク質発現量の測定: 細胞からタンパク質を抽出し、Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲルで分離後に PVDF 膜へ転写した。転写後の膜はスキムミルクでブロッキング後、一次抗体 (抗 ATF4 抗体、抗 xCT 抗体または抗 ASCT2 抗体) と反応させた。その後、二次抗体と反応させて目的とするタンパク質由来のバンドを検出した。内部標準として CBB 染色を行い、各タンパク質の発現量を定量した。

グルタチオン含量の測定: 細胞・組織からグルタチオンをメタノール抽出し、GSSG/GSH Quantification kit を用いて総グルタチオン含量を測定した。

統計解析: データは平均値±標準誤差で示した。多群間の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) で解析後、Tukey-Kramer's test により検定を行った。独立した 2 群間の比較には Student's t-test または Mann-Whitney U-test を用いた。有意水準は 5% とした。

【結果・考察】

L-アスパラギナーゼの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響¹

マウス固形腫瘍細胞の増殖能に及ぼすアスパラギンの影響: 細胞増殖の亢進が細胞外からのアスパラギンの取込みに依存しているか否かを調べるため、

各種マウス固形腫瘍細胞 (S-180、C-26、4T1) をアスパラギン不含培地中で培養し、それらの増殖能を測定した。その結果、検討した全ての細胞種において増殖能の低下が認められた。また、L-アスパラギナーゼを添加することで培地中のアスパラギンは分解されるが、この際、各種がん細胞内のアスパラギン含量も低値を示していたことから、L-アスパラギナーゼは、培地中 (細胞外) からのアスパラギンの供給を阻害することで、マウス固形腫瘍細胞の増殖を抑制すると考えられた。

L-アスパラギナーゼの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響

時刻の影響: 先の検討において、マウス乳がん 4T1 細胞の増殖能は、L-アスパラギナーゼによる培地中のアスパラギン枯渇によって最も顕著に抑制された。そこで、4T1 細胞を移植した担がんモデルマウスを用いて、L-アスパラギナーゼの抗腫瘍効果について検討を行った。明期中半 (13:00) に

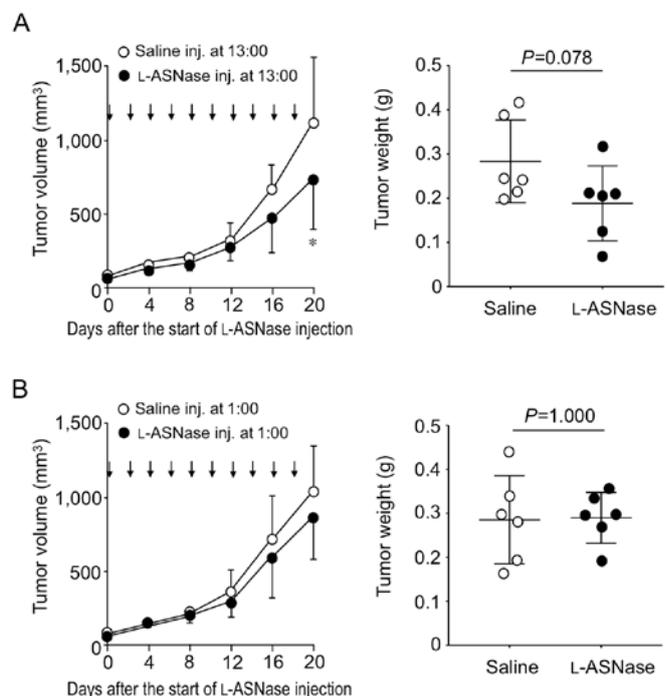


Figure 1 Dosing time-dependent difference in tumor growth of mice after intravenous injection of L-asparaginase. The growth of 4T1-tumor cells implanted in mice during the repetitive administration of L-asparaginase (5 U/kg, i.v.) or saline at 13:00 (A) or 1:00 (B). The left panel shows the time course of tumor growth. The arrows indicate the administration of L-asparaginase (L-ASNase). The right panel shows the weight of tumors removed from mice 20 days after the start of the L-ASNase or saline treatment. Values represent the mean with S.D. (n = 6). *P < 0.05 significantly different from saline group at corresponding time points.

L-アスパラギナーゼ (5U/kg) をマウスに単回静脈内投与したところ、血中アスパラギン濃度は有意に低下し、その低下作用は投与後 48 時間まで持続した。そこで、L-アスパラギナーゼ (5U/kg) を 4T1 細胞移植マウスに 48 時間間隔で 13:00 に反復静脈内投与したところ、腫瘍の増殖は Saline 投与群と比較して有意に低値を示した ($P < 0.05$, **Fig. 1A**)。一方、L-アスパラギナーゼ (5U/kg) を暗期中半 (1:00) に単回静脈内投与したところ、血中アスパラギン濃度低下作用は投与後 24 時間までしか観察されなかった。また、4T1 細胞移植マウスに 48 時間間隔で 1:00 に反復静脈内投与しても、有意な腫瘍増殖抑制効果は認められなかった (**Fig. 1B**)。これらの結果から、L-アスパラギナーゼによる血中アスパラギン濃度低下作用および 4T1 腫瘍に対する増殖抑制効果は、投薬時刻によって異なることが明らかになった。

がん細胞の異常増殖能獲得に最も寄与するアミノ酸の同定とその取込み阻害剤の抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響

がん細胞の異常増殖能獲得に関わるアミノ酸の同定: 転写因子 Activating transcription factor-4 (ATF4) は、アミノ酸の取込みに関わるトランスポーターや代謝酵素の発現を変容させることで、がん細胞の異常増殖能の獲得に関与することが報告されている²。そこで、ATF4 の機能抑制によって、がん化した MEF 内で含量が変化するアミノ酸を探索したところ、6 種類のアミノ酸において含量の低下が認められた。更に、6 種類のアミノ酸を 1 つずつ欠損させた培地を用いて、がん化 MEF の増殖能を評価したところ、システイン不含培地において増殖能が顕著に低下した。

システインの細胞内取込みにはナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーターのひとつである ASCT2 が関与しているが、培地中や血液におけるシステインは容易に酸化されてシスチンとなり、シスチン/グルタミン酸トランスポーター (xCT) を介して細胞内へ取り込まれる³。細胞内に取り込まれたシスチンは還元されて再びシステインとなり、グルタチオンの生合成などに利用される³。がん化 MEF においては xCT の発現亢進が認められたことから、xCT の選択的阻害剤であるエラスチンをごん化 MEF に曝露したところ、細胞内のシステインとグルタチオン含量の低下と共に、増殖能の有意な低下が認められた。また、xCT は株化された各種ヒト腫瘍細胞においても高発現していたことから、ヒト由来腫瘍細胞をシステイン不含培地で培養したところ、ほとんどの細胞において増殖能の有意な低下が認められた。

エラスチンの抗腫瘍効果に及ぼす投薬時刻の影響: マウスおよびヒト由来のがん細胞の増殖がシステインの有無によって影響を受けたことから、担がんモデルマウスを用いてエラスチンの抗腫瘍効果について検討を行った。ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞を BALB/c nude マウスの背部皮下に移植し、腫瘍体積が 30mm^3 以上になった時点から 72 時間間隔で反復腫瘍内投与した。明期中半 (13:00) にエラスチン (0.5nmol/匹) を反復投与した結果、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた ($P < 0.05$, **Fig. 2A**)。一方、同様の投与方法・投与間隔にてエラスチンを暗期中半 (1:00) に反復投与しても有意な抗腫瘍効果は観察されなかった (**Fig. 2B**)。これらの結果から、エラスチンによる腫瘍細胞へのシステイン/シスチン取込み阻害作用は時刻によって異なり、その抗腫瘍効果にも影響を及ぼすことが明らかになった。

【結論】

L-アスパラギナーゼは主に血液中のアスパラギンを枯渇させることから、現在臨床においては急性リンパ性白血病などに対して適応されている。しかしながら、本研究の結果から、L-アスパラギナーゼはマウス由来の固形がんに対しても増殖抑制効果を示すことが確認された。また、本アミノ酸分解酵素は、至適投与タイミング（一日の中の時刻）を設定することで、担がんモデルマウスに対しても腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

一方、がん化した細胞では様々なアミノ酸の含量が変化しており、その変化は細胞の生存や異常増殖能獲得などに関与しているが、本研究の結果からシステイン/シスチンが腫瘍細胞の増殖に大きく寄与していることが明らかとなった。また、システイン取込み阻害剤であるエラスチンは、結果的に細胞内のグルタチオン含量を低下させることで、がん細胞の増殖を抑制したと考えられるが、ヒト乳がん細胞移植マウスにおけるエラスチンの抗腫瘍効果も投与時刻によって異なることが明らかとなった。

一般に、正常細胞に比べてがん細胞のアミノ酸要求性は亢進しており、アミノ酸の取込みや生合成経路はがん治療における新たな標的になると考えられているが、本研究における一連の結果から、がん細胞のアミノ酸要求性は時刻によって変化しており、要求能が最も亢進する時間帯にその阻害剤を投与することで、高い抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。現在、いくつかの化合物がアミノ酸を標的にした抗がん剤として開発段階にあるが、それら化合物の効果も投薬時刻の違いによって変化すると考えられる。本研究で得られた成果や方法論が、アミノ酸を標的にした抗がん剤の至適投与方法の構築に寄与できることを期待したい。

【参考文献】

1. **Shiromizu S**, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, and Ohdo S. Optimizing the dosing schedule of L-asparaginase improves its anti-tumor activity in solid tumor-bearing mice. *J Pharmacol Sci* (in revision).
2. Ye J, Kumanova M, Hart LS, Sloane K, Zhang H, De Panis DN, Bobrovnikova-Marjon E, Diehl JA, Ron D, and Koumenis C. The GCN-ATF4 pathway is critical for tumour cell survival and proliferation in response to nutrient deprivation. *EMBO J* 29: 2082-2096, 2010.
3. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, and Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492, 2004.
4. Katamune C, Koyanagi S, **Shiromizu S**, Matsunaga N, Shimba S, Shibata S, and Ohdo S. Different roles of negative and positive components of the circadian clock in oncogene-induced neoplastic transformation. *J Biol Chem* 291: 10541-10550, 2016.

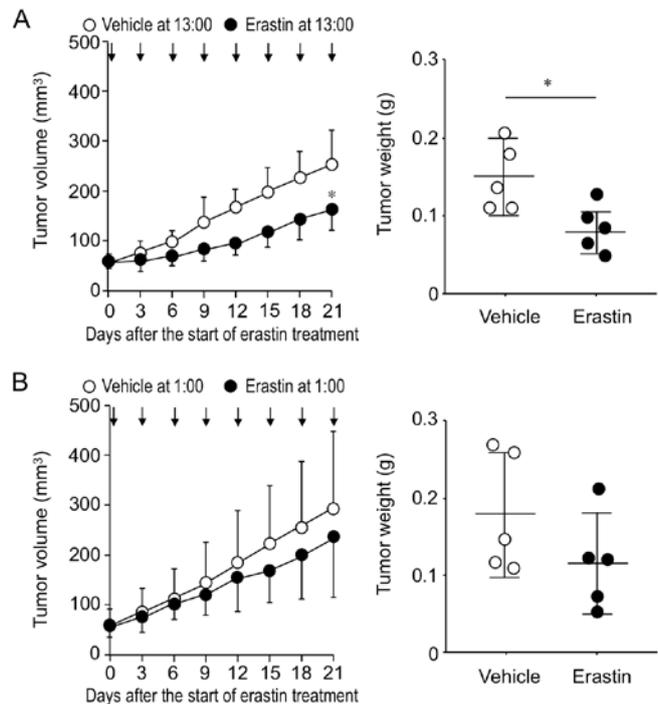


Figure 2 Dosing time-dependent difference in the ability of erastin to suppress the growth of tumor cells implanted in mice. The growth of MDA-MB-231 tumor cells implanted in mice during the repetitive administration of erastin (0.5 nmol/mouse) or vehicle (0.1%DMSO) at 13:00 (A) or 1:00 (B). The left panel shows the time course of tumor growth. The arrows indicate the administration of erastin. The right panel shows the weight of tumors removed from mice 21 days after the start of the erastin or vehicle treatment. Values represent the mean with S.D. (n = 5). * $P < 0.05$ significantly different from vehicle group at corresponding time points.