

学位論文題名

アスパラギン合成酵素は低グルコース環境下で発現亢進し、  
膵癌細胞のアポトーシスを抑制する

学位論文内容の要旨

**[背景と目的]**

癌組織は正常組織より速く不規則に増殖する結果、血流が不足するため酸素やグルコースの不足状態にさらされるようになる。癌細胞はこうした環境下での生存のため様々な適応応答機能を獲得しており、それが抗癌剤耐性をもたらす原因の一つになっている。難治性癌である膵癌も血管が少なく厳しい低酸素低グルコース状態にあり、抗癌剤抵抗性を示すことが明らかになっている。申請者のグループはこれまで低酸素誘導因子の膵癌細胞の生存維持における役割について検討してきた。しかし、膵癌組織は低酸素状態であるだけでなく低グルコース状態でもあることから低グルコースで誘導される遺伝子群の中にも膵癌細胞の生存維持に関与するものが含まれる可能性が存在する。

DNA マイクロアレイ法により低グルコースで誘導される遺伝子を検索した結果、アスパラギン合成酵素が発現上昇することを見出した。アスパラギン合成酵素は既に低アミノ酸で発現亢進してくることが報告されている。また細胞周期抑制に関わる因子としても同定されている。更に、抗癌剤として L-asparagine を分解する L-asparaginase が知られているが、アスパラギン合成酵素の発現が白血病細胞では L-asparaginase に対する抵抗性をもたらすことが報告されている。申請者は膵癌においてアスパラギン合成酵素が低グルコース環境下で膵癌細胞の生存維持においてどのような役割を持っているか、また抗癌剤抵抗性に関与するかどうかの解明を目的として研究を行った。

**[実験方法]**

正常グルコース濃度下及び低グルコース濃度下で培養した膵癌細胞株のアスパラギン合成酵素の発現を Real Time PCR で調べた。PCR 反応には Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG を使用し、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System で増幅産物を検出した。アスパラギン合成酵素蛋白発現も二つの条件下で検討するため、培養した細胞を 1mM の PMSF を加えた cell lysis buffer で溶解し、SDS-PAGE によりタンパクの分画を行い、PVDF 膜に転写した。細胞のアポトーシス感受性は propidium iodide (PI) と FITC-conjugated 抗-annexin V 抗体を用いた Two-color FACS analysis にて検討した。腫瘍細胞の抗癌剤感受性は colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) assay を用いて検討した。更に、アスパラギン合成酵素の細胞に対する防御作用を調べるために、膵癌細胞の低グルコース環境下でのアスパラギン合成酵素の役割を強制発現の系と siRNA を用いた発現抑制系を用いて検討した。

## [結果]

Real Time PCR 法にて、三種類の膵癌細胞におけるアスパラギン合成酵素 mRNA の発現が低グルコース下で亢進した。また低グルコース下でアスパラギン合成酵素発現は蛋白質レベルでも亢進した結果が得られた。

siRNA にて、アスパラギン合成酵素の発現を抑制すると、細胞は低グルコース誘導アポトーシスに感受性が高くなった；一方、アスパラギン合成酵素を過剰発現させると、細胞は低グルコース誘導アポトーシスに感受性が低くなった。また、siRNA にて、アスパラギン合成酵素の発現を抑制すると、低グルコース下で細胞は抗癌剤 cisplatin に誘導されるアポトーシスに感受性が高くなった。一方、アスパラギン合成酵素を過剰発現させると、低グルコース下で細胞は抗癌剤 cisplatin によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を誘導した。

アスパラギン合成酵素の過剰発現細胞株を用いて低グルコース及び cisplatin 処理後の JNK/SAPK 活性化を検討した結果、空ベクター導入株では JNK/SAPK がリン酸化されたが、アスパラギン合成酵素の導入株では JNK/SAPK のリン酸化が抑制された。この結果はアスパラギン合成酵素発現が低グルコースや cisplatin による JNK/SAPK のリン酸化を抑制することによってアポトーシス抵抗性を誘導している可能性を示唆する。そこで、JNK/SAPK の阻害剤の低グルコース cisplatin 誘導アポトーシスに対する効果を検討した。JNK/SAPK の阻害剤 (SP600125) で処理すると、低グルコースと cisplatin 誘導アポトーシスが抑制された。

## [考察]

本研究にて低グルコースはアスパラギン合成酵素の発現を誘導することと発現亢進したアスパラギン合成酵素によって膵癌細胞がアポトーシス抵抗性となることを明らかにした。これらの結果は、アスパラギン合成酵素発現亢進が低グルコース環境そのものの誘導する低する低グルコース環境への適応応答に関与していることを初めて明らかにしたものと考えられる。さらにアスパラギン合成酵素発現亢進が JNK/SAPK 活性化抑制を介して膵癌細胞の CDDP 抵抗性を誘導している可能性を示唆する。しかしながら、5-FUをはじめとしたほかの抗癌剤も JNK/SAPK の活性化を介してアポトーシスを誘導するとの報告もあり、今回の検討結果は従来の報告とは完全には一致しない。一方 JNK/SAPK の活性化を誘導する SEK1 発現をノックアウトすると肝細胞や T 細胞のアポトーシスを増強するとの報告もあり、JNK/SAPK 自身がアポトーシスに関して相反する作用を持っている可能性が提起されている。したがって、アスパラギン合成酵素発現亢進のアポトーシス阻害作用のメカニズムに関しては今後更なる検討が必要と考えられる。

## [結論]

アスパラギン合成酵素は低グルコース下での膵癌細胞の生存維持に重要な役割を果たしている。臨床においてすでにアスパラギン合成酵素阻害剤の有効性が示唆されており、今後膵癌治療においてもアスパラギン合成酵素阻害剤が候補薬剤となりうる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 守 内 哲 也

副 査 教 授 畠 山 鎮 次

## 学位論文題名

### アスパラギン合成酵素は低グルコース環境下で発現亢進し、 膵癌細胞のアポトーシスを抑制する

膵癌は血管が少ない厳しい低酸素・低グルコース状態下にあるにも関わらず、活発な増殖・浸潤能力を有し、抗癌剤抵抗性を示す。膵癌の低酸素下での活発な増殖・浸潤能には低酸素誘導転写因子 (HIF-1) が関与していることが明らかにされてきた。しかし、膵癌組織は低酸素状態であるだけでなく低グルコース状態でもあることから、低グルコースで誘導される遺伝子群の中にも膵癌細胞の生存維持に関与するものが含まれる可能性がある。DNA マイクロアレイ法により低グルコースで誘導される遺伝子を検索した結果、アスパラギン合成酵素 (ASNS) が発現上昇することを見出した。申請者は低グルコース下で ASNS が膵癌細胞の生存維持における役割について検討した。低グルコース下で ASNS は ATF4 依存的に発現亢進し、低グルコース誘導性アポトーシスから膵癌細胞を保護した。低グルコース下で誘導される ASNS は抗癌剤である cisplatin と carboplatin 誘導性アポトーシスにも抵抗性をもたらした。また、アスパラギン合成酵素の過剰発現細胞株を用いて低グルコース及び cisplatin 処理後の JNK/SAPK 活性化を検討した結果、空ベクター導入株では JNK/SAPK がリン酸化されたが、アスパラギン合成酵素の導入株では JNK/SAPK のリン酸化が抑制された。これらの結果から、アスパラギン合成酵素が低グルコースや cisplatin による JNK/SAPK を介したシグナル伝達系を抑制することによってアポトーシス抵抗性を誘導している可能性が示唆された。

口頭発表に際し、副査の畠山教授より ASNS の抗アポトーシス効果にはアスパラギンの量は関係がなかったのか、ASNS はどのようなメカニズムにより JNK/SAPK に作用するのか、また JNK/SAPK の上流のシグナル伝達系を解析しているかどうか、さらに低グルコース下での TCA サイクルの回転低下によりアミノ酸合成が抑制され、その結果として ASNS が上昇する feedback 機構もあ

りうるのではないかとの質問があった。これに対して申請者は、ASNS による JNK/SAPK の抑制のメカニズムは現時点では明らかではなく JNK/SAPK の上流のシグナル伝達系と ASNS の関係についてはまだ検討していないこと、低グルコース下でアミノ酸合成が抑制されることにより ASNS が上昇する feedback 機構が存在する可能性は否定できないことを回答した。副査の守内教授より膵癌に L-asparaginase が効くのかどうかまたは文献上そのような報告があるか、低酸素下で ATF4 が発現誘導されるか、さらに、低グルコース下でグルタミン合成酵素の発現は変動するかどうかについて質問があった。これに対し申請者は、文献上、膵癌に正常グルコース濃度下では L-asparaginase が効くとの報告もあったが、論理的には低グルコース下では ASNS が発現亢進するので、低グルコース下では効きにくいと思われると回答した。また、低酸素下で ATF4 の発現が誘導されること、低グルコース下でグルタミン合成酵素の発現亢進は見られないと回答した。最後に主査の浅香教授から、正常膵組織と比較して膵癌で ASNS タンパク質の発現が上昇しているのか、また他の膵癌以外の癌細胞では ASNS の発現はどのようになっているのかについて質問があった。これに対し申請者は正常膵組織での ASNS の発現については検討していないが、他の組織に由来する正常細胞を用いた解析では低グルコース下で ASNS の発現上昇は見られない事から、低グルコース下での ASNS の発現上昇は癌特異的である可能性があること、また膵癌以外の癌細胞においても低グルコース下で ASNS の発現亢進が見られたことを回答した。

本研究は ASNS が低グルコース下で膵癌細胞の生存維持に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにしたことで高く評価され、今後、ASNS が JNK/SAPK を抑制するメカニズムがさらに解明されることと、ASNS を分子標的とした膵癌治療への応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。