主　論　文　要　旨

報告番号	㊙甲 乙 第　　　　号	氏　名	戸　髙　明　子

主論文題名

Metabolic profiling of gemcitabine- and paclitaxel-treated immortalized human pancreatic cell lines with K-RAS^{G12D}
（メタボローム解析を用いたKRAS変異をもつ不死化ヒト膵培養細胞におけるゲムシタビン及びパクリタキセルの作用機序に関する研究）

（内容の要旨）

膵がんは予後不良の癌であり、1997年以降、切除不能膵がんに対してはゲムシタビン塩酸塩（gemcitabine: GEM）単剤が標準治療であった。2013年、ヒト血清アルブミンにパクリタキセル（paclitaxel: PTX）を結合させナノ粒子化したnab-PTXとGEMとの併用療法が、GEM単剤に比較して有意に生存を改善し標準治療と位置づけられた。

膵がんは90%以上の症例においてKRAS遺伝子変異を有することが知られている。これまで培養細胞及び動物を用いた研究によって糖代謝、グルタミン代謝が変化することは報告されているが、同じ遺伝的背景であると確認してKRAS変異単独の影響を評価した研究はない。またGEM、及びPTXによる細胞内の網羅的代謝変化についても報告がない。そのため不死化ヒト膵培養細胞を用いて、KRAS変異の有無による代謝変化とGEM、及びPTXによって起こる変化について解析した。

不死化ヒト膵培養細胞（ATCC® CRL-4037™）と、それにK-Ras^{G12D}変異を加えた細胞株（ATCC® CRL-4039™）の2つを研究に用いた。最初に、２つの細胞の遺伝子配列に違いがないことを確認するために、CRL-4037、及びCRL-4039について全エクソーム解析を行った。その結果、CRL-4037とCRL-4039はK-Ras^{G12D}以外に、増殖に関連する遺伝子に変異を持たず、K-Ras^{G12D}単独の影響を評価する目的の本研究に適した細胞と考えた。

次に、CRL-4037、及びCRL-4039の増殖曲線を作成した。その結果、K-Ras^{G12D}を持つCRL-4039の方が、CRL-4037より増殖能が高かった。更に感受性を調べると、GEMに対してはCRL-4039、CRL-4037はほぼ同等であったが、PTXにおいてはCRL-4039の方が高い傾向が認められた。

細胞内代謝の変化を調べるためにCRL-4037、及びCRL-4039から代謝物を抽出し、CE-TOF-MS（capillary electrophoresis - Time-Of-Flight Mass Spectrometr）を用いてメタボローム解析を行った。その結果、CRL-4039において解糖系で、乳酸の増加、グルタミン代謝経路で、グルタミン酸（glutamic acid: Glu）、グルタミン（glutamine: Gln）、アスパラギン酸（aspartic acid: Asp）の減少を認めた。癌組織では酸素の有無によらず解糖系が亢進しており、大量の乳酸を産生することが知られている（Warburg効果）。また、膵がん細胞は、GlnからAspに至る代謝経路が誘導され、オキサロ酢酸、ピルビン酸に変換することによってNADPH/NADP+を高く維持するGln metabolic reprogrammingに強く依存すると報告されており、CRL-4039においてその傾向が確認された。

GEMとPTXを曝露した細胞においても同様の解析を行った。

核酸代謝経路では、GEM曝露によってCRL-4039、CRL-4037においてdeoxyadenosine triphosphate（dATP）及びdeoxycytidine triphosphate（dCTP）の減少が認められた。GEMは細胞内においてリン酸化を受け、活性代謝物であるゲムシタビン二リン酸に代謝され、正常なDNA合成経路のdCTP産生に関わるリボヌクレオチドレダクターゼを抑制し細胞内のdCTP濃度を低下させる作用を有する。この作用によって、dCTP及びdATPが減少したと考えられた。PTXによる核酸代謝の変化は認められず、微小管脱重合を阻害し細胞増殖を抑制する作用機序と一致する結果と考えられた。

本研究は、メタボローム解析を用いて初めてKRAS変異単独の影響を培養細胞で示し、GEMとPTXによる細胞内の代謝変化を明らかにした。これによりKRAS変異を有する細胞の変化が多角的に示され臨床的に有用な知見と考えられた。