



Title	Removal of gemcitabine-induced senescent cancer cells by targeting glutaminase1 improves the therapeutic effect in pancreatic ductal adenocarcinoma
Author(s)	小山, 啓介
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/96309
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏名 Name	小山 啓介
論文題名 Title	Removal of gemcitabine-induced senescent cancer cells by targeting glutaminase1 improves the therapeutic effect in pancreatic ductal adenocarcinoma (グルタミナーゼ1を標的としたゲムシタビン誘導性老化癌細胞の除去は膵癌の治療効果を改善する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>細胞老化とは、細胞が増殖を停止するが活発な代謝を有して長期間生存する現象であり、老化細胞の生存にはグルタミナーゼ1 (GLS1) が不可欠である。がん治療において、癌微小環境の老化細胞は老化随伴分泌現象（以下、SASP）因子を介した癌細胞の治療抵抗性の誘発が注目されている。癌細胞自身も不十分な治療により細胞老化様の変化を起こすことが報告されているが、その特徴は一定の見解がない。本研究では、浸潤性膵管癌（以下、膵癌）においてゲムシタビンを用いた治療誘導性老化癌細胞（以下、老化癌細胞）を定義し、GLS1が治療標的となり得るかを検討した。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>まず <i>in vitro</i> 実験において膵癌細胞 (MIA PaCa2, PANC1) を IC₅₀ 以下であるゲムシタビン 5ng/mL に 72 時間曝露すると、細胞死を伴わずに増殖が抑制され、大型で扁平な細胞形態の変化と senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) 染色で陽性細胞の増加 (4.0±1.8%→80.9±39.5%, p<0.0001) を認めた。非癌細胞における老化細胞と同様の特徴を示すことから、これらを老化癌細胞と定義した。老化癌細胞のゲムシタビン感受性は通常の膵癌細胞（以下、Control）と比較して低下 (Control: IC₅₀ 5.05ng/ml, 老化癌細胞: IC₅₀ 9.06ng/ml, p=0.0027) し、Western-blottingにおいて GLS1 および γH2AX、p21 の蛋白発現が上昇し、SASP 因子の一つである IL-8 が培養上清中で有意に増加 (Control: 55.72pg/ml, 老化癌細胞: 141.1pg/ml, p=0.0015) した。Control を老化癌細胞と共に培養すると、紡錘形に形態変化が観察され、有意に遊走能が上昇 (23.1±5.4%→35.7±5.0%, p=0.0412) した。GLS1 阻害薬であるビス-2-(5-フェニルアセトアミド-1,2,4-チアジアゾール-2-イル)エチルスルフィド (BPTES) 1μM に 48 時間曝露すると、Control では明らかな変化を示さなかつたが、老化癌細胞では GLS1、γH2AX、p21 の蛋白発現が低下し、Caspase-3 の蛋白発現が上昇し、SA-β-Gal 染色陽性細胞の減少 (71.1±4.9%→50.9±12.7%, p=0.0293) が観察された。老化癌細胞と比較し、BPTES で処理することで共培養された Control の遊走能は低下 (35.7±5.0%→24.1±5.6%, p=0.0357) した。老化癌細胞は通常の膵癌細胞に対して上皮間葉転換 (EMT) を誘導したが、BPTES 投与で老化癌細胞がアポトーシスにより選択的に除去された。</p>	
<p>続いて <i>in vivo</i> 実験において BALB/cAJcl-nu/nu マウスに皮下移植した膵癌細胞は、ゲムシタビン 50mg/kg 腹腔内投与で最も SA-β-Gal 染色陽性細胞が増加し、それ以上の濃度では減少 (0mg/kg (Dimethyl sulfoxide): 58.5±53.5 μm²/view, 50mg/kg: 602.6±196.2 μm²/view, 100mg/kg: 69.4±56.1 μm²/view, p<0.0001, p<0.0001) した。Western-blottingにおいてもゲムシタビン 50mg/kg 投与で GLS1 の蛋白発現が最大となった。また、ゲムシタビン 50mg/kg に加えて BPTES 10mg/kg 腹腔内投与を行うことで SA-β-Gal 染色陽性細胞は減少し、Ki-67 蛋白発現の 45.1% 低下 (p=0.0434) および TUNEL 陽性細胞の 27.0% 増加 (p=0.0227) が認められた。</p>	
<p>ゲムシタビンを含む術前化学療法を受けた膵癌切除 50 例を対象に、GLS1 高発現 27 例と低発現 23 例を比較すると、無再発生存期間中央値は GLS1 高発現 16.5 カ月、低発現 76.0 カ月 (p=0.0282)、全生存期間中央値は高発現 34.0 カ月、低発現 81.0 カ月 (p=0.0205) となり、多変量解析において GLS1 高発現は術前化学療法後の膵癌切除症例において独立した予後因子であった。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>膵癌細胞において不十分な濃度のゲムシタビンは老化癌細胞を誘導し、老化癌細胞が SASP 因子を放出することで周囲の膵癌細胞の EMT を誘導すること、GLS1 の発現が上昇しており、GLS1 を阻害することでアポトーシスにより選択的に除去されることを示した。ゲムシタビンを含む術前化学療法後の膵癌切除検体において GLS1 発現細胞が多く認められる場合は予後が不良であるが、従来治療との併用により治療効果の改善が見込まれることが示唆された。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 小山 啓介

論文審査担当者	(職)	氏名	署名
	主 査 大阪大学教授	江口 英利	
	副 査 大阪大学教授	伊藤 通義	
	副 査 大阪大学教授	小川 和幸	

論文審査の結果の要旨

細胞老化は癌治療抵抗性に関連することが注目されており、本論文は肺癌において治療誘導老化癌 (iSnCa) 細胞を定義しグルタミナーゼ 1 (GLS1) が治療標的となり得ることを検証した研究である。肺癌細胞に不十分な治療濃度のゲムシタビンを投与することでiSnCa細胞が誘導され、GLS1阻害薬であるBPTESをゲムシタビンと併用することにより、アポトーシスが誘導され、iSnCa細胞が選択的に除去されることを細胞実験、動物実験で示した。化学療法の治療効果が不十分であった場合はiSnCa細胞が生じてGLS1が高発現であるという仮定のもと術前化学療法を受けた肺癌切除例においてGLS1高発現症例は低発現症例に比し全生存期間、無再発生存期間が有意に短く、GLS1高発現が独立した予後因子であることを示した。

本論文は肺癌細胞におけるiSnCa細胞の特性およびiSnCa細胞が治療抵抗性に寄与することを示し、今後はGLS1阻害薬を従来治療と併用することによる治療効果向上が期待される研究成果であり、International Journal of Cancer誌に掲載され、博士（医学）の学位授与に値する。