



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/96309">https://hdl.handle.net/11094/96309</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> 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)〕	
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。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
まず <i>in vitro</i> 実験において膵癌細胞 (MIA PaCa2, PANC1) をIC <sub>50</sub> 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: IC <sub>50</sub> 5.05ng/ml, 老化癌細胞:IC <sub>50</sub> 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時間暴露すると、Controlでは明らかな変化を示さなかったが、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。	
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±53.5μm <sup>2</sup> /view, 50mg/kg: 602.6±196.2μm <sup>2</sup> /view, 100mg/kg: 69.4±56.1μm <sup>2</sup> /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BPTES10mg/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。	
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ヵ月、低発現76.0ヵ月 (p=0.0282)、全生存期間中央値は高発現34.0ヵ月、低発現81.0ヵ月 (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。	
〔総 括(Conclusion)〕	
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。	

## 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	岸田	直毅	
	副 査	大阪大学教授	小川	和彦	

## 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ピ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をゲムシタピ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。