

ヒト神経芽腫細胞株における  
新規ポリエチレングリコール誘導体 PEG-B  
による抗腫瘍効果の検討  
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程

生理系機能生理学専攻

長崎瑛里

修了年 2019 年

指導教員 越永從道

## はじめに

化学療法は手術療法、放射線療法とともにがんの三大療法の 1 つであり、特に小児においては、成人と比較して全身転移をきたして発見されるものが多いことや、化学療法に感受性のある腫瘍が多いことから、がん治療の中心的役割を担っているといえる。抗がん剤の最大の問題点は、腫瘍細胞だけでなく正常細胞も障害するため、生体内で様々な副作用を生じることであるが、小児がんの治療にあたっては、発育途上であることや治療後に長い余命が期待できることから、極力副作用の少ない抗がん剤の使用が切望される。

新種の子囊菌由来のポリエチレングリコール化合物およびその誘導體 (Polyethylene glycol derivatives: PEG-B) は培養系において各種ヒト腫瘍細胞に対し強い細胞障害性を示す一方、正常細胞の生存率にはほとんど影響を与えない。このことから、PEG-B は副作用の少ない新規の抗腫瘍薬として期待できると考えられるが、その詳細な作用機序は明らかでない。本研究では、特に小児がんで発症頻度が高い神経芽腫における PEG-B の抗腫瘍効果について検討し、PEG-B の細胞障害作用の機序を解明することを目的として実験を行った。

## 目的

ヒト神経芽腫細胞株を用いて PEG-B の抗腫瘍効果について検討し、PEG-B

の細胞障害作用の機序を解明する。

## 対象と方法

ヒト神経芽腫細胞株の NB9 (*MYCN* コピー数増幅株)、SK-N-AS (*MYCN* コピー数非増幅株)、ヒト正常線維芽細胞 HDF に 0~50  $\mu$  M の PEG-B を添加し、72 時間後の細胞生存率を WST (Water soluble Tetrazolium salts)-8 assay で解析した。また、細胞増殖能については、NB9 および SK-N-AS に 1  $\mu$  M の PEG-B または溶媒のみを添加し、24 時間毎 1 週間 WST-8 assay を行い解析した。

PEG-B 添加後の細胞周期の解析は、NB9 および SK-N-AS に 0、0.1、1  $\mu$  M の PEG-B を添加後 24 または 72 時間目に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて核内 Deoxyribonucleic acid (DNA) 量を測定した。

グルコース欠乏下における細胞生存比については、NB9 および SK-N-AS にグルコース濃度の異なる培養条件下で 1  $\mu$  M の PEG-B または溶媒のみを添加し、72 時間後に WST-8 assay を行い解析した。グルコース濃度は、グルコースなし、通常濃度の 1/5 の濃度、通常濃度の 3 段階に設定し、結果は、PEG-B 非添加・グルコース通常濃度下培養群を 1 とした細胞生存比で解析した。細胞死様式については、NB9 および SK-N-AS にグルコース濃度の異なる培養条件下で 0.1、1  $\mu$  M の PEG-B または溶媒のみを添加し、72 時間後に Annexin V-FITC

apoptosis detection kit を用いて、アポトーシス細胞の比率を解析した。グルコース欠乏下における Adenosine triphosphate (ATP)濃度については、NB9 および SK-N-AS にグルコース濃度の異なる培養条件下で  $1\ \mu\text{M}$  の PEG-B または溶媒のみを添加し、12 時間培養後、Intracellular ATP 測定キットを用いて解析した。

さらに詳細な PEG-B の作用点を絞り込むため、メタボローム解析を行い、PEG-B 添加前後で変化する代謝産物を検討した。PEG-B によるミトコンドリアの呼吸活性の変化を検討するため、Flux Analyzer で酸素消費速度 (Oxygen Consumption Rate: OCR) を計測した。PEG-B による呼吸鎖複合体 I ~IV の活性変化について、MitoCheck Complex I, II/III, IV Activity Assay Kit を用いて解析した。

## 結果

NB9 および SK-N-AS に PEG-B を  $0\sim 50\ \mu\text{M}$  の濃度で添加すると、濃度依存的に細胞生存率が低下した (NB9 では、PEG-B  $10\ \mu\text{M}$  : \*P=0.0162、 $20\ \mu\text{M}$  : \*\*P=4.23E-03、 $50\ \mu\text{M}$  : \*\*P=3.72E-03、SK-N-AS では、 $1\ \mu\text{M}$  : \*\*P=4.70E-06、 $10\ \mu\text{M}$  : \*\*P=8.82E-05、 $20\ \mu\text{M}$  : \*\*P=1.74E-05、 $50\ \mu\text{M}$  : \*\*P=1.51E-05)。一方、HDF では高濃度の PEG-B 添加でも 50%以上の細胞が生存していた (PEG-

B 0.1  $\mu$  M : \*P=0.0183、1  $\mu$  M : \*\*P=2.31E-04、10  $\mu$  M : \*\*P=3.20E-03、20  $\mu$  M : \*\*P=2.88E-03、50  $\mu$  M : \*\*P=3.57E-04)。細胞増殖能を解析すると、NB9 においては PEG-B 添加後 3 日目以降に増殖の抑制がみられるようになり、4 日目より非添加群との差が有意となった (PEG-B 添加後 4 日目 : \*\*P=8.67E-03、5 日目 : \*\*P=1.86E-04、6 日目 : \*\*P=3.04E-05、7 日目 : \*\*P=3.22E-07)。SK-N-AS においては、PEG-B 添加後に細胞増殖は全くみられず、添加後 1 日目より非添加群との間に有意な差を認めた (PEG-B 添加後 1 日目 : \*P=0.0198、2 日目 : \*\*P=6.29E-07、3 日目 : \*\*P=4.60E-06、4 日目 : \*\*P=2.16E-04、5 日目 : \*\*P=5.83E-04、6 日目 : \*\*P=4.69E-04、7 日目 : \*\*P=3.86E-05)。細胞周期を解析すると、PEG-B 添加後 24 時間の時点では、両者ともに G0-G1 期や G2/M 期の細胞の比率が増大したが、SubG1 期の増加は認められなかった。一方、PEG-B 添加 72 時間後においては、両者ともに SubG1 期の細胞の比率の増加、すなわち死細胞の増加が認められた。

グルコース欠乏実験では、NB9、SK-N-AS とともに、グルコース不含培地において特に、PEG-B 添加による細胞生存比の顕著な低下を認めた (NB9 では、グルコース濃度 0g/L : \*\*P=2.28E-07、0.4g/L : \*\*P=4.52E-05、2g/L : \*\*P=1.50E-03、SK-N-AS では、グルコース濃度 0g/L : \*\*P=9.19E-04、0.9g/L : \*\*P=6.49E-05、4.5g/L : \*\*P=6.58E-06)。細胞死様式を検討すると、NB9 ではグルコース

不含培地においてのみ、PEG-B 添加によりアポトーシス細胞の比率が顕著に増加し、非添加群と比べて有意に高い値を示した (\*\*P=2.04E-03)。一方、SK-N-AS ではいずれの培地においても PEG-B 添加群は非添加群と比べてアポトーシス細胞の有意な増加を示したが、特に低グルコース培地、グルコース不含培地においてその差が顕著であった (グルコース濃度 0g/L : \*\*P=5.44E-03、0.9g/L : \*\*P=1.68E-03、4.5g/L : \*P=0.0268)。さらに、細胞内 ATP 濃度を測定すると、NB9 ではグルコース不含培地においてのみ、PEG-B 添加により細胞内 ATP 濃度が有意に低下した (\*P=0.0145)。一方、SK-N-AS ではいずれの培地においても PEG-B 添加群は非添加群と比べて細胞内 ATP 量の有意な低下を示したが、特にグルコース不含培地においてその差が顕著であった (グルコース濃度 0g/L : \*P=0.0217、0.9g/L : \*P=0.0243、4.5g/L : \*\*P=1.78E-03)。

PEG-B 添加後の細胞内代謝物をメタボローム解析により網羅的に調べると、NB9 においては、PEG-B 添加群では非添加群と比較し、カルニチンの有意な低下 (\*P=0.002)、アセチルカルニチンの増加傾向、Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate (NADH)の有意な増加 (\*\*P=0.001) が認められた。解糖系および Tricarboxylic acid (TCA)回路については、一定の傾向は認められなかった。SK-N-AS においては、PEG-B 添加群では非添加群と比較し、解糖系の亢進傾向、TCA 回路の抑制傾向、カルニチンの有意な低下(\*P=0.029)、アセチル

カルニチンの有意な増加 (\*P=0.044)、NADH の増加傾向が認められた。

ミトコンドリア呼吸活性の解析では、NB9、SK-N-AS いずれにおいても、PEG-B 添加後に顕著な OCR の低下が認められたが、この PEG-B による OCR の抑制は Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)によっても解除されなかった。さらに、PEG-B 添加による呼吸鎖複合体 I ~IVの活性変化の解析において、PEG-B は呼吸鎖複合体の一部の活性を有意に抑制した。

## 考察

PEG-B は *MYCN* コピー数増幅の有無に関わらず、神経芽腫細胞に対し増殖抑制効果を示した。正常細胞に対する効果は限定的であったことから、神経芽腫に対する副作用の少ない治療薬として大いに期待できると考えられた。細胞周期を解析すると、PEG-B による細胞死の誘導は添加後 24 時間目には認められず、添加後 72 時間目で観察された。PEG-B を添加してすぐではなく時間が経ってから死細胞が増加したことから、時間とともに培地の栄養が枯渇したために細胞死が誘導されている可能性が示唆された。そのため、グルコース欠乏実験を行ったところ、グルコース欠乏下において特に、PEG-B 添加による顕著な細胞生存率の低下とアポトーシス細胞の比率の増加を認め、さらに細胞内 ATP 濃度の顕著な低下を認めた。以上の結果から、PEG-B は解糖系以外の ATP 産生経

路を阻害し、細胞の増殖を抑制している可能性が示唆された。

メタボローム解析の結果、NB9、SK-N-AS ともに、PEG-B 添加により、カルニチンの低下、アセチルカルニチンの増加、NADH の増加が認められたことと、SK-N-AS において、解糖系の亢進傾向と TCA 回路の抑制傾向が認められたことから、PEG-B はミトコンドリア呼吸鎖複合体を阻害している可能性が考えられた。さらにミトコンドリア呼吸活性の解析結果から、PEG-B の作用点の候補として呼吸鎖複合体 I ~IV に絞り込むことができた。この結果を踏まえて、PEG-B 添加後の複合体 I ~IV の活性変化を検討したところ、複合体の一部の活性を有意に抑制した。PEG-B が腫瘍細胞に特異的に効果を発揮する理由としては、腫瘍細胞は ATP を大量生産・消費して増殖するが、PEG-B により酸化的リン酸化による効率的な ATP 産生を阻害されるからであると考えられた。

近年、がん細胞はその増殖・生存を維持する上で糖質への依存度が高いことに着目し、糖質を制限したケトン食が欧米で注目されている。本研究では、PEG-B はグルコース欠乏下において顕著に効果を発揮したことから、ケトン食との併用により相乗効果が期待できる。今後、動物実験において、通常食およびケトン食飼育下で PEG-B を投与し、生体内における PEG-B の抗腫瘍効果を検討することが必要であると考えられる。

## 結語

PEG-B は酸化的リン酸化による効率的な ATP 産生を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。