

研究報告書  
令和4年度：A課題

令和6年4月8日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 岐阜薬科大学  
生命薬学大講座生化学研究室  
住 所 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4  
研究者氏名 五十里 彰

(研究課題)

細胞間タイト結合分子クローデインによるがん微小環境の脂肪酸代謝の変化と治療抵抗化

---

令和5年1月23日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 【研究の背景と目的】

分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬などの開発により、がんの5年生存率は向上しているが、治療抵抗化や再発の課題が未解決である。生体内でがん細胞は微小環境を形成し、その深部は低栄養、低酸素のマイルドなストレス状態である。このストレス環境が治療抵抗化及び再発に寄与すると考えられるが、その形成機構は大部分が不明である。近年、我々はヒト肺腺がん組織に細胞間タイト結合分子のクローディン-1 (CLDN1) と CLDN2 が高発現することを見出し、微小環境の治療抵抗化に寄与することを解明した。さらに、マイクロアレイ及びメタボローム解析により、CLDN2 が糖代謝酵素の発現量と糖代謝物の濃度を低下させることを見出した。一方、CLDN1 は脂肪酸代謝物の濃度を低下させたが、その機序と役割は不明である。大腸がん、乳がん、肝がん組織などでも CLDN1 発現が増加するため、その病態生理機能の解明が期待される。本研究では、三次元培養したがん細胞を用いて脂肪酸輸送体と代謝酵素の発現に対する CLDN1 の影響を調べた。さらに、抗がん剤抵抗性に対する脂肪酸の影響を検討し、がん生存環境の新たな構築機構を検討した。

## 【方法と結果】

### 1. 脂肪酸合成酵素の発現に対する CLDN1 発現の影響

ヒト肺腺がん由来 A549 細胞を丸底ウェルプレートで培養すると、球状のスフェロイドが形成される。siRNA を用いて CLDN1 発現をノックダウンすると、脂肪酸合成に関わるアセチル CoA カルボキシラーゼや脂肪酸シターゼの発現量が減少した。一方、CLDN2 発現のノックダウンでは、これらの酵素の発現量は変化しなかった。

### 2. 脂肪酸合成酵素の発現調節機構の検討

脂肪酸合成に関与する酵素の発現調節機構を解明するため、低酸素、低グルコース、低アミノ酸の影響を検討した。その結果、低酸素暴露によりアセチル CoA カルボキシラーゼや脂肪酸シターゼの発現量が増加したが、低グルコースや低アミノ酸暴露では有意に変化しなかった。CLDN1 発現と脂肪酸合成の関係が示唆されたため、スフェロイドの脂肪酸濃度を測定したところ、CLDN1 発現のノックダウンにより脂肪酸濃度が減少した。

### 3. 抗がん剤抵抗性に対する脂肪酸の影響

抗がん剤による細胞毒性を ATP 濃度によって評価した。アントラサイクリン系抗がん剤のドキソルビシンをスフェロイドに処理したところ、濃度依存的に細胞生存率が低下した。この効果は、脂肪酸合成酵素阻害薬であるオルリスタットの共処理により増強した。一方、脂肪滴合成を促進するオレイン酸の共処理により細胞毒性が軽減した。

### 4. ドキソルビシンの細胞局在の解析

Lipid Droplet Assay Kit を用いて、脂肪滴とドキソルビシンの細胞局在を調べた。その結果、脂肪滴とドキソルビシンが細胞内に共局在する蛍光画像が得られた。また、オルリスタット処理細胞では脂肪滴の量が減少し、粒状のドキソルビシンの蛍光強度も減少した。

### 5. CLDN1 の発現低下作用をもつ化合物の探索

CLDN1 が抗がん剤抵抗化に寄与するため、その発現を低下させる化合物を探索した。ドッキングシミュレーションやウエスタンブロット解析により、CLDN1 の発現低下作用をもつ化合物を1種類同定した。現在、がんモデル動物を用いて化合物の効果を検討している。

## 【考察と今後の展望】

今回の解析により、三次元培養した肺腺がん細胞において CLDN1 が脂肪酸合成に関与する酵素の発現量を増加させ、脂肪酸合成量を増加させることが明らかになった。さらに、脂肪酸合成の阻害により抗がん剤毒性が増大し、脂肪酸合成の促進により抗がん剤毒性が軽減した。これらの結果から、脂肪酸濃度の増加によって脂肪滴合成が促進すると、抗がん剤毒性が軽減することが示唆された。また、脂肪滴にドキソルビシンが蓄積するような蛍光画像が観察されたため、がん細胞は脂肪滴の内部に抗がん剤を隔離することにより、抗がん剤毒性を軽減すると考えられた。今後、脂肪滴と他の抗がん剤の毒性との関係を検討する必要がある。また、がんモデル動物を用いて、CLDN1 発現、脂肪酸合成、脂肪滴形成、抗がん剤抵抗化の関係を解明する必要がある。

**【謝辞】**

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人がん研究振興財団に厚く御礼申し上げます。