

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11023

研究課題名(和文)生活習慣病薬による大腸癌の抗腫瘍作用：新規化学予防薬としての降圧薬ARBの関与

研究課題名(英文)Antitumor effects of lifestyle drugs on colorectal cancer: Involvement of antihypertensive drug ARB as a novel chemopreventive agent

研究代表者

小原 英幹 (Kobara, Hideki)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10612476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：降圧剤テルミサルタンの大腸癌に対する抗腫瘍効果の可能性を探索した。大腸癌細胞株で確認されたその腫瘍抑制効果は細胞周期でみられなかった。そこで大腸腫瘍の1つである消化管間質性腫瘍(GIST)にターゲットを変更した。GIST細胞株に対するその抗腫瘍効果を確認後、Cyclin D1の発現低下を介したG0-G1細胞周期を抑制することを発見した。その作用機序は、AMPK リン酸化の促進が考えられた。さらに、テルミサルタン投与GIST-T1細胞はmiRNA1307-3pの発現低下がみられ特異的microRNAを介した抗腫瘍効果も確認された。テルミサルタンは大腸GISTに抗腫瘍効果を示しうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増加する大腸癌の新規治療薬を模索する中、降圧剤テルミサルタンの大腸癌に対する抗腫瘍効果に関しての可能性を探索した。大腸癌細胞株で確認されたその腫瘍抑制効果は細胞周期でみられなかった。そこで大腸腫瘍の1つである消化管間質性腫瘍(GIST)をターゲットとし、GIST-T1細胞株に対するその抗腫瘍効果を確認後、Cyclin D1の発現低下を介したG0-G1細胞周期を抑制することを発見した。その作用機序は、AMPK リン酸化の促進が考えられた。テルミサルタンは大腸GISTに抗腫瘍効果を有する可能性が示され、新規治療薬に繋がる研究結果が見出された。

研究成果の概要(英文)：We explored the possibility that the antihypertensive drug telmisartan may have antitumor effects on colorectal cancer. The tumor-suppressive effects observed in colorectal cancer cell lines were not observed in the cell cycle, so the target was changed to gastrointestinal stromal tumors (GIST), a type of colorectal tumor. After confirming its antitumor effect on the GIST-T1 cell line, we found that it suppressed the G0-G1 cell cycle via down-regulation of Cyclin D1. The mechanism of action was thought to be the promotion of AMPK phosphorylation. Furthermore, GIST-T1 cells treated with telmisartan showed decreased expression of miRNA1307-3p, confirming the antitumor effect mediated by specific microRNAs. Telmisartan may have an antitumor effect on colorectal GIST.

研究分野：消化器病

キーワード：大腸癌 間葉系腫瘍 抗腫瘍薬

### 1. 研究開始当初の背景

近年、本邦では生活習慣病のひとつとして高脂肪、低繊維食の欧米型食生活が原因として挙げられる大腸癌が急速に増加し、今や罹患率が第一位になり大腸がんの患者数は、26万1,000人とされる。がんを含む大腸腫瘍の罹患率の増加が予測されるなか、がん撲滅への究極の対策として「いかにその発生を減らし無くすか」という予防医学が注目される。薬剤を用いて疾病を予防するという概念は「化学予防」と呼ばれ、低用量アスピリン長期使用に大腸腫瘍の予防効果は認められると報告される。さらに、副作用の少ない抗糖尿病薬メトホルミンが大腸癌の化学予防薬として有用であることが報告され、申請者の研究室でも各種消化器癌に対するその抗腫瘍作用を実験系で示してきた。以上の報告のように、各生活習慣病のなかである種の治療薬が原疾患の治療のみならず癌予防効果を示す臨床的效果は大きい。そこで、疾患比率の高い高血圧に対する降圧剤が化学予防薬としての抗腫瘍効果を有するならば、患者にとっても医療経済的にも二重のメリットになる。生活習慣病の一大疾患である高血圧症においてアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の一つである降圧剤テルミサルタンは、食道腺癌に対する抗腫瘍効果が我々の実験系で実証され化学予防薬としての可能性を秘めている。そこで降圧剤が大腸癌発生予防効果を示すかを探索した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生活習慣病の高血圧に対する降圧剤の1つであるテルミサルタンの大腸癌に対する抗腫瘍効果に関して、そのメカニズムに関連する分子(アポトーシス関連分子、血管新生分子、チロシンキナーゼ分子、microRNA)を網羅的に解析し、テルミサルタンの抗腫瘍作用の機構を明らかにし、化学予防薬としての可能性を探求することにある。近年、食生活の欧米化による罹患率増加が注目される大腸癌をターゲットとし、その抗腫瘍効果とメカニズムについて検証する。社会背景を考慮したこれらの高頻度疾患において「降圧剤が大腸癌発生予防の相乗効果を生み出す」という基礎的研究から臨床への応用が期待される研究である。

### 3. 研究の方法

大腸癌細胞株におけるテルミサルタンの腫瘍増殖抑制効果をみるため  $5 \times 10^3$  の大腸癌細胞株(CACO-2、COLO320)の組織培養を開始し  $0 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$  のテルミサルタンを投与後、24、48、72時間後に cell counting kit を用いて、MTT assay を行う。各濃度のテルミサルタン投与後、フローサイトメトリーを用いて時間経過 24、48 時間後の細胞の細胞周期パターンを検討する。投与後、24、48 時間後の細胞を集め、各細胞周期に機能する細胞周期関連分子の発現量を Western blot により解析する。解析分子は、G1 期に働く Cyclin D1 と E、Cdk2、Cdk4、Cdk6 及び S 期に働く Cyclin A、G2 期に働く Cyclin A、Cdk1 である。またその上流に位置する PI3K、Akt、mTOR、p70s6k などの関連蛋白についても検討する。アレイを用いて血管新生分子およびレセプター型チロシンキナーゼへの影響も検討する。次いで、移植大腸癌におけるテルミサルタンの腫瘍増殖抑制効果をみるためにヌードマウスの皮下に移植した大腸癌組織に対するテルミサルタン投与による癌細胞増殖抑制の解析を行う。次いでテルミサルタンの癌細胞増殖抑制過程に関連する microRNA の同定を行う。

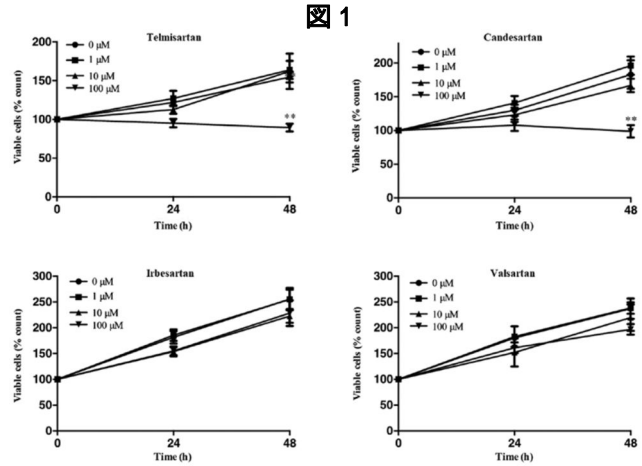
テルミサルタン投与により癌細胞株に特異的に増強、減弱する microRNA の機能解析を行い増強、減少する microRNA の直接、間接的に影響をあたえる分子を同定する。テルミサルタンが、大腸

癌において抗腫瘍効果が期待通りの結果が得られなければ、他の消化器癌に対する効果につき追加検討を行うこととした。

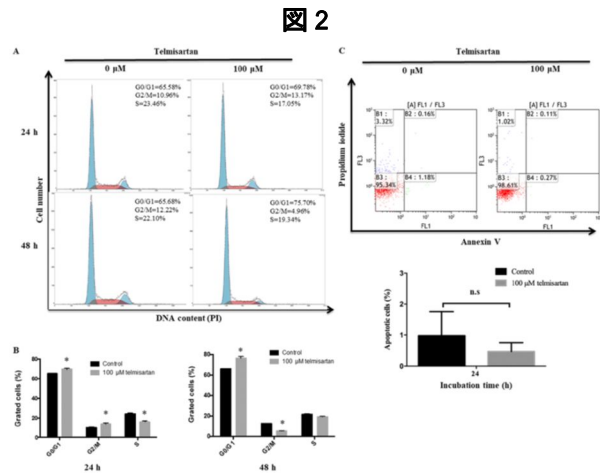
#### 4. 研究成果

大腸癌細胞株で確認されたその腫瘍抑制効果は細胞周期でみられなかった。そこで大腸腫瘍の1つである消化管間質性腫瘍 (GIST) にターゲットを変更し追加検討を行った。

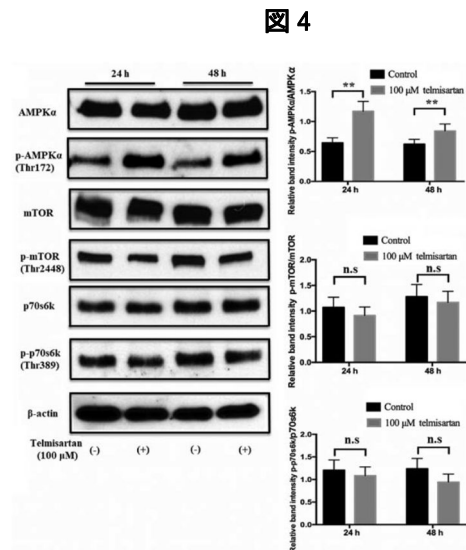
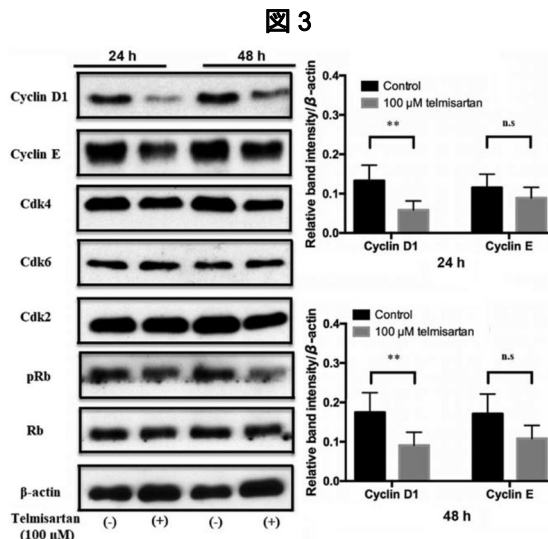
まず、GIST-T1 細胞株における4種類のアンジオテンシン II 受容体拮抗薬(テルミサルタン、カンデサルタン、イルベサルタン、バルサルタン)の抗増殖作用について調べた。テルミサルタンとカンデサルタンは、GIST-T1 細胞の細胞増殖を抑制した。各薬剤の濃度 100um を投与したところ、テルミサルタンにおいてGIST-T1 細胞に有意な抑制効果が認められた(図1)。



テルミサルタンは、GIST-T1 細胞のG0/G1 細胞周期停止を誘導した。図2(A) フローサイトメトリーによるGIST-T1 細胞のG0/G1、S、G2/M 相の分布を示す。(B)GIST-T1 細胞のG0/G1、S、G2/M 相の割合を示すヒストグラム。細胞のG0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を示すヒストグラム。\*P<0.05 vs. コントロール。C) テルミサルタンは、GIST-T1 細胞にアポトーシスを誘導しなかった。



100 μm テルミサルタン添加後 24 時間および 48 時間の GIST-T1 細胞における Cyclin D1、Cdk4、Cdk6、Cyclin E、Cdk2、p-Rb のタンパク質発現量を示す代表的なウェスタンブロットングおよびデンストメトリー解析結果を示す(図3)。GIST-T1 細胞では、テルミサルタン投与により、対照群に比べて Cyclin D1 の発現が減少した。一方、p-mTOR、p70s6k、p-p70s6k のタンパク質発現レベルを示すウェスタンブロットとデンストメトリー解析を行った。テルミサルタンは、GIST-T1 細胞において、AMPK を活性化したが、mTOR を抑制しなかった(図4)。



miRNA マイクロアレイを用いて、100  $\mu$ m のテルミサルタンを投与した細胞における 2,555 種類の miRNA の発現量を調べました。欠損値のある miRNA を除外した結果、14 種類の miRNA が有意に異なる発現を示した。そのうち、7 種類の miRNA は有意に上昇し、残りの 7 種類の miRNA は低下した。テルミサルタン投与 GIST-T1 細胞は miRNA1307-3p の著明な発現低下がみられ特異的 microRNA を介した抗腫瘍効果も確認された (表 1)。

表 1

A, Upregulated miRNAs	FC (treated/untreated)	P-value	Chromosomal location
hsa-miR-4634	2.03	0.0022	5q35.2
hsa-miR-1237-5p	1.79	0.0087	11q13.1
hsa-miR-3663-3p	1.70	0.0087	10q25.3
hsa-miR-4697-5p	1.65	0.0022	11q25
hsa-miR-8063	1.63	0.0087	15q14
hsa-miR-8059	1.57	0.0050	21p12
hsa-miR-128-1-5p	1.52	0.0087	2q21.3
B, Downregulated miRNAs	FC (treated/untreated)	P-value	Chromosomal location
hsa-miR-1307-3p	0.28	0.0087	10q24.33
hsa-let-7f-1-3p	0.54	0.0043	9q22.32
hsa-miR-5739	0.58	0.0022	22q12.1
hsa-miR-4286	0.59	0.0050	8p23.1
hsa-miR-3135b	0.64	0.0050	6p21.32
hsa-miR-125a-3p	0.64	0.0087	19q13.41
hsa-miR-2467-3p	0.64	0.0050	2q37.3

FC, Fold change; miRNA, microRNA; GIST, gastrointestinal stromal tumor. Upregulated miRNAs with FC >1.5 and P<0.05 are presented. Downregulated miRNAs with FC <0.68 and P<0.05 are presented.

これらの結果を以下にまとめる。大腸腫瘍の 1 つである GIST をターゲットとし、GIST-T1 細胞株に対するその抗腫瘍効果を確認後、Cyclin D1 の発現低下を介した G0-G1 細胞周期を抑制することを発見した。その作用機序は、AMPK リン酸化の促進が考えられた。さらに、テルミサルタン投与 GIST-T1 細胞は miRNA1307-3p の発現低下がみられ特異的 microRNA を介した抗腫瘍効果も確認された。テルミサルタンは大腸 GIST に抗腫瘍効果を有する可能性が示され、新規治療薬に繋がる研究結果が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui T, Chiyo T, Kobara H, Fujihara S, Fujita K, Namima D, Nakahara M, Kobayashi N, Nishiyama N, Yachida T, Morishita A, Iwama H, Masaki T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Telmisartan Inhibits Cell Proliferation and Tumor Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Inducing S-Phase Arrest In Vitro and In Vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20133197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chiyo T, Fujita K, Iwama H, Fujihara S, Tadokoro T, Ohura K, Matsui T, Goda Y, Kobayashi N, Nishiyama N, Yachida T, Morishita A, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M, Himoto T, Masaki T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Galectin-9 Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis of Esophageal Cancer In Vitro and In Vivo in a Xenograft Mouse Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobara H, Fujihara S, Iwama H, Masaki T, et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Antihypertensive drug telmisartan inhibits cell proliferation of gastrointestinal stromal tumor cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2020.11144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岩間 久和  (Iwama Hisakazu)  (20398035)	香川大学・医学部・准教授    (16201)	
研究分担者	森 宏仁  (Mori Hirohito)  (20568844)	香川大学・医学部・客員教授    (16201)	
研究分担者	正木 勉  (Masaki Tsutomu)  (30335848)	香川大学・医学部・教授    (16201)	
研究分担者	千代 大翔  (Chiyo Taiga)  (50769346)	香川大学・医学部附属病院・助教    (16201)	
研究分担者	藤田 浩二  (Fujita Koji)  (50749421)	香川大学・医学部附属病院・助教    (16201)	
研究分担者	西山 典子  (Nishiyama Noriko)  (50613410)	香川大学・医学部附属病院・医員    (16201)	

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関