

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14416

研究課題名(和文)食品成分の動態学的特性に基づいた乳がん補完代替療法への応用

研究課題名(英文) Application of complementary and alternative medicine for breast cancer based on kinetic characteristics of food components

研究代表者

鳴海 克哉 (Narumi, Katsuya)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90746752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食品成分の動態学的特性に着目し、乳がん細胞の増殖抑制効果を明らかにすることにより乳がん補完代替療法としての食品成分の有用性を検証した。Phloretinをはじめとしたいくつかのポリフェノール類は乳がん細胞株の細胞生存率および乳酸輸送を低下させた一方で、乳がん細胞株に対する抗エストロゲン製剤タモキシフェンの感受性を低下させた。また、このタモキシフェン感受性の低下にはモノカルボン酸輸送担体MCT4の機能抑制が一部関与していることが示唆された。以上、MCT阻害作用を有するポリフェノール類は乳がん細胞に対して増殖抑制効果を示すが、一方で抗エストロゲン療法の感受性を低下させる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では食品や飲料に含まれる成分が乳がん細胞に対して増殖抑制効果を有することが示されたが、食品成分の体内動態(吸収性、安定性等)を考慮すると日常的に摂取可能な範囲内でその有効性が認められる可能性は極めて低い。また、一部のポリフェノール類は抗エストロゲン剤タモキシフェンが効きにくくなる可能性が示されたが、今後そのメカニズムを含めた乳がん補完代替療法の有用性に関する新たな知見の創出が望まれる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the usefulness of food components as complementary and alternative medicines for breast cancer by focusing on components' kinetic characteristics and by assessing their inhibitory effects against breast cancer cell growth. Some polyphenols (e.g., phloretin) reduced MCF-7 cell viability and lactate transport; however, they also reduced tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-positive breast cancer cell lines. Moreover, the functional suppression of monocarboxylate transporter 4 appeared to be partially involved in reducing cancer cell sensitivity to tamoxifen. Our results suggested that these polyphenols are cytotoxic and decrease the viability of breast cancer cell lines by inhibiting the activity of monocarboxylate transporters and reducing lactate transport. However, they may also reduce sensitivity to tamoxifen.

研究分野：薬物動態学

キーワード：乳がん モノカルボン酸トランスポーター 乳酸 ポリフェノール

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本邦において乳がんは年々増加傾向であり、女性におけるがん罹患率のトップである。モノカルボン酸トランスポーター (MCTs) は、乳酸やケトン体といった代謝中間体の輸送に関与する膜タンパク質であり、がん細胞では主に MCT1 および MCT4 が高発現し、過剰に産生される乳酸を細胞外へ排泄するポンプの役割を担っている。また最近では MCT の発現が乳がんの予後不良と相関することが報告されている。このような背景から細胞内外の乳酸輸送を制御する MCTs は乳がん治療の標的として注目されており、これらのトランスポーターに対する阻害剤は制がん剤としての作用が期待される。しかしながら、現状 MCT を標的とした医薬品はまだ上市に至っていない。これまで我々の研究グループでは、MCTs の選択的な基質/阻害剤となる化合物を見出している。また、MCT 阻害作用を有するポリフェノール類も報告されているが、MCT 活性に対するこれらの阻害効果とがん細胞の生存・増殖との関連性については明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

近年、疫学調査や基礎研究により乳がんに対する食品成分の有用性が示唆されているが、その作用メカニズムに関しては明らかにされておらず、食品成分による乳がんの補完代替療法は実現していない。また、エストロゲン受容体 (ER) 陽性乳がんでは、抗エストロゲン剤タモキシフェン (TAM) による内分泌療法が行われるが、一方でその耐性化が問題となっている。そこで、日常的に摂取可能な食品成分が MCT 阻害作用を介して乳がん細胞の増殖を抑制するのであれば、食品成分を利用した新たな乳がん治療戦略の構築が可能になると考えた。本研究では乳がん細胞における MCTs の機能に着目し、これらの膜タンパク質の活性に対する食品成分の阻害作用とがん細胞の生存・増殖との関連性を明らかにすることにより、乳がん補完代替療法としての食品成分の有用性を検証した。

### 3. 研究の方法

ER 陽性乳がん細胞株として、MCF7 および T47D を用いた。検討に先立ち、これらの細胞株における MCT1、MCT4 および ER の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにより確認した。また、ER 陽性乳がん細胞株における MCT の機能評価は<sup>14</sup>C-L-乳酸を基質として用い、各条件下における乳酸輸送を評価することにより行った。続いて、siRNA および阻害剤を用いて MCTs の阻害が各細胞株の生存率に与える影響を MTT assay にて評価した。同様に、15 種の食品成分を用いて、各成分が各細胞株の生存率に与える影響を評価した。また、TAM による ER 陽性乳がん細胞株の増殖抑制効果の評価には、TAM の活性代謝物である 4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT) を用いた。その他、各種遺伝子発現およびタンパク質発現はリアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロットにより定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) MCT の阻害が ER 陽性乳がん細胞株の細胞生存率に及ぼす影響

ER 陽性乳がん細胞株における MCT の発現を確認したところ、いずれの細胞株においても MCT1 および MCT4 の発現が認められた。また、MCT 阻害剤を用いて各細胞株における乳酸輸送を評価したところ、高濃度 (mM オーダー) の  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamate (CHC) および MCT4 選択的阻害剤である Bindarit により顕著に阻害された。一方で MCT1 選択的である 5-Oxoproline は、MCF7 および T47D 細胞における乳酸輸送に対して阻害効果をほとんど示さなかったことから、これらの細胞株における乳酸輸送には MCT4 の寄与が大きいことが示唆された。また、各細胞株の生存率は、MCT4 のノックダウンにより低下した。さらに、Bindarit あるいは CHC 併用により濃度依存的な細胞生存率の低下が認められた。MCF7 および T47D 細胞における乳酸輸送には MCT4 の寄与が大きく、その機能を阻害することにより各細胞株の生存率が低下することが示された。

#### (2) 食品成分が ER 陽性乳がん細胞株の細胞生存率および乳酸輸送に及ぼす影響

15 種類の食品成分を用いて、MCF7 細胞の細胞生存率および乳酸輸送に及ぼす影響を評価した。フロレチンやミリセチン、モリンをはじめとした一部のポリフェノール類は、MCF7 細胞における乳酸輸送を顕著に阻害した。また、これらのポリフェノール類は MCF7 細胞の細胞生存率も同様に低下させることが示されたが、現実的な摂取量や体内動態(吸収性、安定性等)を考慮すると、その IC<sub>50</sub> から日常的に摂取可能な範囲内で生体内における有効性は期待できない

と考えられた。

### (3) 4-OHT 感受性に及ぼす MCT 阻害剤および食品成分の影響

TAM は ER 陽性乳がんに対する標準治療である。前述の結果を受け、ER 陽性乳がん細胞株において乳酸輸送を阻害したポリフェノール類と 4-OHT の併用による相乗的な抗腫瘍効果について検討を進めた。なお、ポリフェノール類の濃度は ER 陽性乳がん細胞株に対する IC<sub>50</sub> を考慮し、単独で毒性が認められない濃度に設定した。4-OHT 単独での ER 陽性乳がん細胞株に対する IC<sub>50</sub> 値は 12-18 μM であったが、各ポリフェノール類を併用することにより、IC<sub>50</sub> は 2 倍程度増加する傾向が認められた。また、MCT 阻害剤を用いて同様の検討を進めたところ、CHC および Bindarit の併用でも同様に各細胞株に対する 4-OHT の IC<sub>50</sub> が明らかに増加することが示された。予想に反して、検討に用いたポリフェノール類および MCT4 阻害剤の併用により、各細胞株に対する 4-OHT の増殖抑制効果は増強されず、むしろ 4-OHT 感受性は低下することが明らかとなった。

### (4) MCT 阻害による 4-OHT の感受性低下メカニズムに関する検討

MCT 阻害による 4-OHT 感受性低下のメカニズムの一端を明らかにするべく、オートファジー関連遺伝子を含む種々の遺伝子発現およびタンパク質発現変動について解析を進めたところ、MCF7 細胞において MCT 阻害条件下で低酸素誘導因子 (HIF-1α) のタンパク質発現量が顕著に減少し、一方で ER の発現が増大する傾向が認められた。これらの発現変化と 4-OHT の感受性低下との関連性については推測の域を出るものではないが、ER 陽性乳がん細胞において TAM 感受性と MCT の機能は密接に関連しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondo Ayuko, Narumi Katsuya, Okuhara Keisuke, Takahashi Yuka, Furugen Ayako, Kobayashi Masaki, Iseki Ken	4. 巻 40
2. 論文標題 Black tea extract and theaflavin derivatives affect the pharmacokinetics of rosuvastatin by modulating organic anion transporting polypeptide (OATP) 2B1 activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biopharmaceutics & Drug Disposition	6. 最初と最後の頁 302 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1002/bdd.2202">https://doi.org/10.1002/bdd.2202</a>	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 Narumi Katsuya, Ohata Tsukika, Horiuchi Yuichi, Satoh Hiroshi, Furugen Ayako, Kobayashi Masaki, Iseki Ken	4. 巻 14
2. 論文標題 Mutual role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 and concentrative nucleoside transporter 3 in the intestinal uptake of dAMP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223892">https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223892</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大畑 月香、鳴海 克哉、佐藤 浩志、古堅 彩子、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 dAMPの腸管吸収過程におけるCNT3およびCD73の協働的役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 優花、鳴海 克哉、古堅 彩子、小林 正紀、井関 健
2. 発表標題 リンゴポリフェノールによるOATP2B1を介した薬物相互作用の解析
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第147回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥原圭祐、鳴海克哉、近藤安佑子、古堅彩子、小林正紀、井関健
2. 発表標題 紅茶成分によるBCRP介在性薬物相互作用の解析
3. 学会等名 第32回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大畑月香、鳴海克哉、佐藤浩志、古堅彩子、小林正紀、井関健
2. 発表標題 サケ白子に含まれるデオキシリボヌクレオチド類の消化吸収機構
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146回例会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----