

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19693

研究課題名（和文）アスピリンの副作用軽減を目指した新規大腸がん化学予防法

研究課題名（英文）A new colorectal cancer chemoprevention method to reduce side effects of aspirin

研究代表者

酒井 敏行（Sakai, Toshiyuki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・特任教授

研究者番号：20186993

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）： 現在、アスピリンは最も有効な大腸がん予防薬であるが、長期服用した場合の副作用が懸念されている。アスピリンの効果を併用薬によって増強できれば、アスピリン服用量低減が可能になると考え、本研究では、潰瘍性大腸炎治療薬であるメサラジンとの併用療法の可能性について基礎的検討を行った。アスピリン代謝体であるサリチル酸の単剤投与と比較し、メサラジンとの併用はヒト大腸がん細胞に対して有意な生長阻害効果の増強を認め、さらにcyclin D1の発現減少とG1期での細胞周期停止も認めた。また、APC遺伝子ノックアウトマウスの腸ポリープ部由来細胞に対しても、有意な生長阻害効果の増強が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、大腸がん予防効果が期待されているアスピリンを軸にした、新たな大腸がん予防法に繋がる成果が得られた。潰瘍性大腸炎治療薬として長年使用されているメサラジンが、アスピリンの併用薬の候補として有用である可能性を示している。本研究課題では、ヒト大腸がん細胞やマウス腸ポリープ細胞に対する効果の検証のみではあるが、さらにモデル動物への長期投与試験による、二剤併用の有効性・安全性の評価が必要と考えられている。本研究成果は、今後の大腸がん化学予防研究の発展に向けて、有用な知見の一つとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）： Currently, aspirin is the most effective preventive agent for colorectal cancer, but there are concerns about the side effects of long-term use of aspirin. We hypothesized that if the effect of aspirin can be enhanced by a concomitant drug, it will be possible to reduce the aspirin dose. In this study, we examined the possibility of combination therapy with mesalazine, a drug for ulcerative colitis.

Compared with single administration of salicylic acid, an aspirin metabolite, the combination with mesalazine significantly enhanced the growth inhibitory effect on human colon cancer cells, and further decreased the expression of cyclin D1 and induced the cell cycle arrest at G1 phase. In addition, the combination induced significantly the growth inhibitory effect in mouse intestinal polyp cells. In this study, we showed for the first time that the combined treatment with aspirin and mesalazine may be a useful prevention strategy for colorectal cancer and precancerous lesion.

研究分野：がん予防

キーワード：がん予防 大腸がん アスピリン 併用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、「がん予防法の開発」は、国際的に喫緊の課題となっている。特に、我が国において大腸がんは部位別罹患数で一位に位置しており(図1)、有効な予防法の確立が求められている。その中で、大腸がん化学予防薬として、国際的に最も注目され、最も研究データが蓄積されている候補薬剤が「アスピリン」である。アスピリンは、抗炎症鎮痛薬および抗血小板薬として広く使われており、かつ非常に安価であるという利点を有する一方で、NSAIDs 過敏症や消化性潰瘍をはじめとした深刻な副作用が問題視されている。現状では、アスピリンをがんの予防薬として服用できない方もいるため、アスピリンの副作用軽減と、がん予防効果の増強という、理想的ながん化学予防法の確立が、強く望まれている(図2)。

がん罹患数順位 (男女計)	部位
1位	大腸
2位	胃
3位	肺

図1: 部位別がん罹患数順位予測(2017年)
全国がん罹患モニタリング集計の年齢階級別がん罹患数(1975~2013年全国推計値)および人口動態統計がん死亡数(1975~2015年実測値)を用いて予測された結果 <国立がん研究センター報告より>

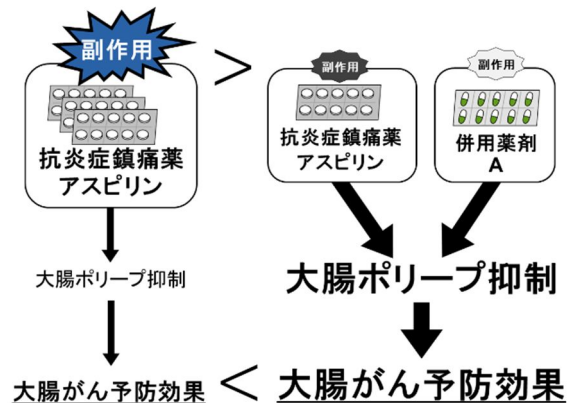


図2: 本研究課題のコンセプト

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでに『がんの分子標的併用予防』の概念を提唱し、その実現を目指した数々の予防研究を遂行してきた。その実績から、本研究課題では「アスピリンのがん予防効果を増強しうる新規併用予防法の提案」という探索的性質の強い研究を目指す(図2)。

本研究では、アスピリン併用薬の候補として潰瘍性大腸炎の治療薬であるメサラジンに着目した。メサラジンは、観察的疫学研究において潰瘍性大腸炎に合併する大腸がんを予防する可能性が報告されており、また、化学発がんモデル動物においても大腸がん予防効果が報告されている。本研究は、基礎研究により、新規大腸がん化学予防法「アスピリンとメサラジンの併用」の有効性の検討、ならびに、その作用機序を明らかにすることで、「大腸がん化学予防」研究の一端を担うことを目的とする。

3. 研究の方法

アスピリン、およびアスピリンの体内代謝体であるサリチル酸について、それぞれ単剤で細胞に及ぼす影響に対し、メサラジンと組み合わせた場合の細胞への影響を評価し、比較検討した。

- (1) アスピリン、もしくはサリチル酸をメサラジンと併用した場合のヒト大腸がん細胞に対する生長阻害効果 (CCK-F assay)
二種類のヒト大腸がん細胞株として、HT-29 と HCT-15 を用い、アスピリン、サリチル酸、およびメサラジンの各単剤による生長阻害効果に対する影響評価を行った。さらに、様々な各薬剤の組み合わせ条件にて、メサラジンがアスピリン、およびサリチル酸の生長阻害効果を増強するか否かの検討を行った。Calcein-AM を用いて、生細胞数を蛍光検出する CCK-F を用いた。
- (2) サリチル酸とメサラジンの併用による、ヒト大腸がん細胞に対する G1 期停止の誘導及び cyclin D1 の発現量の減少効果 (FACS、western blotting)
ヒト大腸がん細胞株の HT-29 と HCT-15 を対象に、二剤併用の作用点を調べるため、フローサイトメーターを用いた細胞周期解析を行った。さらに細胞周期関連分子のタンパク質発現量への二剤併用の影響について検証するため、western blotting を行った。
- (3) サリチル酸、メサラジン併用によるプロテアソーム分解系を介した cyclin D1 の発現量低下 (real time RT-PCR、western blotting)
併用時に認められた分子の発現量の変化について、さらに機序を解析するため、real time RT-PCR を行い、mRNA 発現への二剤併用の影響を調べた。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用い、プロテアソーム分解系の経路を抑制した場合の、二剤併用によるタンパク質の発現への影響を検証した。

- (4) サリチル酸、メサラジン併用によるヒト大腸がん細胞に対するコロニー形成阻害効果 (colony formation assay)
HT-29 と HCT-15 のコロニー形成能に対し、二剤併用が及ぼす影響について検証した。
- (5) サリチル酸とメサラジン併用によるマウス腸ポリープ細胞に対する生長阻害効果とコロニー形成阻害効果 (CCK-F assay、colony formation assay、western blotting)
連携研究者の宮本らが以前に樹立した、家族性大腸腺腫症のモデル動物である APC 遺伝子ノックアウトマウス (Apc^{Min/+}マウス)の腸ポリープ部由来細胞を用い、二剤併用による生長阻害効果の検証を行った。Apc^{Min/+}マウスの大腸ポリープ、小腸ポリープ、および正常腸上皮粘膜由来の三種類の細胞株を試験対象とした。(1) で用いた CCK-F assay および colony formation assay を行った。さらに、増殖関連分子の発現量について比較検証を行った。

4. 研究成果

- (1) アスピリン、もしくはサリチル酸をメサラジンと併用した場合のヒト大腸がん細胞に対する生長阻害効果 (CCK-F assay)
二種類のヒト大腸がん細胞株の HT-29 と HCT-15 を用い、アスピリン、およびサリチル酸の生長阻害効果に対し、メサラジンの増強作用の有無について検討した。その結果、いずれの細胞に対しても、メサラジンはアスピリン、およびサリチル酸の生長阻害効果を有意に増強した。
- (2) サリチル酸とメサラジンの併用による、ヒト大腸がん細胞に対する G1 期停止の誘導及び cyclin D1 の発現量の減少効果 (FACS、western blotting)
ヒト大腸がん細胞株の HT-29 と HCT-15 を対象に、二剤併用の作用点を調べるため、細胞周期解析を行った。その結果、併用時に有意な G1 期停止細胞の蓄積が認められた。さらに細胞周期関連分子の発現量の変化を検証した結果、いずれの細胞においても、cyclin D1 の発現減少がタンパク質レベルで認められた。
- (3) サリチル酸、メサラジン併用によるプロテアソーム分解系を介した cyclin D1 の発現量低下 (western blotting、real time RT-PCR)
併用時に認められた cyclin D1 の発現量の減少の機序を解析するため、mRNA レベルでの影響についても検証を行った。その結果、HT-29 においては cyclin D1 mRNA 量への二剤併用による発現抑制効果が認められたものの、HCT-15 においては、再現性をもって cyclin D1 mRNA 発現量の変化は認められなかった。細胞株によって、薬剤に対する分子機序が異なる可能性が考えられる。
さらに、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用い、プロテアソーム分解系の経路を抑制した場合の、二剤併用による影響を検証した。その結果、いずれの細胞に対しても、MG132 による cyclin D1 タンパク質発現量の減少効果が減弱した。二剤併用による cyclin D1 のタンパク質発現低下が、プロテアソーム分解系に依存していると考えられた。この結果は、二種類のヒト大腸がん細胞で同様の結果であり、共通の機序であることを示唆している。
- (4) サリチル酸、メサラジン併用によるヒト大腸がん細胞に対するコロニー形成阻害効果 (colony formation assay)
ヒト大腸がん細胞 HT-29 と HCT-15 のコロニー形成能に対する、二剤併用効果について検証した結果、いずれの細胞に対しても、有意な併用効果が認められた。
- (5) サリチル酸とメサラジン併用によるマウス腸ポリープ細胞に対する生長阻害効果とコロニー形成阻害効果 (CCK-F assay、colony formation assay、western blotting)
二種類のマウス腸ポリープ由来細胞株とマウス腸上皮粘膜由来の細胞株のコロニー形成能に対する、二剤併用効果について検証した。その結果、マウス腸ポリープ由来細胞株は、マウス腸上皮粘膜由来の細胞株と比較し、二剤併用に対する感受性が有意に高いことが明らかとなった。定常状態における cyclin D1 の発現量も、ポリープ由来細胞の方が高かったということから、この感受性の要因の一つであると考えられる。正常細胞とがん細胞およびポリープ細胞に対し、この二剤併用による細胞の生長阻害効果には、細胞特異性が存在する可能性が示唆された。

以上の成果に加え、現在、追加検討データをまとめ、論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Boku S, Watanabe M, Sukeno M, Yaoi T, Hirota K, Iizuka-Ohashi M, Itoh K, Sakai T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Deactivation of glutaminolysis sensitizes PIK3CA-mutated colorectal cancer cells to aspirin-induced growth inhibition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 E1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12051097.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高倉英樹, 堀中真野, 今井綾香, 武藤倫弘, 酒井敏行
2. 発表標題 アスピリン、メサラジン併用による大腸がん予防効果の検討
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	友杉 真野 (堀中真野) (Tomosugi-Horinaka Mano) (80512037)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究協力者	高倉 英樹 (Takakura Hideki)		
連携研究者	石川 秀樹 (Ishikawa Hideki) (30351795)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	宮本 真吾 (Miyamoto Shingo) (50752705)	公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員 (72609)	