

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04034

研究課題名（和文）がん分子標的薬治療が抱える臨床的問題の食品成分による克服

研究課題名（英文）Overcoming of multiple resistance to the molecular-targeted anti-cancer drugs by flavonoids

研究代表者

近藤 茂忠（KONDO, SHIGETADA）

大阪公立大学・大学院生活科学研究科 ・教授

研究者番号：40304513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん分子標的薬（特定の分子を標的とした最新の抗がん剤）に対して種々の抵抗性を獲得した悪性化大腸がん細胞モデルを用いて、薬剤に対するマルチ耐性化のメカニズム（バイパス経路分子群および下流経路分子群）を明らかにした。この耐性化メカニズムに基づいて、食品機能成分（エピガロカテキンガラート及びアピゲニン）が分子標的薬マルチ耐性化を解除できることおよびその分子機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、分子標的薬に対する耐性化メカニズムを明らかにするとともに、耐性化を克服するために種々の分子標的薬を併用するとさらなる耐性化の連鎖が惹起されることを明らかにした点である。さらに、食品機能成分であるエピガロカテキンガラートとアピゲニンが、耐性化の連鎖を分子標的薬併用よりも長期間抑制できることを明らかにし、薬剤ではなく食品機能成分によって、分子標的薬治療が抱えるマルチ耐性化の課題を解決できる可能性を示した点である。

研究成果の概要（英文）：We elucidated the molecular mechanism of the multiple resistance to the molecular-targeted anti-cancer drugs, including the bypath pathways and alternative intracellular signaling molecules. We revealed that (-)-Epigallocatechin-3-gallate and apigenin chronically suppressed the multiple receptors and signaling molecules that are responsible for the multi-resistant mechanisms.

研究分野：栄養学

キーワード：大腸がん がん分子標的薬 耐性化 バイパス経路 耐性化の連鎖 食品機能成分

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

最新のがん統計では、毎年 100 万人以上が新たにがんを発症し、37 万人以上が死亡している。死亡原因となる進行がんでは手術切除ができないため、分子標的薬を用いた化学療法が中心的な治療法となっている。分子標的薬は、従来の細胞傷害性抗がん剤とは異なり、がん細胞だけを狙い撃ちできる、新世代の制がん剤として注目されている。しかしながら、分子標的薬治療はほとんどの場合、治療開始後数ヶ月以内に抵抗性が出現してしまうことが、臨床的に大きな問題となっている。この問題を解決するために世界中で活発に行われている治療法は、薬剤抵抗性に関与する分子を阻害できる新たな分子標的薬を併用する方法である。しかし、新たな分子標的薬を併用しても、新たな薬剤耐性が次々と出現すること(がん細胞と分子標的薬のイタチゴッコ)が解ってきており、進行がんを根治できない要因となっている。

### 2. 研究の目的

分子標的薬マルチ耐性化に関わる分子メカニズムを解明し、それらを阻害できる食品由来機能成分を明らかにする。さらに、食品機能成分による阻害の分子機序と持続的な阻害について明らかにする。これによりがん細胞と分子標的薬のイタチゴッコ問題を解決できる新たな学術的基盤を確立する。

### 3. 研究の方法

#### 研究の方法

(1) 分子標的薬耐性化細胞は、各分子標的薬を臨床的有效濃度で長期間(6 カ月以上)単剤または併用処理して樹立した。樹立した耐性化細胞に対する新たな分子標的薬の併用は最大 6 カ月間行った。各分子標的薬耐性化細胞に対する食品機能成分の長期的効果を検討するために、エピガロカテキンガラートおよびアピゲニンは血中到達濃度として報告されている  $1 \mu\text{M}$  の生理的濃度で、各分子標的薬存在下で最大 6 カ月間の連続投与を行った。4 つの主要緑茶カテキン類(エピガロカテキンガラート、エピガロカテキン、エピカテキンおよびエピカテキンガラート)の処理は各々  $1 \mu\text{M}$  の生理的濃度で、各分子標的薬存在下で最大 10 カ月間の連続投与を行った。

(2) 分子標的薬耐性化細胞において活性化しているバイパス経路分子群および下流分子群は、各分子のリン酸化を指標にしてイムノプロット法により解析した。さらに、49 種類のリン酸化チロシンキナーゼ受容体を搭載した抗体アレイ解析を行い網羅的に同定した。

(3) 分子標的薬耐性化細胞においてバイパス経路として働くがん関連増殖因子受容体群のヘテロ複合体形成は、ケミカルクロスリンカーを用いて固定後、各増殖因子受容体に特異的なモノクローナル抗体を用いた免疫沈降法とイムノプロット法により解析した。

(4) 各フラボノイド類(エピガロカテキンガラート、アピゲニン、エピガロカテキン、エピカテキンおよびエピカテキンガラート、ケンフェロール、ケルセチン)を共有結合固定したナノ磁性ビーズ(FG-beads)を作製し、これらフラボノイドが特異的に結合する分子群を精製し、イムノプロット解析および抗体アレイ解析を用いて結合蛋白質を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) HGF-R 分子標的阻害薬に対する耐性化機構の解明

現在薬剤耐性の出現が臨床的問題となっている HGF-R 分子標的阻害薬に対して抵抗性を獲得した大腸がん細胞モデルを樹立し、耐性化のメカニズムを解析した。HGF-R 阻害薬耐性化細胞では、バイパス経路として EGF-R の代償的活性化が起こり、その結果 EGF-R 依存的な HGF-R の再活性化が誘導されていることが解った。また、下流経路として p130Cas の活性化が起こっていることを明らかにした。

次に、HGF-R 分子標的薬耐性化細胞に対して EGF-R 分子標的阻害薬を長期間併用したときの抑制効果と抑制の持続期間を検討した。その結果、2 剤併用により HGF-R と EGF-R の活性化は 3 週間程度抑制されたが、その後再活性化が起こった。リン酸化チロシンキナーゼ受容体を搭載した抗体アレイを用いて再活性化のメカニズムを検討した結果、新たなバイパス経路として IGF1-R

の強い活性化が起こっていた。さらに免疫沈降解析を行った結果、IGF1-R が HGF-R および EGF-R とヘテロ複合体を形成することで HGF-R と EGF-R の再活性化を誘導し、HGF-R/EGF-R 分子標的阻害薬に対して抵抗性を獲得することが解った。

次に、HGF-R/EGF-R 分子標的薬耐性化細胞に対して IGF1-R 分子標的阻害薬を併用したときの抑制効果と抑制の持続期間を検討した。その結果、3 剤併用により HGF-R、EGF-R および IGF1-R の活性化は 2 週間程度抑制されたが、その後徐々に再活性化が起こった。

#### ( 2 ) HGF-R 分子標的薬耐性化細胞に対するエピガロカテキンガラートとアピゲニンの効果

HGF-R 阻害薬耐性化細胞に対するエピガロカテキンガラートとアピゲニンの長期的な抑制効果を検討した。エピガロカテキンガラートは、バイパス経路である EGF-R に結合しその活性化を長期間持続的に抑制することで、HGF-R 阻害薬耐性化を抑制した。アピゲニンは HGF-R に結合し、HGF-R と下流分子の p130Cas 活性化を持続的に抑制することで、HGF-R 阻害薬耐性化を抑制した。

さらに、HGF-R/EGF-R 阻害薬耐性化細胞に対するエピガロカテキンガラートとアピゲニンの長期的な効果を検討した。エピガロカテキンガラートは、バイパス経路である EGF-R および IGF1-R に結合しそれらの活性化を 2 か月以上持続的に抑制した。また、アピゲニンは EGF-R、HGF-R と下流分子 FAK に結合して、これらの活性化を 2 か月以上持続的に抑制することが解った。その結果、エピガロカテキンガラートとアピゲニンを併用することで HGF-R/EGF-R 阻害薬耐性を長期的に解除することができた。また、リン酸化チロシンキナーゼ受容体抗体アレイを用いた解析でも、新たなバイパス経路分子の活性化は見られなかった。このように、エピガロカテキンガラートとアピゲニンによる抑制効果は長期間持続し、分子標的薬併用よりも優れていることが分かった。

#### ( 3 ) EGF-R 分子標的阻害薬に対する耐性化機構の解明

耐性化の出現が臨床の問題となっている EGF-R 分子標的阻害薬を用いて、EGF-R 阻害薬耐性化大腸がん細胞モデルを樹立し、耐性化のメカニズムを解析した。EGF-R 阻害薬耐性化細胞では、バイパス経路として HGF-R と IGF-1R が代償的に活性化しており、これら受容体が EGF-R とヘテロ複合体を形成することで EGF-R の再活性化を引き起こすことを明らかにした。また、下流経路として Raf1、MEK、ERK の活性化が起こっていることを明らかにした。

さらに、EGF-R 阻害薬耐性化細胞に対して HGF-R と IGF-1R に対する分子標的薬を長期間併用したときの抑制効果と抑制の持続期間を検討した。その結果、3 剤併用により EGF-R、HGF-R と HGF-R の活性化は 2 週間抑制されたが、その後 EGF-R と HGF-R 再活性化が起こり、マルチ耐性化が惹起された。リン酸化チロシンキナーゼ受容体抗体アレイを用いて再活性化のメカニズムを検討した結果、新たなバイパス経路として HER2 の強い活性化が起こっていた。さらに免疫沈降解析を行った結果、HER2 が EGF-R とヘテロ複合体を形成することで EGF-R および HGF-R の再活性化を誘導した。

#### ( 4 ) EGF-R 分子標的薬耐性化細胞に対するエピガロカテキンガラートとアピゲニンの効果

アピゲニンとエピガロカテキンガラートによる EGF-R 阻害薬耐性化の抑制とそのメカニズムを検討した。アピゲニンは EGF-R、HGF-R、および Raf1 に結合し、これらの活性化を抑制することを見いだした。エピガロカテキンガラートはバイパス経路として重要な EGF-R、HER2、HGF-R、IGF-1R に結合し、それらの活性化を抑制することを見いだした。さらに、エピガロカテキンガラートは MEK と ERK にも結合し抑制できることが分かった。これらの抑制効果は 2 か月以上持続した。しかしながら、アピゲニンとエピガロカテキンガラートによる抑制効果は 2 か月以上経過すると徐々に減弱し、3 か月経過すると消失してしまうことも解った。

#### ( 5 ) フラボノイド耐性化の解除方法の探索

エピガロカテキンガラート抵抗性を解除できる方法として、エピガロカテキンガラートに加え 3 種類の主要緑茶カテキン類（エピガロカテキン、エピカテキンおよびエピカテキンガラート）を併用し検討した。その結果、併用期間が 6 か月以上経過しても抵抗性は獲得されなかった。その分子機構の一つとして、エピガロカテキンガラート抵抗性を誘導した IGF1-R、B-Raf、Raf1、MEK をエピガロカテキン、エピカテキン、エピカテキンガラートが直接結合して阻害することが解った。また、リン酸化チロシンキナーゼ受容体抗体アレイを用いた解析では新たなバイパス経路受容体の活性化は見られなかった。

今後は、4 種類の主要緑茶カテキン類（エピガロカテキンガラート、エピガロカテキン、エピカテキンおよびエピカテキンガラート）をさらに長期間併用しても、バイパス経路などの代償的な活性化が起こらず、フラボノイド耐性化が誘導されないことを明らかにしていく。さらに、本研究で樹立した各分子標的薬耐性化大腸がん細胞を移植した大腸がんマウスモデルを用いて、生理的濃度での 4 種類の緑茶カテキン類の摂取が分子標的薬併用投与よりも有効であることを検討していく。

アピゲニン抵抗性を解除できる方法として構造類似体であるケルセチンとケンフェロールについて検討したが、アピゲニン抵抗性を解除することはできなかった。今後は、ブテインとデルフィニジンについてさらに検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ohno A, Maita N, Tabata T, Nagano H, Arita K, Ariyoshi M, Uchida T, Nakao R, Ulla A, Sugiura K, Kishimoto K, Teshima-Kondo S, Okumura Y, Nikawa T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Crystal structure of inhibitor-bound human MSPL that can activate high pathogenic avian influenza.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance.	6. 最初と最後の頁 e202000849.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202000849.	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 -
1. 著者名 永野ひかる, 松山知菜未, 間部由佳理, 砂川実乃莉, 檜垣七菜子, 吉田萌恵, 近藤茂忠	4. 巻 18
2. 論文標題 大腸がん細胞における分子標的薬foretinib 抵抗性獲得メカニズムの解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Life Sci Res	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 間部由佳理, 永野ひかる, 吉田萌恵, 檜垣七菜子, 近藤茂忠	4. 巻 18
2. 論文標題 がん分子標的薬耐性化に対するエピガロカテキンガレートの効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Life Sci Res	6. 最初と最後の頁 7-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Nagano H, Tomida C, Yamagishi N and Teshima-Kondo S.	4. 巻 20
2. 論文標題 VEGFR-1 regulates EGF-R to promote proliferation in colon cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 E5608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20225608	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野ひかる, 間部由佳理, 近藤茂忠
2. 発表標題 食品機能性成分エピガロカテキンガレートによるがん分子標的薬抵抗性の克服
3. 学会等名 第76回 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田萌恵, 檜垣七菜子, 近藤茂忠
2. 発表標題 緑茶カテキン類によるがん悪性化関連分子群の阻害効果の検討
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 檜垣七菜子, 吉田萌恵, 近藤茂忠
2. 発表標題 フラボノイド類によるがん悪性化関連分子の阻害効果の検討
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田 知里, 山岸直子, 永野 ひかる, 近藤 茂忠
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanism by which VEGF-R inhibitor enhances migration of colon cancer cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永野 ひかる, 富田 知里, 近藤 茂忠
2. 発表標題 VEGF経路とEGF経路のクロストーク 大腸がん細胞の悪性化進展機構への寄与
3. 学会等名 第79回日本癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukari Manabe, Minori Sunagawa, Nanako Higaki, Moe Yoshida, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Elucidation of the acquired resistance mechanism to Epidermal growth factor receptor (EGF-R) targeted drug in human colon cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minori Sunagawa, Yukari Manabe, Nanako Higaki, Moe Yoshida, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Elucidation of the acquired resistance mechanism to HGF-R targeted drug in human colon cancer cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Moe Yoshida, Nanako Higaki, Yukari Manabe, Minori Sunagawa, Hikaru Nagano, Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Anti-cancer effect of green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanako Higaki、Yukari Manabe、Minoru Sunagawa、Moe Yoshida、Hikaru Nagano、Shigetada T. Kondo
2. 発表標題 Anti-cancer effect of apigenin by targeting cancer-associated kinases
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永野 ひかる、松山 知菜未、砂川 実乃莉、富田 知里、近藤 茂忠
2. 発表標題 VEGF経路とEGF経路のクロストーク 大腸がん細胞の悪性化進展機構への寄与
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山 知菜未、永野 ひかる、富田 知里、砂川 実乃莉、近藤 茂忠
2. 発表標題 フラボノイド類によるがん分子標的薬抵抗性の解除
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野 ひかる、富田知里、山岸直子、近藤茂忠
2. 発表標題 大腸がん細胞の増殖におけるVEGF-R1の役割解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
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
研究 分担者	山岸 直子  (YAMAGISHI NAOKO)  (40646840)	和歌山県立医科大学・医学部・助教    (24701)	

	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 協力者	永野 ひかる  (NAGANO HIKARU)		

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
---------	---------