

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07033

研究課題名(和文)アルドケト還元酵素を標的とするホルモン依存性がんアジュバント療法剤の開発

研究課題名(英文) Development of adjuvant for treatment of hormone-dependent cancers targeted to aldo-keto reductases

研究代表者

松永 俊之 (Matsunaga, Toshiyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80306274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、乳がん等のホルモン依存性がんの薬剤[Tアモキシフェン(TAM)とパクリタキセル(PTX)]耐性獲得によりアルドケト還元酵素(AKR)1C3が高発現することを示した。また、乳がん細胞のTAM耐性化は抗酸化能、PTX耐性化は薬物排出能を高めた。さらに、それら阻害剤とAKR1C3阻害剤の併用はTAMやPTXに対する薬剤耐性を克服したことから、これら阻害剤の併用はホルモン依存性がんの薬剤耐性を抑制するアジュバント療法として有用であると考えられた。また、AKR1C3阻害剤処理によるシスプラチン感受性化は乳がん治療におけるシスプラチンの適応外使用を可能にすると予測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国において罹患者数が年々増加している乳がん等のホルモン依存性がんは、概して薬剤感受性が低い上、連続投与に伴って容易に耐性化するため、薬剤耐性を誘起しない画期的治療法の開発は急務である。本研究を通して、乳がんの薬剤耐性時に高発現するアルドケト還元酵素(AKR)1C3が薬剤耐性を誘発する主因であることを示した。また、本酵素の阻害剤を主軸とした他阻害剤との併用はホルモン依存性がんの薬剤耐性を抑制するアジュバント療法として有効であること、並びに乳がん化学療法への白金製剤の適応外使用を可能にすることを示唆した。本研究の更なる進展はホルモン依存性がんの根本治療法の確立に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I found that expression of aldo-keto reductase (AKR) 1C3 is up-regulated by resistance development to drugs [tamoxifen (TAM) and paclitaxel (PTX)] in hormone-dependent cancers such as breast cancer. In addition, the development of breast cancer cell resistance to TAM and PTX enhanced the capacities underlying antioxidant functions and drug effluxes, respectively. Furthermore, combined treatment of inhibitors (that block the antioxidant and drug-efflux capacities) with AKR1C3 inhibitor overcame the drug resistance, suggesting the availability of combination of the inhibitors in adjuvant therapy for alleviating the drug resistance in hormone-dependent cancers. Additionally, it is surmised that sensitization to cisplatin due to treatment with AKR1C3 inhibitor allows for off-label use of the platinum drug in breast cancer chemotherapy.

研究分野：病態生化学

キーワード：アルドケト還元酵素 薬剤耐性 乳がん 前立腺がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の外科的技術や検査技術の急速な進歩にも拘わらず、我が国における乳がん、子宮がんや前立腺がん等のホルモン依存性がんの罹患者数は年々増加しており、国立がん研究センターの「人口動態統計によるがん死亡データ」によれば、2017年のホルモン依存性がんの罹患者数は女性がん患者の3割にも達する。乳がんをはじめとするホルモン依存性がんの化学療法には、ホルモン療法剤、アントラサイクリン系薬物、タキサン系薬物や代謝拮抗薬等の薬剤が汎用されている。抗エストロゲン薬タモキシフェン (TAM) はエストロゲンの受容体への結合阻害による細胞増殖能の抑制を介して抗がん作用を発揮する。それに対し、ドキシソルピシン等のアントラサイクリン系薬物の抗がん作用はDNA複製やRNA合成の阻害により、パクリタキセル (PTX) などタキサン系薬物は微小管の脱重合阻害により細胞増殖を抑制することが知られている。これら薬剤の抗がん作用は強力であるが、進行したホルモン依存性がんの感受性は低い上、これら薬剤の連続投与は容易に耐性獲得、すなわち「薬剤耐性化」を誘起するため、利用時には注意が必要である。ホルモン依存性がんに対して使用されるこれら薬剤の耐性獲得機序には、ホルモン受容体の発現低下や修飾、Bcl-2ファミリーによって調節される生存、増殖、細胞周期やアポトーシスの阻害など細胞増殖経路等の活性化、スーパーオキシドアニオンディスムターゼなど抗酸化酵素の発現やオートファジー誘導、Nrf2活性化など生体防御能の亢進、薬剤の代謝酵素や排泄に関与するATP-binding cassette (ABC) トランスポーター等の発現誘導等が関わるということが知られるが、それ以外の薬剤耐性関連因子についてはほとんど解明されていない。

アルドケト還元酵素 (AKR) はNAD(P)Hを補酵素としてアルデヒドやケトンなどのカルボニル化合物をアルコールに還元するサイトゾル局在性酵素群である。ヒトで発現している4種のAKR1Cファミリーメンバー (1C1, 1C2, 1C3と1C4、以下AKRアイソフォーム) のうち、肝臓局在性AKR1C4を除く3種のAKRアイソフォームは全身に分布するが、特に乳腺、卵巣や前立腺など性ホルモン感受性組織に高発現する。また、それらアイソフォームはホルモン等のステロイドやプロスタグランジン (PG) を良い基質とすることから、それら組織における性ホルモンの生合成や作用発現に関わる主要酵素とされている。今までに、これら3種のAKRアイソフォームは細胞のがん化時に高発現すること、並びに細胞増殖能の亢進に関与することが報告されており、これら酵素による増殖能の亢進機序へのPG等の還元代謝が推測されている。特に、PGF<sub>2α</sub>合成酵素として見出されたAKR1C3は、前立腺や乳腺など性組織のがん化時に高発現し、テストステロン生合成や15-deoxy-PGJ<sub>2</sub>生成抑制、ファルネサル等のイソプレニルアルデヒドの還元を介して増殖能を高めることや酸化ストレス誘導時に膜脂質の過酸化によって生じる毒性の強いヒドロキシノネナールの解毒作用を介して抗酸化能を高めることが示されている。これらの知見より、AKR1C3をはじめとするAKRアイソフォームはホルモン依存性がんの薬剤耐性化の促進に関わるということが予測されるが、その関与についてはほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規薬剤耐性マーカータンパク質として広く認識されつつあるAKR1C3等のAKRアイソフォームに主眼を置き、1)ホルモン依存性がんの薬剤耐性獲得への関与を明確にするとともに、2)薬剤耐性克服における本酵素の特異的阻害剤の有効性を評価することを目的

とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養、薬剤耐性細胞と酵素過剰発現細胞の樹立

乳がん MCF7 細胞と 3 種の前立腺がん細胞(LNCaP、PC3 と Du145) は 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 日毎に培地を交換して 7 日毎に継代維持した。増殖培地として 10% 熱非働化ウシ胎児血清、100 unit/mL ペニシリン G カリウム及び 100 µg/mL 硫酸ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (pH 7.4) を用いた。

上記 4 種の細胞を薬剤含有増殖培地にて継続的に培養することによってそれぞれの耐性細胞株を樹立した。培地中に添加したホルモン療法剤 (TAM、メドロキシプロゲステロン、フルタミド) 及び抗がん剤 [5-フルオロウラシル、PTX、ドセタキセル、ピノレルピン、シスプラチン (CDDP)] の濃度は段階的に増加させ、増加させるタイミングは 3 継代毎とした。薬剤に対して十分な耐性を獲得した細胞のみを耐性細胞として以下の実験に用いた。AKR1C3 過剰発現細胞はそれら酵素の全配列を挿入した pGW1 ベクターを Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入することによって構築した。なお、空のベクターについても同様に導入し、対照細胞として使用した。また、本酵素の発現抑制細胞の構築には siRNA を使用した。

#### (2) 抗がん剤感受性の測定

細胞を 96 ウェルマルチプレート中に  $2 \times 10^5$  cells/mL ずつ播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で一晚培養した。血清不含培地に交換して 2 時間培養後、培地中に薬剤を添加してさらに 48 時間培養した。細胞生存率 (%) は WST1 を用いたホルマザン色素法で算出した。

#### (3) ウェスタンブロット分析

回収した細胞を 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝化生理食塩水中に懸濁してソニケーションによって細胞を破碎した。細胞破碎液を遠心分離 (12,000 x g、15 分間) し、その上清を採取して細胞抽出液とした。12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により試料を分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。0.1% ウシ血清アルブミンおよび 5% スキムミルクを含む緩衝液中でインキュベートした後、膜を 1 µg/mL の一次抗体および二次抗体と順次反応させた。反応性タンパク質は化学発光法により検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 薬剤耐性細胞の樹立と AKR1C3 の高発現

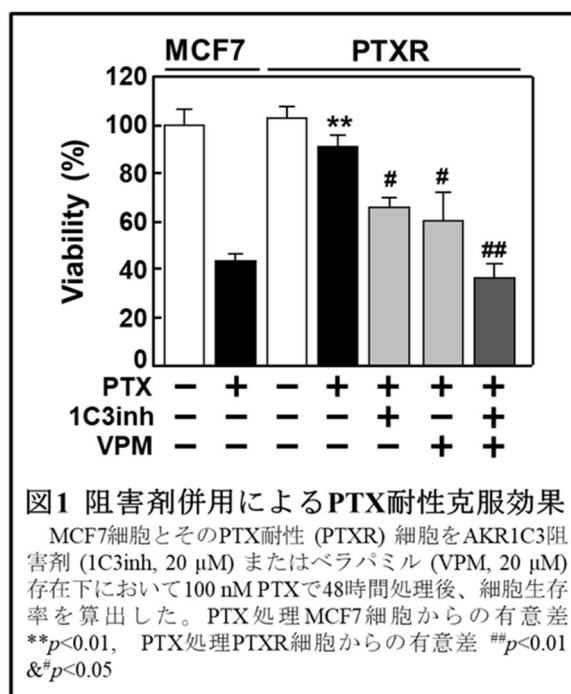
4 種のがん細胞と 7 種の薬剤 (TAM、メドロキシプロゲステロン、フルタミド、5-フルオロウラシル、PTX、ドセタキセル、ピノレルピン) を用いて薬剤耐性細胞の樹立を試みたところ、これら細胞はメドロキシプロゲステロンとピノレルピンに対して耐性を獲得できなかったが、それ以外の 5 種の薬剤に対しては十分な薬剤耐性を獲得したことが確認できた。ここで樹立した耐性細胞のうち、TAM や PTX に耐性獲得した MCF7 細胞 (それぞれ TAMR と PTXR 細胞) の耐性化に伴う 3 種の AKR アイソフォーム (AKR1C1、AKR1C2 と AKR1C3) の発現変動を PCR 法とウェスタンブロット法にて調査した結果、どちらの耐性細胞においても非耐性 MCF7 細胞と比較して AKR1C3 が高発現していた。また、AKR1C3 阻害剤は他アイソフォームの阻害剤よりも著明に薬剤毒性に対する感受性を高め、その薬剤感受性は AKR1C3 過剰発現によって低減し、AKR1C3 のノックダウンによって増大した。さらに、薬剤耐性細胞では転写因子 Nrf2 の恒

常的な核移行が認められたことから、AKR1C3はNrf2の恒常的活性化によって発現上昇し、これら2種の薬剤に対する耐性獲得において主要な役割を果たすことが示唆された。AKR1C3のリコンビナント酵素を調製して上記2種の薬剤の代謝能を調査したが、AKR1C3は両薬剤をほとんど代謝しなかった。また、これら薬剤処理時には脂質過酸化副産物である強毒性アルデヒド体の生成が亢進するが、その生成は耐性細胞では認められなかったことから、AKR1C3による薬剤耐性獲得は、薬剤の代謝ではなく、薬剤処理時に生成する強毒性アルデヒド体の解毒に起因すると考えられた。

## (2) 薬剤耐性化に伴う抗酸化能、タンパク質分解能と薬剤排泄能の亢進

TAM耐性化によって抗酸化能が変動するか否かを調査するために、MCF7細胞とTAMR細胞の抗酸化物質グルタチオン量を比較した結果、TAM耐性化に伴う還元型グルタチオン量の増加が示された。また、総グルタチオン量も耐性化に伴って増加したことから、TAM耐性化によって乳がん細胞のグルタチオンの生合成系や活性酸素代謝系が亢進すると推察された。また、アルデヒド体によって修飾されたタンパク質等の分解にはプロテアソームが関与することが知られているが、TAMR細胞中のキモトリプシン様及びトリプシン様タンパク質分解活性はMCF7細胞よりも有意に高かったことから、TAM耐性化は26Sプロテアソームのタンパク質分解活性を高めることが示唆された。さらに、AKR1C3阻害剤とグルタチオン生合成阻害剤、プロテアソーム阻害剤の併用は乳がん細胞のTAM耐性化を著明に抑制したことから、これら阻害剤の併用は乳がん細胞のTAM耐性化を抑制する有効なアジュバント療法になることが推測された。

PTXR細胞中のATP輸送体タンパク質(ABCB1、ABCC1、ABCC2とABCG2)の発現変動をウェスタンブロット法にて検証したところ、PTX耐性化に伴うABCB1の著増が認められた。また、蛍光色素法によりABCB1による物質輸送能の亢進も確認できた。さらに、ABCB1阻害剤ベラパミルやシクロスポリンAの添加はPTXR細胞のPTX感受性を有意に高め、AKR1C3阻害剤との併用はそのPTX感受性を増大させた(図1)ことから、ABCB1阻害剤とAKR1C3阻害剤の併用は乳がん細胞のPTX耐性克服効果を有する有効なアジュバント療法になりうることを推察された。



## (3) 乳がん化学療法におけるCDDPの適応外使用の可能性検証

CDDPは肺がんや消化器がんの化学療法において汎用される有効な抗がん剤であるが、乳がんの化学療法においては低治療奏効率等の理由により適応外とされている。そこで、低治療奏効率の原因を解明するために、MCF7細胞のCDDP耐性株の樹立を試みたところ、容易に50 μM CDDPに対して耐性を獲得したMCF7細胞(CDDPR細胞)を作製することができた。乳がん患者のがん組織中のエストロゲン濃度は血中濃度と比較して10-100倍以上高く、この高濃度のエストロゲンが乳がん細胞の高増殖能や高浸潤・転移能の主因であることが示唆されているため、17β-エストラジールとCDDP存在下にて生存可能なMCF7細胞株の樹立を行った結果、100

μM CDDP 耐性株 (CDDP<sup>re</sup> 細胞) の調製に成功した。

抗がん剤感受性を比較したところ、CDDP<sup>re</sup> 細胞の感受性は CDDP 細胞に比して有意に低かった。また、AKR1C3 発現量はいずれの耐性細胞 (TAMR、PTXR と CDDP 細胞) よりも高かった。本実験に用いた細胞の抗がん剤感受性と AKR1C3 発現量は逆相関したことから、AKR1C3 の発現上昇が抗がん剤耐性化の主要因子であると推測された。

CDDP<sup>re</sup> 細胞において、細胞増殖に関わる情報伝達分子 MAP キナーゼや生存に関わる Akt の有意な活性化が認められた。また、AKR1C3 阻害剤と MAP キナーゼや Akt の阻害剤の併用は CDDP 耐性化を著明に克服させたことから、これら阻害剤の併用は乳がん細胞の CDDP 耐性化を抑制する有効なアジュバント療法となることが示唆され、本治療法の採用による乳がん化学療法への CDDP の適応外使用の可能性が推察された。

## 引用文献

Rondón-Lagos M, Villegas VE, Rangel N, Sánchez MC, Zaphiropoulos PG. Tamoxifen resistance: Emerging molecular targets. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol.17, No.8, 2016, 1357.

Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*, Vol.9, No.12, 2019, 789.

Penning TM, Asangani IA, Sprenger C, Plymate S. Intracrine androgen biosynthesis and drug resistance. *Cancer Drug Resist.*, Vol. 3, No.4, 2020, 912-929.

Samavat H, Kurzter MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett.*, Vol. 356, No.2 Pt A, 2015, 231-243.

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 Matsunaga T, Horinouchi M, Saito H, Hisamatsu A, Iguchi K, Yoshino Y, Endo S, Ikari A.	4. 巻 173
2. 論文標題 Availability of aldo-keto reductase 1C3 and ATP-binding cassette B1 as therapeutic targets for alleviating paclitaxel resistance in breast cancer MCF7 cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 167-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvac098.	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 Kobayashi M, Yonezawa A, Takasawa H, Nagao Y, Iguchi K, Endo S, Ikari A, Matsunaga T.	4. 巻 171
2. 論文標題 Development of cisplatin resistance in breast cancer MCF7 cells by up-regulating aldo-keto reductase 1C3 expression, glutathione synthesis and proteasomal proteolysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 97-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab117.	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 Matsunaga T, Okumura N, Saito H, Morikawa Y, Suenami K, Hisamatsu A, Endo S, Ikari A.	4. 巻 332
2. 論文標題 Significance of aldo-keto reductase 1C3 and ATP-binding cassette transporter B1 in gain of irinotecan resistance in colon cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem Biol Interact.	6. 最初と最後の頁 109295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbi.2020.109295.	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾ゆきの、酒井優治、森川嘉文、久松亜紀、井口和弘、松永俊之
2. 発表標題 エストロゲン存在下での乳がん細胞のシスプラチン耐性化におけるアルドケト還元酵素1C3、MAPキナーゼとAktの意義
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾ゆきの, 小林美緒, 神保俊輔, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰, 松永俊之
2. 発表標題 17 -エストラジオール存在下における乳がん細胞のシスプラチン耐性獲得機序の解明 - アルドケト還元酵素とMAPキナーゼの意義 -
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾ゆきの, 米澤綾乃, 鷹澤博明, 久松亜紀, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰, 松永俊之
2. 発表標題 乳がん細胞のタモキシフェン耐性獲得におけるアルドケト還元酵素1C3、グルタチオンとプロテアソームの意義
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林美緒, 岩佐華, 長尾ゆきの, 遠藤智史, 五十里彰, 松永俊之
2. 発表標題 酸化ストレスに対する防御機構におけるアルドケト還元酵素1C3の意義 - グルタチオン代謝及びプロテアソーム機能との関連性 -
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永俊之, 小林美緒, 岩佐華, 井口和弘, 遠藤智史, 五十里彰
2. 発表標題 アルドケト還元酵素とプロテアソーム阻害剤の併用による乳がん細胞のシスプラチン耐性克服効果
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 グ生体情報学研究室 ホームページ  
<https://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seitai-joho/>

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

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