

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05927

研究課題名（和文）ニコチン酸のGPER活性化によるイヌ肥満細胞腫抑制効果と腫瘍環境免疫学的解析

研究課題名（英文）Anti-tumor Effect of Nicotinic Acid Activation on Canine Mastocytoma through GPER and Immunological Analysis of Tumor Microenvironment

研究代表者

岡本 まり子 (Okamoto, Mariko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30415111

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：イヌの癌治療特に高齢犬の場合は、外科手術の負担などを考慮すると薬剤投与に頼らなければいけない場合が多く、より耐性や副作用の少ない治療薬が求められる。研究代表者のこれまでの先行研究において、ナイアシンの投与がイヌ肥満細胞腫細胞の細胞死を誘導することが見出された。これまでもナイアシンの抗腫瘍効果は報告されていたが、その作用を媒介する受容体としてはGPR109Aのみが着目されていた。本研究でGPR109AのみだけでなくGPERの関与を検討することでナイアシンの抗腫瘍作用機序の新たな一面を見出すことを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

報告者はこれまでに膜型エストロゲン受容体GPERの選択的アゴニストがマウスやイヌの肥満細胞腫細胞に細胞死を誘導することを見出した。さらにナイアシン（ニコチン酸、ニコチンアミド）がGPERを介して細胞内にシグナルを伝えることが報告されたため、ナイアシンによる抗腫瘍効果について検討したところ、ナイアシンが肥満細胞腫細胞の細胞死を誘導することを見出した。さらにマウス肥満細胞腫モデル系においてナイアシンの投与は腫瘍の増大を抑制しリンパ球の浸潤を促進することが示唆された。GPERの選択的アゴニストに比べナイアシンはコストが低く、さらに詳細な解析・検討を行うことで新たな治療法への提案に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of cancer in dogs, especially in elderly dogs, drug administration is often necessary, considering the burden of surgical procedures. Therefore, there is a demand for therapeutic agents with low drug resistance and fewer side effects. In previous studies conducted by us, it was found that the administration of niacin induced cell death in canine mastocytoma cells. Although the antitumor effects of niacin have been previously reported, only the receptor GP109A has been highlighted as mediating its action. This study aimed to uncover a new aspect of the antitumor mechanism of niacin by investigating the involvement of not only GPR109A but also GPER.

研究分野：獣医学

キーワード：イヌ肥満細胞腫 KIT非依存性 肥満細胞腫マウスモデル ナイアシン ニコチン酸 ニコチンアミド
GPER 抗腫瘍作用

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。

1. 研究開始当初の背景

イヌの悪性腫瘍治療特に高齢犬の場合は、外科手術の負担などを考慮すると薬剤投与に頼らなければいけない場合が多く、より耐性や副作用の少ない治療薬が求められる。イヌの悪性腫瘍のうち肥満細胞腫は発生頻度が高く、肢/肢先に発生した場合は状況によっては断脚を選択せざるを得ず、患畜犬ならびに飼い主に重くつらい精神的負担を負わせることになる。受容体型チロシンキナーゼ **KIT** などを標的とした阻害剤等が治療に使用されているが、効果が継続的ではない、耐性を獲得する、などの問題点がある。よって現在でも副作用・薬剤耐性が少なく治療効果の高い新たな治療剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

報告者のグループは既にマウスおよびイヌ肥満細胞腫細胞を使った研究において、膜型エストロゲン受容体 **GPER** の選択的アゴニスト(**G-1**)が肥満細胞腫細胞の細胞死を誘導することを見出している。またマウス肥満細胞腫モデルにおいても **G-1** が腫瘍の増大を抑制するという予備的結果を得た。しかし高投与量によるコストや **G-1** あるいは溶媒自体の毒性が問題点として浮上した。まず副作用(毒性)が低い **G-1** 投与条件の検討が必要である。次にコスト面については、**GPER** からのシグナルを細胞内に伝える化合物の候補としてナイアシン(ニコチン酸・ニコチンアミド)に着目した。ナイアシンの肥満細胞腫に対する抗腫瘍効果があるかどうか調べることが必要である。さらに抗腫瘍効果が見られた際の腫瘍環境状態についても知る必要がある。本研究では、これらの点について検討し獣医療への情報を提供しえる新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス肥満細胞腫株 **P815** を使用した。ニコチン酸としてナイアシン(**NA**)(**Sigma-Aldrich**)による細胞増殖抑制効果をプレリミナリーに確認できてはいたが、溶解度の問題が明らかとなったため、ニコチンアミド(**NAM**)(**Sigma-Aldrich**)を以降の実験で使用していくことにした。ニコチンアミド投与による細胞増殖への影響については、**Cell Counting Kit-8 (CCK8)**(同仁化学研究所)を用いて調べた。ニコチンアミド投与による死細胞と生細胞数への影響についてはトリパンブルー(ナカライテスク)による染色により調べた。アポトーシス誘導については、**FITC-Annexin V (Tonbo Biosciences)**、**Tonbo Biosciences Propidium Iodide (PI)**(**Sigma-Aldrich**)で細胞を染色後、**BD FACSCelesta**(**BD Biosciences**)を使用してフローサイトメトリー測定を行った。ニコチンアミド投与によるミトコンドリア膜電位差の正常性(恒常性)への影響については、**MitoPT JC-1 Assay Kit**(**ImmunoChemistry Technologies**)を用いて調べた。細胞周期への影響については、**NUCLEAR-ID Red cell cycle kit**(**Enzo Life Sciences**)を用いて調べた。細胞表面抗原の発現への影響については、**APC-ラット抗マウス CD117 抗体 (BD Biosciences)** および **Alexa Fluor 488-マウス抗マウス MHC class I (H-2Kd/H-2Dd)抗体 (BD Biosciences)** を使用して細胞を染色後フローサイトメトリー測定を行った。肥満細胞腫モデルマウスについては、6週齢前後の雄の **DBA/2** マウス(日本エスエルシー)を三種混合麻酔薬を腹腔内投与して麻酔をかけたあと $5 \times 10^6/100 \text{ uL}$ (60 uL 無血清培地 + 40 uL マトリゲル(コーニング))に調製した **P815** を背側部に皮下移植した。およそ3日後に目視で腫瘍の形成が判別できたマウスについて、麻酔後に体重および腫瘍の大きさを測定し群分けを行った。**NAM** 投与群についてはマウス体重 1 g あたり 2 mg 腫瘍内に投与した。対照群は **PBS** を **NAM** と同量腫瘍内に投与した。投与は1日に1回、連続して14日間または7日間行い、投与前に各マウスの体重および腫瘍の大きさを測定した。連続投与後に生存していたマウスについては安楽死後、腫瘍を採取し重量を測定した。腫瘍組織からのリンパ球単離については、まず7日間連続投与後のマウスを安楽死後腫瘍を採取した。採取した腫瘍を解剖用小ハサミで細かく刻んだ後、遠心し、細胞を **Accumax** (ナカライテスク) に懸濁後 37°C で 100 rpm 、30分間振盪させた。遠心後、上清および細胞を 70 um セルストレーナーに通し 50 mL チューブに移した。**RPMI1640 (2% FBS** を含む)を加えて混合した後、遠心を行い上清を除去した。その後細胞を **RPMI1640 (2% FBS** を含む)で2回洗浄した。得られた細胞については、**FITC-ハムスター抗マウス CD3e 抗体**(**BD Biosciences**)、**PerCP-Cy5.5-ラット抗マウス B220 抗体**(**BD Biosciences**)、**APC-ラット抗マウス CD117 抗体**(**BD Biosciences**)、**PE-ラット抗マウス CD4 抗体**(**Biologend**)、**BV510-ラット抗マウス CD8 抗体**(**BD Biosciences**) を使用して細胞を染色した。染色後、フローサイトメトリー用 **Buffer** で細胞を洗浄した。洗浄後の細胞を2% パラホルムアルデヒドを使用して 4°C で一晚細胞固定を行った。その後細胞をフローサイトメトリー用 **Buffer** で洗浄し、フローサイトメトリー測定を行った。フローサイトメトリーにおける細胞集団の割合はフローサイトメトリー解析専用ソフトウェア **FlowJo** 解析用ソフトウェア(**BD Biosciences**)により解析した。得られたデータの統計解析は **GraphPad Prism 9**(**GraphPad Software**)を使用して **Student** の **t** 検定あるいは一元配置分散分析後 **Dunnnett** 法による多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意な差とした。

4. 研究成果

CCK8 アッセイを行ったところ、**NAM** の投与濃度が **10 mM** から生細胞数の有意な減少が見られ、**20 mM** ではさらに生細胞数が減少した。顕微鏡下での細胞形態は **overgrowth** による細胞死の形態とは異なっており、**NAM** 処理により細胞増殖・細胞分裂が停止し細胞死に向かっているものの完全な死細胞までには至っていないようであった。**NAM** の濃度が **40 mM** になると投与後短時間で細胞死が誘導されたが、これはむしろ **NAM** による毒性作用(副作用)によるものと推測された。対照としてマウス線維芽細胞株 **3T3** を使用して同様に **NAM** 処理を行い **CCK8** アッセイにより細胞増殖・細胞生存について調べてところ、**NAM 0~20 mM** では、**P815** で引き起こされたような生細胞数の減少は見られなかった。**NAM 40 mM** では少し生細胞数が減少する傾向が見られた(有意差無し)。また、**NA** についても同様の実験を行ったが、結果は **NAM** のときと同じでマウス肥満細胞腫細胞において優位に細胞増殖・細胞生存の低下が見られた。**NA** については実験回数が少ないため再現性の確認が今後必要である。生細胞数と死細胞数についてトリパンブルー染色により調べたところ、**P815** を **20 mM NAM** で **1** 日間処理すると生細胞数の有意な減少が見られ、**2** 日間処理した場合ではさらに生細胞数が減少した。これらの結果から **NAM** は **P815** 優位に生細胞数の減少を引き起こすことが示唆された。**NAM** によって引き起こされる **P815** の細胞死がアポトーシスであるかどうかについて次に調べた。**P815** を **20 mM NAM** で **2** 日間処理し、**FITC-Annexin V** および **PI** で染色後フローサイトメトリー測定を行った結果、**NAM** 処理を行った **P815** では、**NAM** 未処理の細胞と比較して **FITC-Annexin V** 陽性 **PI** 陰性の細胞の割合が有意に増加していた。これらの結果より、**20 mM NAM** は **P815** のアポトーシスを誘導している可能性がある。**Annexin V** が **NAM** 処理した **P815** の細胞上に結合していることより、アポトーシス過程のうち細胞膜フォスファチジルセリンの細胞外側への露出は起きていることが示唆された。しかし前述のように顕微鏡下での形態から考察するとフォスファチジルセリン露出以降の過程のどこかで停止しているかもしれないという可能性は否定できない。次にミトコンドリア膜電位差の恒常性維持の破綻が起きているかどうかについてミトコンドリア染色色素 **JC-1** を用いて検討した。対照実験として、ミトコンドリア膜電位差を減少させアポトーシスを誘導することが知られている脱共役剤である **CCCP** で **P815** を **1** 時間処理した場合は、**JC-1** の赤色蛍光の蛍光度の低下が認められた。一方、**P815** を **20mM NAM** で **2** 日間処理すると、予想に反し **JC-1** の赤色蛍光の蛍光度の上昇が観察された。**JC-1** の赤色蛍光の平均蛍光強度 (**MFI**) についても未処理の細胞に比べ **NAM** 処理後の細胞では顕著に増加していた。ナイアシンは細胞生存促進作用もあることから、**NAM** による細胞生存経路活性化がアポトーシス誘導と並行に **P815** 内で起こった結果、予想に反した結果が出た可能性がある。この結果の意味することを解明するために現在も研究を続けている。次に **NAM** が **c-KIT** の細胞表面発現を抑制することで細胞の生存や増殖を抑制している可能性について検討した。対照実験として、**P815** を抗がん剤であるノコダゾールで処理し細胞表面上の **c-KIT** の発現の変化について調べたところ **c-KIT** の細胞表面の発現低下が認められた。一方、**20mM NAM** で **P815** を処理した場合は、予想に反して **c-KIT** の細胞表面発現の増加が認められた。また、腫瘍細胞を、細胞死を引き起こす薬剤で処理した時に、細胞死に伴い **MHC class I** 分子の細胞表面発現の増加が起これることが知られているが、これについてはノコダゾール、**NAM** ともに **MHC class I** 分子の細胞表面発現の増加が認められた。これらの結果についても現在さらに解析を進めている。次に **NAM** が細胞増殖を抑制することから細胞周期への影響を調べた。**P815** を無血清処理により細胞周期を同調させた後、**20mM** の **NAM** で **3** 日間処理すると、未処理の細胞に比べ **G2/M** 期の割合の有意な増加が検出された。**NAM** 処理により **S** 期の割合も有意に増加した。一方、**G1** 期の割合については、未処理の細胞に比べ **NAM** 処理した細胞において有意な減少が検出された。これらの結果より、**NAM** が **P815** の増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが明らかになったが前述のようにアポトーシス過程が完全に遂行されているかどうかについては疑問の余地が残り、この点について現在も解析を続けている。**NA** の細胞上受容体としては **GPR109A** が知られている。**NAM** の細胞上受容体は未同定である。しかし最近ナイアシンの受容体として膜型エストロゲン受容体 **GPER** が報告された。そのため、ナイアシンが **GPER** を介して肥満細胞腫細胞に細胞死を誘導することを検討するために **GPER shRNA** を安定的に発現させたマウス肥満細胞腫細胞株の樹立を試みた。**GPER shRNA** 発現ウイルスベクターを **P815** に作用させ、薬剤選択により細胞を選別した。しかし得られた細胞について **qPCR** により **GPER** の発現を調べたが、期待していた発現低下は検出されなかった。そこで次に、ゲノム編集法を利用して **P815** 内の **GPER** 遺伝子の塩基配列の一部を欠失させ機能的な **GPER** タンパク質が産生されない **"GPER 欠失 P815"** を樹立した。野生型 **P815**、ネガティブコントロール **crRNA** を導入した **P815**、**GPER 欠失 P815** 間では通常培養状態下では細胞増殖能に違いは認められなかった。次にこれらの細胞を **NAM** で処理したところ、**GPER 欠失 P815** ではこれまでに観察された **NAM** による細胞増殖抑制が一部阻害されていることが示唆される結果を得たが、まだプレリミナリーな結果のため、現在幾種類かのクローンについてこのことをさらに確かめている。また、**NAM** による肥満細胞腫細胞死誘導がマウスだけではなくイヌ肥満細胞腫細胞でも誘導されることも明らかにしており、これについても現在さらに研究を進めている。マウス肥満細胞腫モデルマウスを使用した実験については、**P815** を移植後マウス皮下に形成された腫瘍に **GPER** アゴニストである **G-1** を投与する際に、溶媒自体の毒性が課題点となってい

た。**G-1** は **PBS** 等には難溶性であるため、通常はエタノールやジメチルスルフォキシドに溶解させる。今回、**PBS** にエタノールおよびジメチルスルフォキシドを含めた溶液中に **G-1** を溶解させ、マウス皮下に形成された腫瘍に投与したところ生存期間の延長が認められた。溶解液としてオイルも検討したが目立つ改善は認められなかった。次に **G-1** 投与による抗腫瘍効果：腫瘍体積増加抑制を起こすかどうかについて調べた。**G-1** を投与した群では腫瘍の大きさの縮小が認められたものの有意差は得られなかった。**NA** の投与については既報における *in vivo* **G-1** 投与実験やこれまで報告者が行ってきた *in vitro* **G-1** 投与実験、ならびに前述の *in vitro* ナイアシン投与実験の結果から腫瘍に投与する **NA** 量を見積もったものの溶解度の限界があったため *in vivo* **NAM** 投与実験はいったん **pending** とした。**NA** の代わりに **NAM** を腫瘍に投与していくことにした。**NAM** 投与条件等については前述した通りである。**PBS** 投与群では腫瘍の体積は経日的に増加した。それに対し、**NAM** 投与群では実験回全てで 個体差はあるものの **PBS** 投与群と比較して腫瘍体積の増加が抑制された。各群の平均腫瘍体積の経日的変化についても **PBS** 投与群で腫瘍体積が経日的に増加し、**NAM** 投与群では **PBS** 投与群と比較して顕著に腫瘍体積の増加が抑制された。特に投与開始後 5~7 日目以降有意な差が見られた。投与開始後 15 日のマウスから腫瘍を採取し重量の測定を行ったところ、**NAM** 投与群の腫瘍重量は **PBS** 投与群と比較して有意に低かった。これらの結果より、**P815** を皮下移植したマウス肥満細胞腫モデルにおいて **NAM** は抗腫瘍効果を示すことが示唆された。しかし、その一方で **NAM** の毒性と思われる症状(体重減少や投与期間内での死亡)も見られたため、現在より安全性が高い投与条件について検討を行っている。**NAM** 投与開始 5 日目以降から **PBS** 投与群との間で腫瘍体積の差が出てくることから、薬剤投与開始後 8 日目のマウスから腫瘍および脾臓を採取し **single cell suspension** を得た。得られた細胞についてリンパ球表面抗原に対する蛍光標識抗体で反応させた後、フローサイトメトリー測定を行った。その結果、**NAM** 投与群では **PBS** 投与群と比較して腫瘍内の **T** 細胞および **B** 細胞の割合が顕著に高かった。また、**CD8** 陽性および **CD4** 陽性 **T** 細胞のそれぞれの割合についても有意に高かった。脾臓由来の **single cell suspension** においても **NAM** 投与群では **PBS** 投与群と比較して **T** 細胞特に **CD8** 陽性 **T** 細胞の割合が有意に高かった。その一方で **B** 細胞の割合は低い傾向にあった。これらの結果より、**P815** を皮下移植したマウス肥満細胞腫モデルにおいて **NAM** の投与は腫瘍内へのリンパ球浸潤を促進している可能性が示唆された。また脾臓内のリンパ球割合に対して、影響を与える可能性があることも示唆された。しかしまだ実験回数が少ないため再現性を確認していく必要がある。また主要組織からの **single cell suspension** 調製の過程でダメージを受ける細胞が多い様子であったため、調製法等についても検討の必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石 万紗人 , 斎藤 琢人 , 坂口 明日香 , 平田 将大 , 杉本 優音 , 佐藤 祐介 , 川本 恵子 , 岡本 まり子
2. 発表標題 マウス肥満細胞腫におけるニコチンアミドの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第166回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯貝亮弥 , 保坂真希 , 佐藤祐介 , 川本恵子 , 岡本まり子
2. 発表標題 マウス肥満細胞腫細胞株へのRNP複合体導入検討ならびに機能遺伝子欠損細胞の作製
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2023年度麻布大学卒業論文優秀ポスター賞受賞：白石万紗人「マウス肥満細胞腫由来細胞におけるニコチンアミドの抗腫瘍効果の検討」

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