

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09459

研究課題名(和文) 生物活性脂質メディエーター レゾルビンE2/E3を介する新規抗腫瘍効果の解明

研究課題名(英文) Exploration of novel anticancer activity via bioactive lipid mediators including resolvins E2/E3

研究代表者

鏑本 浩志 (Tsubamoto, Hiroshi)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：80340975

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)：イトラコナゾールの新規作用機序としてエイコサペンタエン酸由来のレゾルビンE2/E3が産生されることがわかった。これらの代謝系を12/15-LOX阻害剤であるML351で抑制することによりCaSki細胞に対するイトラコナゾールの作用が干渉された。レゾルビンE2/E3を介するTAMとの関連が示唆され、イトラコナゾールによりM2 TAMがM1に変換された。ITZ処理後のM2 TAMの培養上清や共培養ではCaSki細胞の増殖が抑えられた。シングルセル解析及び3色蛍光免疫染色により作用機序はリソソームのコレステロール輸送障害が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イトラコナゾールの作用機序がわかった。現在、ITZのターゲットの同定を試みている。TAM再分極を標的とした薬剤は臨床応用されておらず、同定されれば多癌種のTAMに対する新規治療薬開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A novel mechanism of action of itraconazole is the production of eicosapentaenoic acid-derived resolvins E2/E3. Inhibition of these metabolic pathways with ML351, a 12/15-LOX inhibitor, interfered with the action of itraconazole on CaSki cells. Suggesting an association with resolvin E2/E3-mediated TAM, M2 TAM was converted to M1 by itraconazole, and CaSki cell growth was suppressed in culture supernatants and co-cultures of M2 TAM after ITZ treatment. Single-cell analysis and three-color fluorescent immunostaining suggested that the mechanism of action was impaired lysosomal cholesterol transport.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：腫瘍微小環境 腫瘍関連マクロファージ 再分極

1. 研究開始当初の背景

イトラコナゾールの抗がん治療薬としてのリポジショニングに関して、2008年より多癌腫において検討してきた。また、イトラコナゾールのがん組織における分子生物学的な作用機序を検討し、新規標的分子を探索するトランスレーショナルリサーチを2015年から実施していた(window of opportunity[WOO] 試験, jRCTs051190006)。これまでイトラコナゾールにより早期腫瘍縮小と症状緩和が得られた症例について経時的生検組織の発現変動 mRNA を網羅的に解析し腫瘍関連マクロファージ(TAM)が関わることをわかってきた。また、頸癌細胞株で Akt, Hedgehog, Wnt -catenin の複数のシグナル伝達系の抑制作用もわかってきた(Ueda T, Tsubamoto H, Anticancer Res. 2017 図1; Liang G, Oncotarget. 2017)。イトラコナゾールが異なるがん腫の患者に対して早期抗腫瘍効果を示す一方で、その作用機序の解明にはこれまで実施してきたがん細胞株や臨床検体を用いたゲノム解析やトランスクリプトーム解析では限界があると思われ、新しい解析手法としてマルチオミクス解析をおこなった。イトラコナゾール投与によりアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸由来のいくつかの脂質メディエーターの変動が認められ、イトラコナゾールの抗腫瘍効果は、抗炎症作用を有する脂質メディエーターであるレゾルビン E2/レゾルビン E3 を介するのではないかと考えた。腫瘍への直接作用に加え、TAM などの間質細胞が関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

TAM の脂質メディエーターを介した抗腫瘍効果を明らかにする。

3. 研究の方法

[2021年度]

頸癌 CaSki 細胞を用いた WST assay: 培養液に 18-HEPE、レゾルビン E2、レゾルビン E3 を 0M ~ 500nM の範囲で培養液に添加し、増殖抑制効果が得られた濃度前後でイトラコナゾールを 0M ~ 10⁻⁶M で追加し、レゾルビン E2/E3 単独での増殖抑制効果、イトラコナゾールによる相乗効果を検討する。各種 LOX 阻害剤(5-LOX, Zileuton; 15-LOX, PD146176; 12/15-LOX, ML351; 5/12/15-LOX, TEDC)を用いてレゾルビン E2/E3 の阻害実験を行う。

CaSki 細胞と TAM の間接共培養系の確立: THP-1 単球性白血病細胞を、フォルボージェステルにより付着性の M0 マクロファージに分化させる。M1 への分化は IFN- γ 及び LPS で刺激し、M2 への分化は IL-4 及び IL-13 で刺激する。M2 マクロファージは、形態学的及び CD204 蛍光免疫染色により確認する。M0, M1, M2 マクロファージと Ca Ski Cell とを Transwell で培養する。

[2022年度]

CaSki 細胞と M2 型マクロファージの Transwell を用いた共培養に対して、itraconazole による腫瘍増殖抑制効果を WST assay で検討する。前年度の研究結果で得られた CaSki 細胞単独培養に対する、増殖抑制作用を有する脂質メディエーターや各種 LOX 阻害剤を添加し、M2 マクロファージとの共培養における CaSki 細胞の増殖能の変化を検討する。CaSki 細胞と M2 マクロファージとの共培養において、共培養液から M2 マクロファージが分泌するサイトカインのイトラコナゾール添加による変動を ELISA を用いて検討する。

[2023年度]

CaSki 細胞と M2 マクロファージとの共培養において、脂質メディエーターや各種 LOX 阻害剤を添加して、M2 マクロファージが放出する各種サイトカイン変動を ELISA により検討するとともに、M2 マクロファージの網羅的遺伝子発現解析を行う。

4. 研究成果

頸癌 CaSki 細胞を用いた WST assay: レゾルビン E2/E3 の阻害実験によりイトラコナゾールの作用は阻害された。

M1/M2 TAM を作成し、CaSki 細胞と間接共培養系を確立した。

イトラコナゾールにより M2 TAM が M1 に変換(repolarization)することが、形態的にも、包括的蛋白質質量分析、ELISA、Western blots での細胞膜表面抗原及び分泌蛋白の M1/M2 マーカーの発現変動でも証明した。ITZ 処理後の M2 TAM の培養上清や共培養では CaSki 細胞の増殖が抑えられた。

ここまでの結果を、Takimoto Y, Tsubamoto H, et al. Itraconazole Repolarizes Tumor-associated Macrophages and Suppresses Cervical Cancer Cell Growth. Anticancer Res. 2023 Feb;43(2):569-580. doi:

10.21873/anticanres.16193. で報告した。その後の解析にてイトラコナゾールが M2 TAM を M1 に変換 (repolarization) する機序について、脂質メディエーターよりも TAM のリソソームからコレステロールを輸送する分子に作用することがわかってきた。

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 0件）

1. 著者名 Takimoto Y, Tsubamoto H, Taniguchi R, Sakata K, Takada Y, Adachi J, Tomonaga T, Ueda T, Nakagawa K, Narita S, Wakimoto YU, Shibahara H.	4. 巻 43
2. 論文標題 . Itraconazole Repolarizes Tumor-associated Macrophages and Suppresses Cervical Cancer Cell Growth.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 569-580
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16193.	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 Isono R, Tsubamoto H, Inoue K, Ueda T, Takimoto Y, Sakata K, Shinohara M, Shibahara H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Itraconazole Increases Resolvin E3 Concentration and 12/15-lipoxygenase Inhibitor Attenuates Itraconazole Cytotoxicity in Cervical Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4271-4276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15231.	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0件

〔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	上田 友子 (Ueda Tomoko) (50793585)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	
研究分担者	井上 佳代 (Inoue Kayo) (80594754)	兵庫医科大学・医学部・非常勤講師 (34519)	

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