

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15288

研究課題名（和文）活性型ビタミンKプロドラッグの肝細胞癌送達に寄与するトランスポーターの特定

研究課題名（英文）Uptake mechanism of prodrug of an active form of vitamin K2 in hepatocellular carcinoma cells

研究代表者

瀬戸口 修一（SETOGUCHI, Shuichi）

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：80826032

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々はビタミンK依存性タンパク質合成の活性体である還元型ビタミンK2（MKH）のカチオン性プロドラッグが肝細胞癌（HCC）に対し効率的なMKH送達を示すことを明らかにしているが、取込み機構は明らかにできていない。本課題では当該プロドラッグの細胞取込み挙動の解明を目的とした。MKHプロドラッグの細胞取込みは、冷却処理とNPC1L1トランスポーター阻害剤エゼチミブによって阻害され、能動輸送とNPC1L1の関与が示唆された。一方、HCC細胞のNPC1L1ノックダウン及びHEK293細胞への一過性のNPC1L1強制発現では、MKHプロドラッグの取込みに影響せず、継続的な調査が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌（HCC）は予後が極めて悪いがんの一つであり、分子標的薬が登場した現在でも、より安全で安価な化学療法薬が求められている。ビタミンK2は骨粗鬆症の治療薬としての実績から安全な抗HCC薬候補として今なお期待されている。我々はビタミンK依存性タンパク質合成の活性体である還元型ビタミンK2（MKH）のカチオン性プロドラッグが高い細胞増殖抑制効果と効率的なMKH送達を示すことを明らかにしている。一方、当該プロドラッグの効率的な効果発現はHCC細胞内への効率的な取込みが鍵であり、もしHCC特異的な取込みが観察されればより安全な候補化合物として期待できる。

研究成果の概要（英文）：The dimethyl glycine prodrug of MKH, an active form of vitamin K2, (MKH-DMG) could deliver MKH into hepatocellular carcinoma (HCC) cells via efficient cellular uptake, and exhibited strong antitumor effects. The specific uptake of MKH prodrug is critical for efficient delivery to HCC cells; however, the uptake mechanism remains unclear. To elucidate the underlying mechanism, we determined the kinetic profiles of the intracellular MKH prodrug in HCC cell lines. Cooling temperature and ezetimibe (NPC1L1 transporter inhibitor) could reduce the cellular uptake of MKH-DMG, indicating active transport via NPC1L1. However, the effect of plasmid NPC1L1 on MKH-DMG uptake was not observed. NPC1L1 expression may affect uptake of vitamin K only on intestinal model cells and ezetimibe may inhibit endocytosis of MKH-DMG into HCC cell lines and HEK293.

研究分野：Drug Delivery System

キーワード：prodrug uptake vitamin K hepatocellular carcinoma

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌はきわめて予後が悪いがんの1つであり、肝内転移や多中心性発がんを頻発する。近年では複数の分子標的薬が現れ、画期的な進歩を遂げているが、一方で、強い副作用の発現や、高額な費用が治療の障壁であり、開発途上国をはじめ、安全で安価な化学予防剤が現在もなお強く望まれている。

ビタミン K<sub>2</sub> (VK) は本邦で骨粗鬆症治療薬であり、とりわけ閉経後患者が生涯にわたり安全に使用できる。それゆえ、VK は安全で安価な肝細胞癌の再発予防剤として強く期待されたが、大規模臨床試験において有効性を確立することはできなかった。

申請者は、a) 肝細胞癌組織の VK 濃度が正常組織よりも低い、b) 肝細胞癌細胞への VK 取込み速度が正常肝細胞よりも低い、c) 肝細胞癌マーカーの PIVKA-II が VK 供給で抑制される事実に着目し、VK が持つ抗がん効果は VK 依存性タンパク質合成の活性体である還元型ビタミン K<sub>2</sub> (VKH) の効率的な送達によってもたらされると仮説を立て、肝細胞癌の再発予防薬となりうる VKH プロドラッグ開発を企図した。

本研究では、がん細胞への特異性を判断する上できわめて重要な、VKH プロドラッグの肝細胞癌細胞に対する効率的な取込み機構の解明として、トランスポーターの寄与を明らかにすることに焦点を絞った。もし肝細胞癌細胞に特異的なトランスポーターを介した効率的な送達が表示されれば、正常細胞への影響の少ない理想的な化学予防剤として非常に期待できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、VKH プロドラッグの肝細胞癌細胞への効率的な取込みについて、肝細胞癌細胞に発現するトランスポーターの寄与を明らかにすることで、VKH プロドラッグが肝細胞癌に特異性をもち正常細胞への影響の少ない理想的な肝細胞癌再発予防薬となりえるかの、基盤となる知見を得る。具体的にはトランスポーター阻害剤を用いたトランスポーター基質となるかの確認、及び絞り込んだトランスポーターの発現細胞系を用いての基質となるかの最終確認を行うことを具体的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 3 - 1. 材料及び細胞

VKH 誘導体は合成して用いた。試薬は市販品を用いた。細胞は PLC/PRF/5 細胞 (理研)、SK-Hep-1 細胞 (ECACC)、HEK293 細胞 (理研) を用いた。

#### 3 - 2. VKH 誘導体の細胞取込み量の測定

細胞を 6-well プレートに播種し、接着後に被験薬物を添加し、室内大気下で 30 分インキュベート後に細胞内薬物を有機溶媒抽出し、LC-MS/MS で定量した。インキュベーターはプレート保温器により 37、25 設定、氷冷処理により 1 とみなして維持した。添加薬物用量及び細胞内薬物量によるグラフ化でのカーブフィッティングは GraphPad Prism を用いた。

#### 3 - 3. 阻害剤添加による細胞取込み量の測定

阻害剤はそれぞれ次のトランスポーターの阻害を期待して用いた。グリシルプロリン (対 PEPT1)、キニジン及びジソピラミド (対 OCT1)、シメチジン及びセチリジン (対 OCT2)、BCH (対 LAT1)、エゼチミブ (対 NPC1L1)。阻害剤は VKH 誘導体と同時添加して、上述の方法で定量した。

#### 3 - 4. 細胞内 NPC1L1 タンパク質のノックダウン

SK-Hep-1 細胞に siNPC1L1 を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションを試みた。48 時間後に細胞を回収して、Western Blot 法により目的タンパク質の検出を行った。トランスフェクション処理した細胞に VKH 誘導体を添加後の細胞内取込み量を測定した。

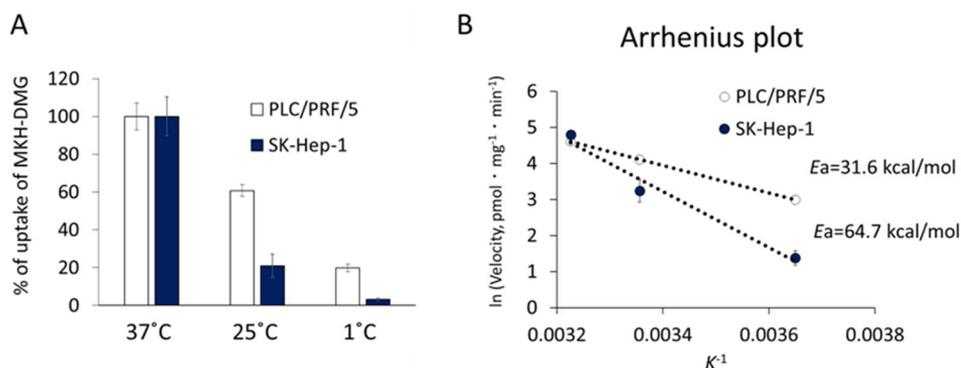
#### 3 - 5. 細胞内 NPC1L1 タンパク質の強制発現

HEK293 細胞に NPC1L1 プラスミドを Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションを試みた。48 時間後に細胞を回収して、Western Blot 法により目的タンパク質の検出を行った。トランスフェクション処理した細胞に VKH 誘導体を添加後の細胞内取込み量を測定した。

#### 4. 研究成果

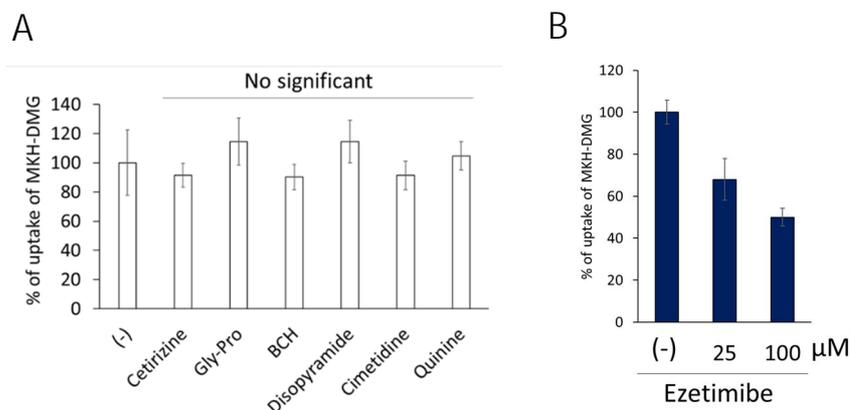
##### 4-1. VKH プロドラッグ細胞取込みの温度依存性

細胞内 MKH 誘導体取込み量は PLC/PRF/5、SK-Hep-1 のいずれでも低温処理依存性の減少がみられた（下図の A）。低温処理により取込み量が減少したことから、能動輸送の介在が示唆された。アレニウスプロットによる活性化エネルギーはそれぞれ 31.6 kcal/mol、64.7 kcal/mol と算出された（下図の B）。既報の前立腺癌細胞を用いた LAT-1 トランスポーターの 4.8 kcal/mol よりもやや高値であったが、実験条件の相違を考慮するとトランスポーター介在を否定できない範囲と考えられた。



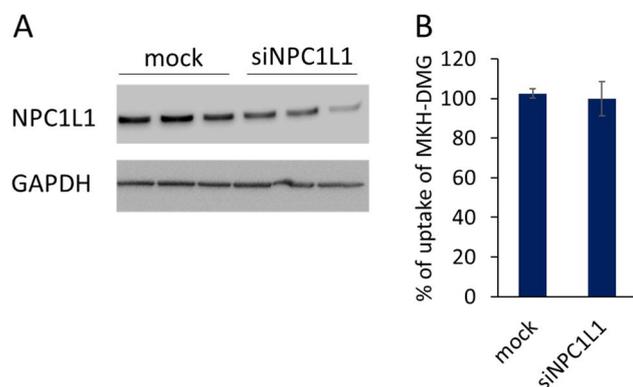
##### 4-2. トランスポーター阻害剤が VKH プロドラッグ細胞取込みに及ぼす影響

PEPT1、OCT1、OCT2、LAT1 を想定して併用したトランスポーター阻害剤では VKH 誘導体の細胞取込みに影響を及ぼさなかったが（下図の A）、エゼチミブでは用量依存的な取込み量の減少が認められた（下図の B）。従って、VKH 誘導体の細胞取込みに NPC1L1 が関与していることが示唆された。



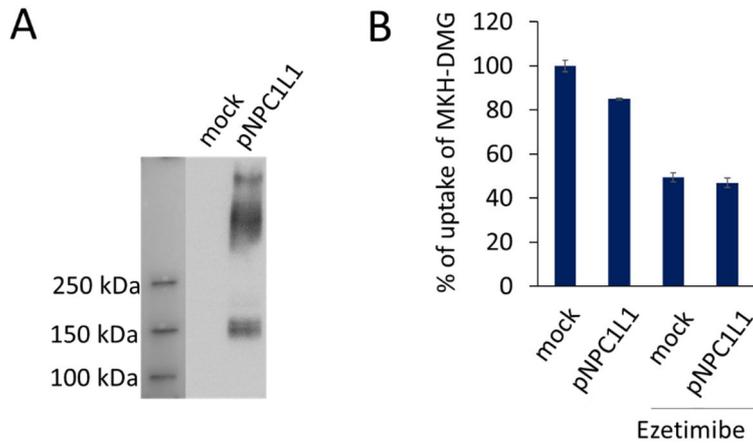
##### 4-3. 細胞内 NPC1L1 のノックダウンが VKH プロドラッグ細胞取込みに及ぼす影響

siNPC1L1 のトランスフェクション処理を行った細胞における NPC1L1 の発現（Santa Cruz 社製抗体）は、目的バンドの位置がやや理論値よりも高かったものの、発現が減少する傾向が認められたが（下図の A）、VKH 誘導体の細胞取込みには影響しなかった（下図の B）。



#### 4 - 4 . 細胞内 NPC1L1 の強制発現が VKH プロドラッグ細胞取込みに及ぼす影響

プラスミド NPC1L1 のトランスフェクション処理を行った細胞における NPC1L1 の発現は、目的バンドの位置が理論値と同じ高さに現れ (Abcam 社製抗体) 強い発現が認められたが (下図の A) VKH 誘導体の細胞取込みを増強せず、エゼチミブはいずれの細胞でも同様に取込みを阻害した (下図の B)。



以上の結果より、NPC1L1 を過剰発現させただけでは HEK293 細胞内への VKH 誘導体の取り込みには影響しないが、エゼチミブは VKH 誘導体の何らかの取り込み機構を阻害していることが明らかである。既報では NPC1L1 を過剰発現させた Caco-2 細胞内への MK-4 の取り込みが増強することが示されているため、小腸上皮様に分化した細胞においては過剰発現させた NPC1L1 が機能できるかもしれない。したがって、NPC1L1 が VKH 誘導体の取り込みに無関係であるとは言えず、Caco-2 細胞等の評価系を用いた評価が必要である。またエゼチミブは NPC1L1 タンパク質と無関係にエンドサイトーシスを阻害する可能性もあると考えられる。VKH 誘導体がエンドサイトーシス等の機構によって細胞内に取り込まれ、エゼチミブがそれら機構を阻害している可能性を考え、今後はエンドサイトーシス等の取り込み機構とエゼチミブの阻害機構との関係の調査を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田燎吾、瀬戸口修一、後藤将太郎、渡瀬大輔、高田二郎、松永和久
2. 発表標題 還元型ビタミンKカチオン性プロドラッグの肝細胞癌取込み挙動の解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuichi Setoguchi, Hirofumi Yamakawa, Daisuke Watase, Yoshiharu Karube, Kazuhisa Matsunaga
2. 発表標題 Specific Uptake Mechanism of Cationic Prodrug of Reduced Vitamin K2 in Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有吉景、瀬戸口修一、前田燎吾、後藤将太郎、山川博文、渡瀬大輔、松永和久
2. 発表標題 還元型ビタミンK2カチオン性プロドラッグの特異的肝細胞癌取込み機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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