

令和 6 年 6 月 2 1 日現在

機関番号：37303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15517

研究課題名（和文）Arctigeninのオートファジー阻害作用による抗がん剤耐性化機構への影響解析

研究課題名（英文）Analysis of anticancer drug resistance attenuation mechanism by autophagy inhibitory effect of arctigenin.

研究代表者

大久保 伸哉（Okubo, Shinya）

長崎国際大学・薬学部・講師

研究者番号：00881872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ごぼうの種に含まれる成分のアルクチゲニンが、抗がん剤が効きにくくなったがん細胞に対して、再び抗がん剤が効くように働きかける効果があるかもしれないことを明らかにした。また、アルクチゲニンが正常な細胞の増殖に影響を及ぼすかどうかを調査した結果、正常な細胞の増殖には大きな影響を与えないことが分かった。アルクチゲニンは、がん薬物療法における薬剤耐性化問題に対して、薬剤耐性克服のための新たな治療戦略になり得る可能性を有している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞のオートファジーを阻害することによって、がん細胞の増殖抑制や抗がん剤耐性化機構の破綻を実現できる可能性が示唆されており、本研究で用いたアルクチゲニンは、がん細胞のオートファジーを阻害することが知られている。本研究では、既存の抗がん剤であるシスプラチンに高度耐性を示すがん細胞に対して、シスプラチンとアルクチゲニンを併用処理することで、シスプラチンの感受性が増加することが明らかになった。本研究は、オートファジーを阻害する化合物の処理によって、がん細胞の抗がん剤耐性化機構に影響を与えることが可能であることを示唆するデータを提供する。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that arctigenin may be effective in making anticancer drugs effective again on cancer cells that have become less susceptible to anticancer drugs. In addition, an investigation into whether arctigenin affects the proliferation of normal cells revealed that it does not have a significant effect on the proliferation of normal cells. Arctigenin has the potential to become a new therapeutic strategy for overcoming the problem of drug resistance in cancer chemotherapy.

研究分野：薬用資源学、細胞死、医療薬学

キーワード：アルクチゲニン オートファジー 抗がん剤耐性化 耐性抗がん剤の感受性増加

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの薬物療法は、がん特異的な分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の登場により大きな変化を遂げてきた。しかしながら、現在のがん薬物療法は非常に高い効果を示す一方で、治療を続けていくうちにがん細胞に薬剤耐性化が生じることが問題となっており、耐性克服のための治療法開発が強く望まれている。

(2) がん細胞の抗がん剤耐性化は、オートファジーによって支持されることが明らかになってきており、がん細胞のオートファジーを阻害することは、治療抵抗性の改善や抗がん剤耐性化機構の破綻を導くことができると期待されている。しかしながら、オートファジーを阻害する化合物の処理による抗がん剤耐性化機構への影響を調査した研究は限られている。

(3) 研究代表者は、漢方薬を構成する生薬を中心とした約 130 種の生薬エキスイブラリーを用いたスクリーニングおよび追跡調査の結果、牛蒡子（ゴボウシ）や連翹（レンギョウ）エキに含まれる arctigenin (ARG) が、ヒト肝がん細胞 HepG2 のオートファジーを阻害することを明らかにしている。また、研究代表者の所属研究室は、ヒト咽頭がん細胞 KB-3-1 から樹立されたシスプラチン（CDDP）耐性細胞株 KCP-4 を保有している。

2. 研究の目的

すでに医薬品として承認されている化合物の中には、承認された効能効果における主薬理作用に加えてオートファジー阻害作用を合わせもつことが知られているものはあるが、化合物のオートファジー阻害作用そのものが医薬品の主薬理作用として承認されているものは皆無である。本研究の目的は、オートファジー阻害作用を主薬理作用とする医薬品の開発を目指した、候補化合物 ARG の抗がん剤耐性細胞株におけるオートファジー阻害活性評価ならびに抗がん剤耐性化機構への影響評価である。

3. 研究の方法

(1) KCP-4 細胞における ARG による CDDP 耐性減弱作用の評価

KCP-4 細胞培養培地中に ARG および CDDP を単独あるいは併用添加し、種々の時間培養後の細胞生存率を MTT assay にて評価する。まずは、ARG および CDDP それぞれの単独処理では細胞生存率に影響を与えない濃度を明らかにする (①)。次に、①で明らかにした濃度の ARG と CDDP を併用処理し、1～3 日、7 日、10 日および 14 日間経過した後の細胞生存率を評価する。

(2) KCP-4 細胞における ARG によるオートファジー阻害活性の評価

(1) で得られた結果を参考に、同様の方法で処理した KCP-4 細胞を回収し、オートファジー関連タンパク質である LC3-I、LC3-II および p62 の発現量の経時的な変化を、ウェスタンブロッティング法にて確認する。得られた結果から、ARG のオートファジー阻害活性ならびに ARG・CDDP 併用処理時のオートファジー活性を評価する。

(3) KCP-4 細胞における ARG による CDDP 耐性減弱作用の機序解明

(4) KCP-4 細胞を移植したモデルマウスにおける ARG による腫瘍形態学的変化および CDDP 耐性減弱作用の評価

4. 研究成果

(1) KCP-4 細胞における ARG による CDDP 耐性減弱作用の評価

ARG 単独 24 時間および 48 時間処理時の MTT assay の結果、24 および 48 時間処理に共通して、2.5 μ M～10 μ M の濃度において細胞生存率低下は 3.85～15.86% であった。一部の濃度において有意な細胞生存率の低下を示したものの、ARG 単独処理濃度間における細胞生存率低下度に整合性や法則性はなかった。先行研究で用いた ARG の濃度が 10 μ M であったことを勘案し、以降の実験で用いる ARG の濃度を 10 μ M 以下とした。同様の方法で調査した結果、CDDP 単独処理時の KCP-4 細胞の細胞生存率に影響しない濃度は 100 μ M 以下であることが明らかになった。なお、実験に用いた最大濃度の 300 μ M CDDP 単独処理においては、有意な細胞生存率の低下は見られるもののその低下率は $16.69 \pm 2.4\%$ 程度であったため、KCP-4 細胞は CDDP に高度耐性を示すことが再確認できた。

KCP-4 細胞培養培地中に 10 μ M ARG および 100 μ M CDDP を単独あるいは併用処理し 48 時間経過後の細胞生存率は、10 μ M ARG 単独で $25.6 \pm 4.0\%$ 、100 μ M CDDP 単独で $10.3 \pm 3.7\%$ 、併用処理で $50.4 \pm 3.9\%$ 低下した。統計解析の結果、各化合物の単独処理群と併用処理群の細胞生存率の低下には、有意な差が見られた (図 1)。しかしながら、50 μ M CDDP と 10 μ M ARG の併用処理においては、低下傾向は示されたものの有意な低下は確認されなかった (図 1)。従って、ARG は KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強する効果があり、その効果は CDDP 濃度に依存することが考えられる。

一方で、併用処理 24 時間経過後においては、いずれの CDDP 濃度においても併用処理による有意な細胞生存率の低下は確認されなかった。これらのことから、ARG は、ARG 曝露時間依存的に KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強することが示唆された。

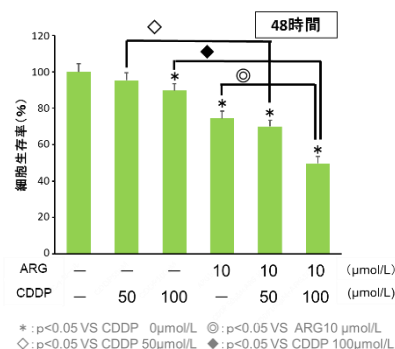


図 1 処理後 48 時間経過時の細胞生存率

ARG 曝露時間依存的に KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強するかどうかを検証するために、ARG 処理時間を最大 14 日間とし、それに伴い ARG および CDDP の濃度をそれぞれ 5 μ M 以下、30 μ M 以下にし、同様の実験を行った。1 μ M または 5 μ M の ARG 単独 14 日間処理した細胞と、同濃度の ARG に 10 μ M および 30 μ M の CDDP をそれぞれ併用 14 日間処理した細胞の生存率を比較した。1 μ M ARG 単独、10 μ M CDDP 併用および 30 μ M CDDP 併用処理時の細胞生存率はそれぞれ 100%、 $87.0 \pm 4.3\%$ および $72.6 \pm 6.1\%$ (ARG 単独処理を 100% とし CDDP 併用群と比較した) であり、併用処理群は ARG 単独処理よりも細胞生存率を有意に低下した (図 2 の #)。また、5 μ M ARG 単独および 10 μ M CDDP 併用処理時の細胞生存率はそれぞれ 100%、 $48.2 \pm 27.9\%$ であった (有意差あり: 図 2 の ◆)。これらのことから、ARG は、CDDP と長時間併用することにより KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強する効果があることが示唆された。また、その効果は ARG 濃度に相関して増強する可能性があり、さらに、併用した日数が長い方 (実験は 3 日、7 日、10 日、14 日で実施している) が細胞生存率の低下度が大きい傾向が認められ、KCP-4 細胞の CDDP 感受性は ARG 併用時間依存的に増強すると考えられた。

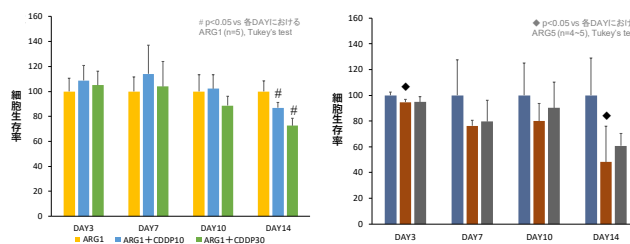


図 2 ARG 長時間処理による CDDP 感受性への影響

(2)、(3)、(4)

(1) で得られた併用条件で細胞を処理後、14 日間経過後の生存細胞を回収し、ウェスタンブロッティング法で各タンパク質の発現量の変動を評価しようと試みたが、回収できた細胞の個数が絶対的に不足していたため、ウェスタンブロッティング法を行うことができなかった。そのため、ARG のオートファジー阻害作用の検証は断念した。

代替案として、オートファジー阻害作用を示すことが知られているクロロキン (CQ) を用いて、上記同様の試験デザインで ARG を CQ に置き換えて、CDDP 感受性に及ぼす CQ 長時間処理の影響を調べた。実験に用いる CQ の濃度は条件検討の結果 20 μ M とし、30 μ M の CDDP と併用処理後 14 日間経過した細胞の個数をセルカウントで測定した。20 μ M の CQ 単独処理 14 日後の細胞個数および 30 μ M CDDP 併用処理 14 日後の細胞個数の割合は、それぞれ 100%、37.0% (CQ 単独処理の個数を 100% とし CDDP 併用群と比較した) であった。CQ は、ARG 同様に KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強すると考えられた。

本研究において、ARG および CQ が KCP-4 細胞の CDDP 感受性を増強したことから、がん細胞にオートファジーを阻害する化合物を処理することは、がん細胞の薬剤耐性化機構の破壊を志向した新たながん治療戦略になり得る可能性がある。

最後に、ARG の安全性を検証した。ARG は様々ながん細胞の増殖を抑制することが知られているが、正常細胞に対する毒性を評価した研究は限られている。そこで、本研究では、正常皮膚細胞 TIG109 の培養培地中に種々濃度の ARG を添加し 12 日間経過後の細胞生存率を MTT 法で評価したところ、ARG 曝露なし群 (コントロール) と比較し有意な細胞生存率の低下が見られたが、用いた最大濃度の 100 μ M においても、コントロールに対し 15% 程度の低下率であった。ARG は、がん細胞の増殖に与える影響と比較すると、正常な細胞の増殖に対しては明らかに弱い影響しか与えないことが示唆された。

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 金城 玲菜、大久保 伸哉、大磯 茂
2．発表標題 牛蒡子の主要成分アルクチゲニン長時間処理によるシスプラチン耐性ヒト咽頭がん細胞KCP-4のシスプラチン感受性増強効果
3．学会等名 日本薬学会第143年会
4．発表年 2023年

1．発表者名 池田佳奈美，延寿千尋，大久保伸哉，大磯茂
2．発表標題 牛蒡子の主要成分アルクチゲニンによるシスプラチン耐性ヒト咽頭がん細胞KCP-4のシスプラチン耐性減弱効果
3．学会等名 日本薬学会第142年会
4．発表年 2022年

1．発表者名 川崎菜央、大久保 伸哉、藤井 俊輔、大磯 茂
2．発表標題 牛蒡子の主要成分アルクチゲニンの短時間処理による特異的がん細胞増殖抑制効果
3．学会等名 日本薬学会第144年会
4．発表年 2024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
---------	---------