

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650470

研究課題名(和文)食品機能成分による新規大腸癌抑制遺伝子の制御

研究課題名(英文)Regulation of new colon tumor suppressor gene by food componets

研究代表者

板垣 史郎 (ITAGAKI, SHIRO)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00360925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品機能成分による新規大腸がん抑制遺伝子の機能制御に関する知見を得ることを目指したが、細胞培養環境の差異からか、既報の化合物を用いてもヒト大腸がん由来培養細胞におけるSLC5A8の発現活性化現象が確認できなかった。研究が当初計画どおりに進まなかったため、サブ試験として、大腸がん患者から得られた腫瘍組織を活用した新規抗がん剤感受性応答因子の探索を行った。現在のところ、評価を実施できた大腸がん抽出組織は3検体であり、全例において大腸がん治療のkey drugである5-FUについて高い陽性率が得られたが、症例数が少ないこともあり、バイオマーカー候補に関する明確な結果は得られていない。

研究成果の概要(英文)：Although we could not found the knowledge about regulation of new colon tumor suppressor gene by food components, there were failed. The action in the event that the research does not progress as originally planned, we tried to discovery of biomarkers for prediction of anticancer drug sensitivity using a incubation medium of the anticancer drug sensitivity test. 5-FU is a key drug for the chemotherapy in colon cancer patients. In the term of this study, we did only 3 cases of histoculture drug response assay (HDRA) for colon cancer patient. All of these cases, colon cancer tissue expresses 5-FU sensitivity. Further study are needed to found plasma biomarkers of 5-FU sensitivity in chemotherapy.

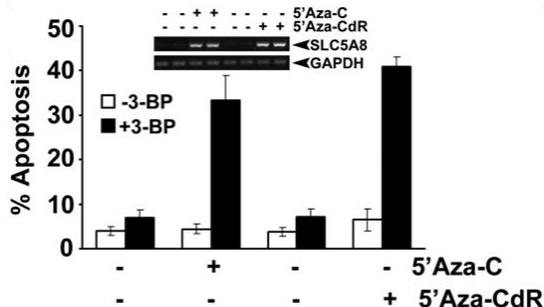
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：大腸がん バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸がんは本邦のがん死亡者数の第3位であり、2015年には患者数がさらに増加すると予測されている临床上、重要な疾患である。そのため、大腸がん予防法の確立に対する医学的・社会的要請は非常に強く、研究の重要性については論を俟たない。研究代表者は、新規大腸がん遺伝子として見出された SLC5A8 について、世界の SLC5A8 研究のトップランナーである Ganapathy 研において、大腸における SLC5A8 を介した短鎖脂肪酸の取り込みが大腸がん抑制において極めて重要であることを実証した (Thangaraju M, Itagaki S, et al., Cancer, 2009)。



また、食品の機能成分を活用した疾病予防戦略の構築は、研究代表者が最も得意とする領域である。これらの背景を基に、研究を立案した。

2. 研究の目的

食品機能成分による SLC5A8 の機能制御が可能であることを実証し、食品機能成分による SLC5A8 制御に基づく大腸がん予防戦略の提唱を図る。

3. 研究の方法

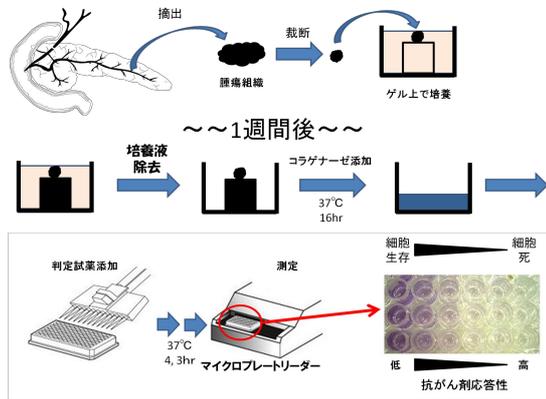
Caco-2 細胞を用いた取り込み実験

ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞を用いた取り込み実験は研究代表者の既報と同様の方法で行った (Itagaki S et al., J. Agric. Food Chem., 2005)。基質は 3-プロモビルビン酸 (3-BP) とし、その濃度は 1mM とした。取り込み時間は 24 時間とした。37℃, 5%CO<sub>2</sub> インキュベータで 24 時間取り込みを行い、終了後、細胞を洗浄し、MTT 溶液を加え 4 時間さらに培養した。反応後に MTT 溶液を吸引除去し、ジメチルスルホキシド (DMSO) を添加し、細胞内で酵素反応により産生した MTT-フォルマザンを、細胞内から抽出した。3 時間後、抽出液をマイクロプレートに移し、抽出液の吸光度を波長 540 nm にて測定した。

Histoculture drug response assay (HDRA) 法による抗がん剤感受性試験

弘前大学医学部附属病院薬剤部で HDRA 法による大腸がん剤感受性試験を施行した大腸がん症例を検討対象とした。HDRA 法の実施にあたっては、弘前大学医学研究科倫理委員会の承認 (承認番号: 2008-109) を得ている。

HDRA 法による感受性試験は、古川らの報告と同様の方法で行った (Furukawa T, et al., Clin. Cancer Res., 1995)。手術場にて採取した腫瘍組織は、ペニシリン、およびゲンタマイシンを含むハンクス溶液で十分洗浄し、速やかに壊死部分や正常組織部分を除去した。腫瘍組織を細かく裁断し、約 10~20 mg の組織をプレート内のコラーゲンスポンジ上に静置した。FBS, ペニシリン, ゲンタマイシンを含む RPMI-1640 培養液に各種抗がん剤を溶解し、各溶液で腫瘍組織を静置したコラーゲンスポンジを浸し、37℃, 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 7 日間培養した。培養後、コラーゲナーゼを含むハンクス溶液を添加し 16 時間培養しコラーゲンスポンジを溶解した。その後 MTT 溶液を加え 4 時間さらに培養した。培養液を完全に除去した後、DMSO を添加し、細胞内で酵素反応により産生した MTT-フォルマザンを、細胞内から抽出した。3 時間後、抽出液をマイクロプレートに移し、抽出液の吸光度を波長 540 nm にて測定した。



各抗がん剤の抑制率は、 $(1 - (\text{薬剤群の吸光度/g}) / (\text{対照群の吸光度/g})) \times 100(\%)$  とした。なお、各抗がん剤の有効性判定濃度及びカットオフ値 (抑制率, %) は、5-フルオロウラシル (5-FU) : 300 μg/ml (50%), イリノテカン (CPT-11) : 0.2 μg/ml (50%), シスプラチン (CDDP) : 20 μg/ml (50%), ドセタキセル (DOC) : 100 μg/ml (50%), とし、各抑制率以上を有効と判定した。

SELDI Protein Chip System (型式: PCS4000) による血液中抗がん剤反応性予測バイオマーカー候補探索

大腸がんについて感受性試験を行った培地 (コラーゲナーゼ処理後) を試験終了後採取し-30℃にて測定時まで保存した。培地に 3 倍量の 50 mM 酢酸バッファー (pH4.5) または 50 mM トリスバッファー (pH 8.5) を加え十分攪拌した。攪拌後、試料を強陰イオン交換樹脂 (Q10) 装着 Protein Chip Array に付イオン交換樹脂と十分反応させた後、各洗浄用バッファーおよび蒸留水にて洗浄し未吸着物質および塩類を除去した。その後エネルギー吸収体 (CHCA: α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)

をチャージし十分乾燥させ SELDI Protein Chip System( 型式: PCS4000 )にて測定した。

#### 4. 研究成果

腫瘍組織における SLC5A8 の発現低下には DNA メチル化が関与しており, DNA メチル化阻害薬 5'-Aza-C, 5'-Aza-CdR による脱メチル化処理によってその発現が回復する (Thangaraju M, Itagaki S, et al., Cancer, 2009)。この観点から, DNA メチル化阻害作用を有することが報告されている, 緑茶成分エピガロカテキンガレート, 大豆含有ポリフェノールゲニステインに着目した。しかし, Caco-2 細胞における 3-BP によるアポトーシス誘導は認められず, DNA メチル化阻害物質の共存によってもアポトーシス誘導は増強されなかった。

研究が当初計画通りに進まなかったため, サブ試験として, 大腸がんについて, 抗がん剤感受性試験を行った残存物である HDRA 法培養液から大腸がん組織の抗がん剤反応性を予測する血液中抗がん剤感受性応答因子の探索を行った。

一般に, 抗がん剤によるがん治療においては, 患者に多大な経済的負担が強いられる。さらに, 抗がん剤は副作用の発現頻度も高く, 治療を断念せざるを得ない場合も少なくない。特に, 使用された抗がん剤が無効であった場合, 患者はその副作用により苦しむ可能性が高い上に, 無意味な経済的負担を強いられることとなる。このような背景から, がん臨床現場では, 患者個人の薬剤反応性を考慮した抗がん剤選択が不可欠である。大腸がんについては, セツキシマブや パニツムマブの単剤療法その他, 5-FU とロイコボリンの併用療法である RPMI 法, 5-FU, ロイコボリン, CPT-11 の併用療法である FOLFIRI 法, 5-FU, ロイコボリン, オキサリプラチンの併用療法である FOLFOX4 法等が選択肢として存在する。

レジメン名	使用薬剤	症状に応じた併用薬剤
セツキシマブ	セツキシマブ	-
パニツムマブ	パニツムマブ	-
FOLFIRI	5-FU	ペバシスマブ セツキシマブ パニツムマブ
	ロイコボリン	
	イリノテカン	
FOLFOX	5-FU	ペバシスマブ セツキシマブ パニツムマブ
	ロイコボリン	
	オキサリプラチン	
RPMI	5-FU	ペバシスマブ
	ロイコボリン	
UFT/LV	テガフル・ウラシル	-
	ホリナート	
XELOX	カベシタピン	ペバシスマブ
	オキサリプラチン	
イリノテカン	イリノテカン	セツキシマブ パニツムマブ マイトマイシンC

2012 年春, 個々の患者に最適な抗がん剤を選択するための医療技術である抗がん剤感受性試験が保険診療の対象となった。抗がん

剤を患者に応じて適切に選択していく上で, 感受性試験の結果は重要な意味を有する。抗がん剤感受性試験の基本的原理は, 手術等により患者から採取したがん組織の一部を各種抗がん剤の存在する条件下で培養し, がん細胞の生存率(死亡率)を測定し, 抗がん剤の効果の有無を判定する方法である。その方法としては, HDRA 法以外にも, succinic dehydrogenase inhibition test (SDI) 法, culture drug sensitivity test (CD DST) 法などがある。しかしながら, これらの技法には腫瘍組織摘出前の患者への適応が技術上不可能という共通した問題が存在する。

感受性試験の結果, 5-FU は 3 症例中全てが陽性と極めて高い陽性率を示した。一方, CPT-11 については, 検討を行った 2 例いずれもが感受性試験陰性であった。シスプラチンについては, 検討を行った 1 例が感受性陽性, ドセタキセルについては, 検討を行った 1 例が感受性試験陰性であった。

感受性試験を 7 日間行った培養液 (MTT 試薬を含む) について, SELDI Protein Chip System を用いてペプチド等のプロファイリングを行い, 大腸がん組織の抗がん剤感受性と関連する物質の検索を行った。各サンプルにおいて幾つかのタンパク質発現変動は認められているものの, 現時点では, 症例数が十分でなく, 5-FU, CPT-11, いずれにおいても, 感受性試験の結果と協奏して発現が変動する, 特異的シグナルの特定には至っていない。

しかしながら, 今後の検討により, 5-FU 感受性陽性群で特異的に検出される物質を見出すことができれば, 曝露された抗がん剤により死滅したがん細胞由来物質の可能性が推定される。5-FU 感受性群で認められた物質は, 大腸がん腫瘍組織の抗がん剤応答性機序との関連性が明らかとなることで, 大腸がん術前・施術不可患者の 5-FU 選択の最適化 (5-FU 投与推奨患者の特定) に貢献するバイオマーカーとなる可能性が考えられる。

また, CPT-11 感受性陰性群で認められる物質は, CPT-11 に対する耐性機構に関与している物質の可能性が考えられる。抗がん剤の耐性機構には, 抗がん剤の細胞内への移行に関わる ABC (ATP-binding cassette) 輸送体ファミリー, 細胞内で抗がん剤の活性化や不活性化に関わる酵素, EGFR の過剰発現など様々な機序が明らかとなっている。CPT-11 感受性陰性群で認められた物質は, それらと生体内反応との関連性を評価していくことで, 大腸がん術前・施術不可患者の CPT-11 選択の最適化 (CPT-11 投与不可患者の特定) に貢献するバイオマーカーとなることが期待される。

本院では, 平成 26 年 4 月より, 抗がん剤感受性試験の対照診療科を全診療科に拡大した。症例を蓄積していくことで, 感受性試験の結果と協奏して発現が変動する, 特異的タンパク質を特定し, 患者における奏効性との関連を評価する臨床試験へと展開してい

きたい。

また、本研究を通じて確立した技術の波及効果として、他のがん種についても腫瘍組織の抗がん剤感受性と応答する血液中バイオマーカー探索研究を展開していきたい。

#### 5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

板垣 史郎 (ITAGAKI SHIRO)

弘前大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00360925