

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460068

研究課題名(和文) 高反応性脂質アルデヒド代謝酵素を標的とした肺がんアジュバント療法剤の開発

研究課題名(英文) Development of adjuvant therapy targeted to lipid-derived reactive aldehydes-metabolizing enzymes

研究代表者

松永 俊之 (Matsunaga, Toshiyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80306274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、肺がん細胞のシスプラチン(CDDP)耐性に伴って高反応性脂質アルデヒド解毒酵素の一つであるアルドケト還元酵素(AKR)1B10が高発現することを見出した。また、CDDP処理は一酸化窒素産生を亢進し、それがAKR1B10発現機序に関わると推察された。さらに、AKR1B10阻害剤での前処理は肺がん細胞のシスプラチン耐性を克服したことから、本阻害剤は肺がんのCDDP治療におけるアジュバント療法剤として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I found up-regulation of aldo-keto reductase (AKR) 1B10, an enzyme that detoxifies lipid-derived reactive aldehydes, by development of cisplatin (CDDP)-resistance in lung cancer cells. In addition, the treatment with CDDP enhanced the nitric oxide production, which may participate in mechanism of the AKR1B10 induction. Furthermore, pretreating with AKR1B10 inhibitor overcame the CDDP resistance, suggesting the availability of the inhibitor in adjuvant therapy for CDDP treatment of lung cancer.

研究分野：生物系薬学

キーワード：シスプラチン 肺がん 抗がん剤耐性化 アルドケト還元酵素

1. 研究開始当初の背景

肺がんは近年急増している難治性がん種であり、厚生労働省の「平成 22 年 人口動態統計の概況」によれば、肺がんによる死者は我が国のがん死亡者全体の約 20%にも及ぶ。また、肺がん部位外科的切除後の 5 年生存率は 30%と低く、良好な治療薬が未だ上市されていないため、肺がんは各がん種の中でアンメット・メディカル・ニーズが最も高い。特に発症の頻度が高い非小細胞肺がんの化学療法時には、第一選択薬である白金製剤シスプラチン (CDDP) とイリノテカン等の多剤併用療法が汎用されるが、副作用の発症頻度が高い上、CDDP の連続投与はがん細胞の感受性の低下、いわゆる CDDP 耐性化を容易に誘発するため、CDDP 耐性化を阻止する画期的なアジュバント療法剤の開発は急務である。今までの研究において、抗がん剤排泄タンパク質、上皮細胞増殖因子受容体 や腫瘍増殖に必須な血管新生因子 の抗がん剤耐性化への関与が示唆され、これらを標的とする阻害剤や抗体製剤の開発・臨床試験が進められているがそれ以外の抗がん剤耐性獲得に関わる因子については知られていない。

CDDP をはじめとする多くの抗がん剤の抗がん作用の一序に酸化ストレスの誘導が知られる。細胞内において活性酸素種が産生されると、それは生体膜脂質の過酸化を惹起して有毒な高反応性脂質アルデヒド [4-ヒドロキシノネナール (HNE) や 4-オキシノネナール (ONE) など] を過剰生成し、酸化タンパク質の過剰蓄積や小胞体ストレス誘発などを介して肺がん細胞死を誘発すると考えられている。高反応性脂質アルデヒドに対する細胞内解毒酵素として、グルタチオン転移酵素、アルデヒド脱水素酵素や 5 種のアルドケト還元酵素

(AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2 や AKR1C3) が挙げられるが、それら解毒酵素のうち AKR1B10 は肺細胞のがん化に伴って発現上昇することが報告された。また、我々は今までに AKR1B10 はイソプレノイド代謝を介して細胞増殖能を亢進することを示唆した。このように、AKR1B10 は肺がんマーカータンパク質として注目されつつあるが、肺がん細胞の抗がん剤耐性化における意義についてはほとんど未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、新規肺がんマーカーとして臨床的にも広く認識されつつある高反応性脂質アルデヒド解毒酵素、その中でも特に AKR1B10 に主眼を置き、1) 肺がん細胞の抗がん剤耐性獲得への関与を明確にするるとともに、2) 抗がん剤耐性克服における本酵素の特異的阻害剤の有効性を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養、抗がん剤耐性細胞と AKR1B10 過剰発現の樹立

A549 細胞は 37℃、5% CO₂ 条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養し、2 日毎に培地を交換して 7 日毎に継代維持した。増殖培地として 10% 熱非働化ウシ胎児血清、100 unit/mL ペニシリン G カリウムおよび 100 μg/mL 硫酸ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (pH 7.4) を用いた。

A549 細胞を CDDP 含有増殖培地にて継続的に培養することによってそれぞれの耐性細胞株を樹立した。培地中に添加した CDDP 濃度は段階的 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 および 5 μM) に増加させ、増加させるタイミングは 3 継代毎

とした。5 μ M CDDP に対して耐性獲得した A549 細胞のバリエーションを CDDP-R と命名して以下の実験に用いた。AKR1B10 過剰発現細胞は AKR1B10 の全配列を挿入した pGW1 ベクターを Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入することによって構築した。なお、空のベクターについても同様に導入し、対照細胞として使用した。AKR1B10 の発現抑制細胞の構築には、AKR1B10 siRNA を使用した。

(2) 抗がん剤感受性の測定

細胞を 96 ウェルマルチプレート中に 2×10^5 cells/mL ずつ播種し、CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。血清不含培地に交換して 2 時間培養後、培地中に試料を添加してさらに 24 時間培養した。細胞生存率 (%) は WST1 を用いたホルマザン色素法で算出した。

(3) ウェスタンブロット分析

回収した細胞を 0.1% Triton X-100 を含むリン酸緩衝化生理食塩水中に懸濁してソニケーションによって細胞を破碎した。細胞破碎液を遠心分離 (12,000 \times g、15 分間) し、その上清を採取して細胞抽出液とした。12.5% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により試料を分離した後、タンパク質を PVDF 膜に転写した。0.1%ウシ血清アルブミンおよび 5% スキムミルクを含む緩衝液中でインキュベートした後、膜を 1 μ g/mL の一次抗体および二次抗体と順次反応させた。反応性タンパク質は化学発光法により検出した。

4. 研究成果

(1) CDDP 耐性化肺がん細胞における AKR1B10 の高発現とその意義

ヒト肺がん A549 細胞を CDDP 含有培地中で継続的に培養することによって CDDP-R 細胞を樹立した。CDDP-R 細胞における 6 種の AKR (1A1, 1B1, 1B10, 1C1, 1C2 と 1C3) の発現量を半定量 PCR 法にて測定して非耐性 A549 細胞と比較したところ、耐性化に伴う 3 種の酵素 (AKR1B10, AKR1C1 と AKR1C3) の発現量増加が見られ、中でも AKR1B10 の発現上昇が顕著であった。また、耐性化による AKR1B10 発現量の増加はウェスタンブロット分析およびピリジン-3-アルデヒド還元活性においても確認された。未処理の CDDP-R 細胞の核中 Nrf2 量と Nrf2 遺伝子ヘムオキシゲナーゼ 1 発現量はどちらも A549 細胞よりも著明に多かったことから、CDDP 耐性化に伴う AKR1B10 の発現上昇は Nrf2 の恒常的活性化に起因すると推察された。A549 細胞の CDDP 感受性は AKR1B10 の過剰発現によって低下し、AKR1B10 siRNA による発現抑制やその特異的阻害剤オレアノール酸 (OA) での前処理によって有意に高まったことから、AKR1B10 は肺がん細胞の CDDP 耐性化に関わる主要因子であると示唆された。

(2) 耐性化に伴う抗酸化能の変動と AKR1B10 の関連性

CDDP 耐性化に伴うグルタチオン量の変動を調べたところ、CDDP-R 細胞中の総グルタチオン量は非耐性細胞よりも多かった。そこで、グルタチオン生合成の律速酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素の遺伝子発現量を半定量 PCR 法にて調べたところ、CDDP 耐性化による顕著な増加が認められた。また、CDDP 耐性化はグルタチオン還元酵素活性とグルタチオン転移酵素活性も高めたことから、肺癌細胞の CDDP 耐性化はグルタチオンの生

合成や代謝に関わる酵素の発現量や活性を高めることによって抗酸化能を亢進させると考えられた。

CDDP-R 細胞の抽出液を調製して高反応性脂質アルデヒド (HNE と ONE) 還元能を測定したところ、それらの還元能は非耐性細胞よりも高かった。また、AKR1B10 過剰発現は両アルデヒドの細胞毒性に対する感受性を低減した。さらに、酸化ストレス誘導時のアポトーシス機序であるミトコンドリア膜タンパク質 Bcl-2 の発現低下、カスパーゼ (カスパーゼ 9 とカスパーゼ 3) 活性化、小胞体ストレス関連タンパク質 (sXBP1 と CHOP) の発現増加は CDDP 耐性化や AKR1B10 過剰発現によって抑制されたことから、AKR1B10 は高反応性アルデヒドの解毒代謝を介して CDDP 耐性獲得に寄与すると考えられた。

(3) 一酸化窒素 (NO) の産生亢進と CDDP 耐性化におけるその意義

CDDP での 24 時間処理は A549 細胞中の NO 量を増加させた。また、CDDP 処理細胞のウェスタンブロット分析において NFκB の活性化と誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現誘導が認められたことから、CDDP 処理時の酸化ストレス誘導が NFκB/iNOS 経路の活性化を介して NO 産生を亢進させると考えられた。NO とスーパーオキシドアニオンから生成するパーオキシナイトライドの生成量は A549 細胞の CDDP 処理時に増加し、その生成量と AKR1B10 発現量の間には正の相関が認められたことから、CDDP 処理時に増加するパーオキシナイトライドが Nrf2 活性化を介して AKR1B10 発現を上昇させると推察された。CDDP 処理は CDDP-R 細胞の NO 産生や iNOS 発現、パーオキシナイトライド生成にほとんど

影響を及ぼさなかったことから、CDDP 処理時に産生される NO は AKR1B10 の上流に位置し、肺がん細胞の主要な耐性調節因子として機能すると考えられた。CDDP 処理は A549 細胞のプロテアソーム機能を亢進したのに対し、もともと高活性な CDDP-R 細胞のプロテアソーム活性にはほとんど影響しなかったことから、CDDP 処理時の NO 産生は CDDP 耐性化に伴うプロテアソーム機能亢進の調節因子としても機能すると推察された。

(4) AKR1B10 阻害剤による耐性克服効果

AKR1B10 阻害剤 OA の添加は CDDP-R 細胞の CDDP 感受性をほとんど非耐性細胞レベルまで高めた (Fig. 1)。また、同様の効果が今までに見出した他の AKR1B10 阻害剤 3-(4-hydroxy-2-methoxy-phenyl) acrylic acid 3-(3-hydroxy phenyl)propyl ester (HAHE) においても認められたことから、AKR1B10 阻害剤は CDDP 耐性化を抑制するアジュバント療法剤として有用であることが示唆された。

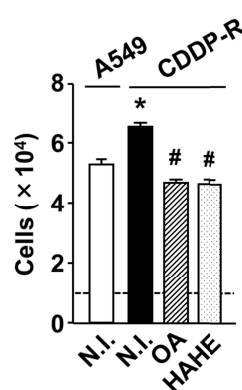


図 1 AKR1B10 阻害剤による CDDP 耐性克服

N.I., 阻害剤なし. *Significant difference from A549 cells (\square), $p < 0.05$. #Significant difference from A549 cells (\blacksquare), $p < 0.05$.

他の抗がん剤に対する CDDP-R の感受性を測定して A549 細胞と比較したところ、ドキソルビシン、マイトマイシン C や 5-フルオロウラシルなど酸化ストレス誘導を抗がん作用の一序とする抗がん剤に対して著明な感受性低下を誘起した。これら抗がん剤に対する交叉耐性は OA の添加によって有意に回復したことから、AKR1B10 阻害剤は他の抗がん剤に対する交叉耐性の抑制にも有効であることが示唆された。

引用文献

Choi MK, Kim DD. Platinum transporters and drug resistance. Arch. Pharm. Res., Vol.29, No.12, 2006, 1067-1073.

Oxnard GR, Arcila ME, Chmielecki J, Ladanyi M, Miller VA, Pao W. New strategies in overcoming acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. Clin. Cancer Res., Vol.17, No.17, 2011, 5530-5537.

Dempke WC, Suto T, Reck M. Targeted therapies for non-small cell lung cancer. Lung Cancer, Vol.67, No.3, 2010, 257-274.

Matsunaga T, Wada Y, Endo S, Soda M, El-Kabbani O, Hara A. Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. Front. Pharmacol., Vol.3, 2012, 5.

Endo S, Matsunaga T, Ohta C, Soda M, Kanamori A, Kitade Y, Ohno S, Tajima K, El-Kabbani O, Hara A. Roles of rat and human aldo-keto reductases in metabolism of farnesol and geranylgeraniol. Chem. Biol. Interact., Vol.191, No.1-3, 2011, 261-268.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

Matsunaga T, Kezuka C, Morikawa Y, Suzuki A, Endo S, Iguchi K, Miura T, Nishinaka T, Terada T, El-Kabbani O, Hara A, Ikari A. Up-regulation of carbonyl reductase 1 renders development of doxorubicin resistance in human gastrointestinal cancers. Biol. Pharm. Bull., 査読有, Vol.38, No.9, 2015, 1309-1319. DOI: 10.1248/bpb.b15-00176.

Morikawa Y, Kezuka C, Endo S, Ikari A, Soda M, Yamamura K, Toyooka N, El-Kabbani O, Hara A, Matsunaga T. Acquisition of doxorubicin resistance facilitates migrating and invasive potentials of gastric cancer MKN45 cells through up-regulating aldo-keto reductase 1B10. Chem. Biol. Interact., 査読有, Vol.230, 2015, 30-39. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.02.005.

DOI: 10.1016/j.cbi.2015.02.005.

Matsunaga T, Yamaji Y, Tomokuni T, Morita H, Morikawa Y, Suzuki A, Yonezawa A, Endo S, Ikari A, Iguchi K, El-Kabbani O, Tajima K, Hara A. Nitric oxide confers cisplatin resistance in human lung cancer cells through upregulation of aldo-keto reductase 1B10 and proteasome. Free Radic Res., 査読有, Vol.48, No.11, 2014, 1371-1385. DOI: 10.3109/10715762.2014.957694.

DOI: 10.3109/10715762.2014.957694.

〔学会発表〕（計 23 件）

松永 俊之、奥村 奈央子、毛塚 ちひろ、鈴木 綾香、遠藤 智史、井口 和弘、五十里 彰：消化器癌細胞のシスプラチン耐性化に伴うアルドケト還元酵素 1B10 とペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ の発現変動 第 88 回日本生化学会大会 第 38 回日本分子生

物学会年会合同大会 2015年12月1-4日(神戸)

山地 由希子、松永 俊之、加藤 美咲、森川 嘉文、井口 和弘、遠藤 智史、五十里 彰：
肺癌細胞のシスプラチン耐性化機序の解明
～一酸化窒素とアルドケト還元酵素の関与
～. 第61回日本薬学会東海支部大会 2015年7月4日(名古屋)

山地 由希子、松永 俊之、森川 嘉文、友國 琢允、加藤 美咲、遠藤 智史、五十里 彰、原 明：
肺癌細胞のシスプラチン耐性における一酸化窒素の意義. 日本酸化ストレス学会東海支部 第2回学術集会 2014年2月8日(岐阜)

森田 宏美、森川 嘉文、米澤 綾乃、遠藤 智史、松永 俊之：
シスプラチン耐性前立腺癌細胞におけるアルドケト還元酵素の発現上昇とその意義. 77回日本生化学会中部支部例会 2013年5月25日(名古屋)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 俊之 (MATSUNAGA, Toshiyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80306274