

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K00871

研究課題名(和文) 食品成分による分子標的薬のリスク回避と免疫予測マーカーの探索

研究課題名(英文) To avoid the side effects of molecularly-targeted agents by functional food and exploration of biomarkers for immune prediction.

研究代表者

鈴木 夏子 (Suzuki, Natsuko)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：60535293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子標的薬曝露後のalpha defensin (Defa5)および toll-like receptor (TLR) 4発現量の変動、Defa5の産生を促進する食品成分の探索、さらに分子標的薬による腸管免疫低下に対する食品成分の有用性を評価した。分子標的薬の曝露により、Defa5およびTLR4タンパク質発現量は有意に減少した。また、食品成分曝露によるDefa等への影響については、一部の食品成分でDefa5およびTLR4タンパク質発現量を増加させることを見出した。最後に、食品成分を併用することで、分子標的薬による腸管免疫低下を回復する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子標的薬は副作用の少ない経口抗がん剤として注目されているが、消化管に直接接触することから、特有の副作用である消化器症状が高頻度で発現する。本研究では、分子標的薬による腸管免疫低下に対する食品または食品成分の効果を検証し、食品成分併用が免疫低下を回復することを明らかにした。今回の検討により、市販の食品または食品成分の中にも、がん治療に対して正または負の相互作用を示すものがあるという可能性が示され、がん治療中に注意すべき食品成分のスクリーニングの必要性が示唆された。本研究の進展は、腸管免疫と食品成分を考慮した治療内容の立案に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to determine the effect of Anti-cancer agent treatment on innate immunity such as alpha-defensin (Defa5) and toll-like receptor (TLR) 4, and to identify the food ingredient of prevention effect against molecular targeted agent-induced innate immunity alteration.

This study summarizes our findings: 1) At first, molecular targeted agent decreased the protein levels of Defa5 and TLR4 in Caco-2 cells. 2) Some food ingredients increased the protein levels of Defa5 in Caco-2 cells. 3) Exposure of these food ingredients had a significant protective against molecular targeted agent-induced reduction of Defa5 and TLR4.

研究分野：食品機能学

キーワード：分子標的薬 腸管免疫 機能性食品

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、従来のものより副作用の少ない経口抗がん剤として分子標的薬が注目されているが、特有の副作用である消化器症状が高頻度に発現することから使用に関して課題は多い。このような背景から、免疫賦活による副作用軽減を期待し、治療と併用してサプリメントを使用するケースが増えているが、我が国で市販される機能性食品については機能評価が企業に委ねられており、膨大な試験費用を要することからエビデンスに乏しいものが数多く存在する。また、サプリメントの使用は恩恵をもたらすばかりではなく、それ自体もしくは薬剤との併用による健康被害を被る可能性があり、がん患者の安全性担保の観点から、経口摂取された機能性食品および薬物が最初に接触する腸管免疫の食-薬間相互作用の科学的検証が必要となる。また、免疫の中心となる腸管をターゲットとした食品成分のリスク評価に関しては生体機能への影響を考慮して評価している報告は少ない。

### 2. 研究の目的

がん治療においては、腸管粘膜障害による腸管免疫低下、さらには治療効果および栄養状態の悪化が懸念されている。近年、従来のものより副作用の少ない経口抗がん剤として分子標的薬が注目されているが、特有の副作用である消化器症状が高頻度に発現することから使用に関して課題は多い。このような背景から、免疫賦活による副作用軽減を期待し、治療と併用してサプリメントを使用するケースが増えているが、エビデンスに乏しいものも多く存在するため、併用によるリスクおよび有用な食品成分の特定が急務である。また、免疫の中心となる腸管をターゲットとした食品成分のリスク評価に関しては生体機能への影響を考慮して評価している報告は少ない。本研究では、分子標的薬の免疫低下の機序および有用食品成分を特定し、腸管免疫を評価できるマーカーを見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト結腸癌由来細胞で小腸モデル細胞として汎用される Caco-2 を用いて検討を行った。検討に先立ち、セルバンクの異なる3種の Caco-2 細胞 (ATCC、DSMZ および RIKEN) における分化の違いを、ALP 活性および Defa5 を含むその他の遺伝子により評価した。続いて、分子標的薬および食品成分添加による  $\alpha$ -defensin (Defa) 5、さらにその上流に位置する Toll-like receptor (TLR) 4 発現量を mRNA 量およびタンパク質発現量にて評価した。これらの検討が細胞生存率に起因するものではないことを確認するため、MTT 法を用いて分子標的薬および機能性食品成分が生存率に与える影響を確認した。分子標的薬による腸管免疫低下に対する食品成分の効果の検証には Defa5 発現量を指標として用い、LPS 曝露時の影響を評価した。その他、各遺伝子発現はリアルタイム PCR、タンパク質発現量はウエスタンブロットにより定量を行った。また、Defa 分泌量については、ELISA 法を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) セルバンクの異なる Caco-2 細胞の分化の違い

初めに、培養日数が Caco-2 細胞の分化に及ぼす影響について明らかとするため、培養日数に伴う ALP 活性を検討した。その結果、いずれの Caco-2 においても細胞播種から 14 日以降に横ばい傾向を示したことから、14 日以降に細胞分化を生じることが明らかとなった。次に、培養日数の経過が Defa5 分泌に及ぼす影響を明らかにするため、上清中に分泌される Defa5 分泌を ELISA 法により測定した。その結果、RIKEN の Caco-2 細胞における Defa5 分泌量は培養日数の経過に伴い直線的に増加した。以上の結果から、以降の検討には ATCC の Caco-2 を用いることとした。

#### (2) 分子標的薬が Defa5 およびその関連遺伝子に及ぼす影響

3 種類の分子標的薬を用いて、Caco-2 細胞に発現する Defa5、TLR4 および細胞生存率に及ぼす影響を評価した。アファチニブにおいては、5、15、30 および 60 分の短時間曝露において Defa5 タンパク質発現量の有意な減少が確認されたが、エルロチニブおよびゲフィチニブでは 60 分以降で減少する傾向が見られた。また、Defa5 の発現に関与する TLR4 タンパク質発現量については、Defa5 と同様の傾向を示した。各薬剤の薬効を確認するため、EGFR および pEGFR タンパク質発現量に及ぼす影響について評価した。その結果、各薬剤は 5、15、30 および 60 分で EGFR のリ

ン酸化を抑制し、各時間において EGFR-TKI としての機能が保たれていることを確認した。各薬剤曝露による細胞生存率の低下が確認されなかったことから、Defa5 タンパク質発現量の低下は、細胞生存率に起因しないことが示された。

### (3) 食品およびその成分が Defa5 およびその関連遺伝子に及ぼす影響

8 種の食品成分について、Caco-2 細胞の Defa5、TLR4 および細胞生存率に及ぼす影響を評価した。機能的食材として知られるシーベリー、その機能的成分と知られるパルミトレイン酸を添加することで、Defa5 タンパク質発現量は有意に上昇した。また、TLR4 タンパク質発現量についても、Defa5 と同様の傾向を示したことから、Defa5 タンパク質発現量の上昇は TLR4 の発現上昇が関与する可能性が示唆された。エクオールを含む抗酸化成分および GABA 添加では、Defa5 タンパク質発現量が有意に上昇したが、TLR4 との相関は確認されなかった。その他、DHA を含む食品成分については Defa の減少または変動が見られなかった。各薬剤曝露による細胞生存率の低下が確認されなかったことから、Defa5 タンパク質発現量の変動は、細胞生存率に起因しないことが示された。

### (4) 分子標的薬による腸管免疫低下に対する食品成分の効果

分子標的薬による Defa5 発現低下に対する食品成分の効果を確認するため、Defa5 の上昇が確認されたシーベリー、パルミトレイン酸およびエクオールを用いて併用実験を行った。Caco-2 細胞に分子標的薬を曝露後、LPS および各食品および成分を曝露し、Defa5 および TLR4 タンパク質発現量、さらに治療への影響を確認するため pEGFR/EGFR タンパク質発現量についても測定した。その結果、LPS 単独曝露に比べ、LPS とエルロチニブ併用における Defa5 および TLR4 タンパク質発現量は有意に減少し、シーベリー、パルミトレイン酸およびエクオール併用することで LPS 単独曝露と同程度まで回復した。また、pEGFR/EGFR タンパク質発現量については、各成分併用による変動は確認されなかったことから、治療の効果へは影響しないことが示唆された。

今後、食品成分を追加して分子標的薬による免疫低下に対する効果を検証するとともに、効果をヒトにて簡便に測定できる方法を構築することを目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Genki Yasuda, Masaki Kobayashi, Atsuhito Kubota, Katsuya Narumi, Ayako Furugen, Yoshitaka Saito, Takashi Satoh, Natsuko Suzuki, Ken Iseki	4. 巻 44
2. 論文標題 Analysis of -Defensin 5 Secretion in Differentiated Caco-2 Cells: Comparison of Cell Bank Origin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol. Pharm. Bull	6. 最初と最後の頁 275-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00644	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門萌子、窪田篤人、小林正紀、保田元気、更科壮太、井関健、星幸子、鈴木夏子
2. 発表標題 シーベリーが抗がん薬による腸管免疫低下に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇内優、筑後裕貴、保田元気、小林正紀、井関健、鈴木夏子
2. 発表標題 エルロチニブが腸管免疫に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上莉歩、村上えり、門萌子、太田沙希、保田元気、窪田篤人、小林正紀、井関健、鈴木夏子
2. 発表標題 エルロチニブによる -デフェンシンの低下に対するシーベリーの効果
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第146例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上えり, 川上莉歩, 保田元気, 窪田篤人, 星幸子, 小林正紀, 井関健, 鈴木夏子
2. 発表標題 分子標的薬による腸管免疫低下に対する シーベリージュースの効果
3. 学会等名 第8回日本未病システム学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保田 元気、小林 正紀、窪田 篤人、更科 壮太、鳴海 克哉、古堅 彩子、鈴木 裕治、鈴木 夏子、井関 健
2. 発表標題 経口抗がん薬ならびに腸管免疫機能が排出系トランスポーター発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	小林 正紀  (Kobayashi Masaki)  (70431319)	北海道大学・薬学研究院・教授    (10101)	

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