

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08278

研究課題名(和文) 脂質代謝酵素を標的とした進行性大腸がんアジュバント療法剤の開発

研究課題名(英文) Development of adjuvant for treatment of advanced colon cancer targeted to lipid-metabolizing enzymes

研究代表者

松永 俊之 (Matsunaga, Toshiyuki)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80306274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、大腸がん細胞の抗がん剤(イリノテカン、イリノテカン活性代謝物SN38、5-フルオロウラシルやパクリタキセル)耐性獲得に伴って脂質代謝酵素であるアルドケト還元酵素(AKR)1B10やAKR1C3が高発現することを見出した。また、抗がん剤処理による活性酸素種産生の亢進とNrf2活性化がこれらAKRアイソフォームの発現誘導機序であると推察された。さらに、2種のAKRアイソフォームの特異的阻害剤の処理は大腸がん細胞のイリノテカン耐性化や交叉耐性化を克服したことから、これら阻害剤は大腸がんの細胞の抗がん剤耐性化や交叉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と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の外科的技術や検査技術の急速な進歩にも拘わらず、我が国における大腸がん患者数は依然として増加している。進行・再発大腸がんは、概して抗がん剤に対して感受性が低く、その連続投与に伴って容易に耐性化するため、抗がん剤耐性化を誘起しない画期的な抗がん剤の開発は急務である。本研究において、大腸がんの抗がん剤耐性獲得時に脂質代謝酵素であるアルドケト還元酵素(AKR1B10とAKR1C3)が発現増加し、この阻害剤は大腸がんの抗がん剤耐性や交叉耐性を抑制するアジュバント療法剤として有効であることを示した。本研究をさらに発展させることにより進行・再発大腸がんの根本治療法の確立に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)： In this study, I found that expressions of aldo-keto reductase (AKR) 1B10 and AKR1C3, lipid-metabolizing enzymes, are up-regulated by resistance development to irinotecan, its active metabolite SN38, 5-fluorouracil or paclitaxel in colon cancer cells. In addition, it is suggested that the anticancer drug-promoted production of reactive oxygen species and the resultant Nrf2 activation are mechanisms responsible for the enzyme up-regulation. Furthermore, incubation with inhibitor of AKR1B10 or AKR1C3 overcame the resistance and cross-resistance to the anticancer drugs, suggesting the availability of the inhibitors in adjuvant therapeutic agents for anticancer treatment of colon cancer cells.

研究分野：病態生化学

キーワード：アルドケト還元酵素 抗がん剤耐性 大腸がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の外科的技術や検査技術の急速な進歩にも拘わらず、我が国における大腸がん等の腸関連疾患による通院や入院患者数は年々増加しており、厚生労働省の「平成 26 年患者調査の概況」によれば、近い将来に年間 30 万人に達する勢いである。また、大腸がんによる死亡者数も増加の一途を辿っており、肺がんや胃がんと並んで悪性新生物による死亡率の最上位に位置する。大腸がんは他がん種と異なって転移頻度が低いため、早期発見・治療されれば完治の確率は高いが、自覚症状に乏しいゆえ進行がんとして発見される患者がほとんどである。進行大腸がんや再発大腸がんは、概して化学療法剤に対して感受性が低い上、その連続投与に伴って容易に耐性獲得、すなわち「抗がん剤耐性化」するため、現行の大腸がん化学療法では多剤併用治療とその緻密な薬物モニタリングが余儀なくされている。この多剤併用療法は、多様かつ重篤な副作用を発現するだけでなく、高額な医療費負担が生じるため、抗がん剤耐性化を誘起しない画期的な抗がん剤の開発は急務である。

大腸がん細胞の抗がん剤耐性化機序についてはほとんど未解明であるが、今までの研究に基づいて、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターB1 (ABCB1)、増殖因子受容体や細胞内の異物代謝機構プロテアソーム等が抗がん剤耐性化機序の一因とされ、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。我々は今まで、がんの発症や抗がん剤耐性化の機序研究や脂質代謝酵素の酵素学的諸性質の解明を目的として研究を進め、最近、肺がん細胞のドキソルピシンやシスプラチン化はアルドケト還元酵素 (AKR) スーパーファミリーに属する 2 種の脂質代謝酵素 (AKR1B10 と AKR1C3) の発現上昇を誘起することを見出した。

また、これら酵素の特異的阻害剤を用いた検討において肺がん細胞の抗がん剤耐性化において主要な役割を果たすことを示唆した。AKR1B10 は、肺、肝臓や消化管細胞のがん化に伴って高発現し、レチナールのレチノールへの還元を介して細胞増殖能を亢進させること、マロニル CoA 合成酵素の活性化を介して脂肪酸量の調節に関わることが知られる。また、プロスタグランジン (PG) $F_{2\alpha}$ 合成酵素として見出された AKR1C3 は、前立腺や乳腺など性組織のがん化時に高発現し、テストステロン生合成や 15-deoxy-PGJ₂ 生成抑制を介して増殖能を高める。我々は今までに、これら両脂質代謝酵素はファルネサル等のイソプレニルアルデヒドの還元とその下流に位置する Ras 成熟化と MAP キナーゼ活性化を介して細胞増殖能を高めること、並びに酸化ストレス誘導時に膜脂質の過酸化によって生じる毒性の強いヒドロキシノネールの解毒作用を介して抗酸化能を高めることを示した。

このように、AKR1B10 や AKR1C3 など脂質代謝酵素は肺がん細胞の抗がん剤耐性マーカータンパク質として注目されつつあるが、大腸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脂質代謝酵素、その中でも特に AKR1B10 と AKR1C3 に主眼を置き、1) 大腸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酵素過剰発現細胞の樹立

2 種の大腸がん細胞 (DLD1 と LoVo) と胃がん MKN45 細胞は 37°C、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。

上記3種の細胞を抗がん剤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。培地中に添加したイリノテカン (CPT11)、CPT11 活性代謝物 (SN38)、5-フルオロウラシル (5FU) およびパクリタキセル (PTX) の濃度は段階的に増加させ、増加させるタイミングは3継代毎とした。10 µM CPT11、500 nM CPT11、50 µM 5FU または 20 nM PTX に対して耐性獲得した核細胞のバリエーションを耐性細胞として以下の実験に用いた。AKR1B10 や AKR1C3 の過剰発現細胞はそれら酵素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。両酵素の発現抑制細胞の構築には、それぞれの 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晚培養した。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48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 x 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 µg/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) 抗がん剤耐性細胞における AKR1B10 と AKR1C3 の高発現とその意義

2種の大腸がん細胞 (DLD1 と LoVo) と胃がん MKN45 細胞を CPT11、SN38、5FU あるいは PTX を含む増殖培地で継続的に培養することによってそれぞれの抗がん剤耐性細胞の調製に成功した。本研究において樹立できた抗がん剤耐性細胞のうち、DLD1 細胞と LoVo 細胞の抗がん剤耐性化に伴う4種の AKR アイソフォーム (1B10、1C1、1C2 および 1C3) の発現変動をウェスタンブロット法にて検証した結果、4種のいずれの抗がん剤においても耐性化に伴う AKR1C1 と AKR1C3 の発現上昇が認められたが、それらのうち AKR1C3 の上昇が顕著であった。MKN45 細胞の抗がん剤耐性細胞ではこれらに加えて AKR1B10 の高発現も認められた。また、これら AKR アイソフォームの発現上昇はリアルタイム PCR 解析や特異基質を用いた酵素活性測定においても認められたことから、これら4種の抗がん剤耐性獲得時には2種の AKR アイソフォーム (AKR1C3 と AKR1B10) の発現が誘導されることが示唆された。

AKR1B10 または AKR1C3 過剰発現細胞の4種の抗がん剤に対する感受性は非耐性細胞より低く、それら酵素の siRNA を用いて樹立した発現抑制細胞では抗がん剤感受性は有意に高かったことから、2種の脂質代謝酵素 (AKR1B10 と AKR1C3) の高発現が消化器がん細胞の抗がん剤耐性において主要な役割を果たすと考えられた。

(2) 抗がん剤耐性細胞における Nrf2 の活性化

耐性細胞における Nrf2 の活性化の有無をウェスタンブロット法にて調べたところ、いずれの耐性細胞においても Nrf2 の著明な活性化が認められた。Nrf2 活性化機序を調べるために、4 種の抗がん剤処理による活性酸素種 (ROS) の産生をフローサイトメトリー分析にて、脂質過酸化産物 (ヒドロキシノネナルなど) の生成量をドットプロット分析や蛍光測定法にて調査した結果、今回用いた 4 種の抗がん剤での 24 時間処理は、程度は異なるが細胞内での ROS 産生量と脂質過酸化産物生成量を増加させた。また、抗がん剤耐性化に伴う Nrf2 の恒常的活性化の程度はその ROS 産生量と正の相関を示したことから、抗がん剤による ROS 産生の亢進が Nrf2 の恒常的活性化を介して 2 種の AKR アイソフォームの高発現を誘起すると推察された。

(3) 抗がん剤耐性化に伴う ABC トランスポーターの発現変動とその意義

抗がん剤耐性化による 4 種の ABC トランスポーターアイソフォーム (ABCB1、ABCC1、ABCC2 と ABCG2) の発現変動をウェスタンブロット法にて調べたところ、4 種のアイソフォームのうち ABCB1 の発現上昇が顕著であり、ABCB1 阻害剤ベラパミルでの前処理は抗がん剤感受性を有意に高めた。また、抗がん剤耐性化は ABCB1 の基質であるローダミンの細胞外への排出を促進した。さらに、Nrf2 活性化剤スルフォラファンでの前処理は ABCB1 の発現と機能を亢進したことから、Nrf2 の恒常的活性化は ABCB1 の発現誘導を介して抗がん剤耐性化において重要な役割を果たすと推察された。

ABCB1 の発現誘導機序には Nrf2 だけでなく、プレグナン X 受容体 (PXR) も関与する。そこで、CPT11 耐性細胞の PXR 発現量をウェスタンブロット法にて検証したところ、CPT11 耐性細胞では PXR の高発現が認められ、その発現上昇は ABCB1 発現と正の相関を示した。CPT11 耐性株と非耐性株における CPT11 代謝物の生成量を LC/MS/MS 分析にて調べた結果、細胞中には CPT11 と SN38 のみが検出され、それ以外のイリノテカン代謝物 (APC、NPC やグルクロン酸抱合体など) はほとんど検出されなかった。また、CPT11 や SN38 に対する耐性化は細胞中 SN38 量の減少と細胞外 (培地中) SN38 量の増加を引き起こしたことから、抗がん剤耐性化による ABCB1 の高発現は SN38 の細胞外排出能の亢進を介して CPT11 耐性化を促進すると考えられた。

(4) AKR1B10 阻害剤による耐性克服効果

CPT11 耐性細胞の CPT11 感受性は AKR1C3 阻害剤や AKR1B10 阻害剤の添加により高められた (図 1)。また、CPT11 耐性細胞は SN38 だけでなく、5FU や PTX に対しても交叉耐性を示し、AKR 阻害剤の添加はこれら 3 種の抗がん剤 (SN38、5FU と PTX) に対する CPT11 耐性細胞の感受性低下も回復させた。以上より、抗がん剤耐性化に伴って高発現する 2 種の脂質代謝酵素 (AKR1B10 と AKR1C3) の特異的阻害剤は大腸がん細胞の抗がん剤耐性化や交叉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と考えられた。

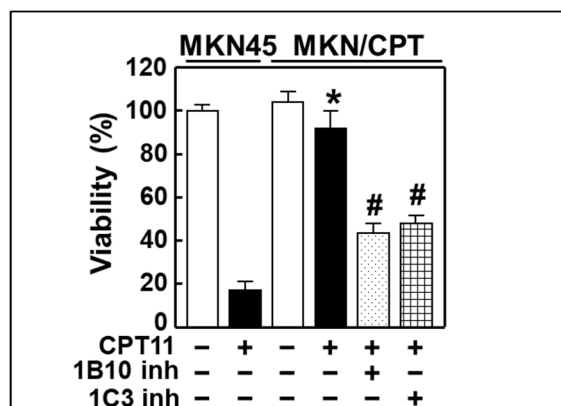


図1 阻害剤によるCPT11耐性克服効果

MKN45とCPT11耐性MKN45 (MKN/CPT) 細胞を20 μ M AKR1B10阻害剤 (1B10 inh) または20 μ M AKR1C3阻害剤 (1C3 inh)存在下において100 μ M CPT11で48時間処理後、細胞生存率を算出した。*CPT11処理MKN45細胞からの有意差 $p < 0.05$ 、#CPT11処理MKN/CPT細胞からの有意差 $p < 0.05$

引用文献

Scala S, Pacelli R, Iaffaioli RV, Normanno N, Pepe S, Frasci G, Genua G, Tsuruo T, Tagliaferri P, Bianco AR. Reversal of adriamycin resistance by recombinant α -interferon in multidrug-resistant human colon carcinoma LoVo-doxorubicin cells. *Cancer Res.*, Vol.51, No.18, 1991, 4898-4902.

Park JJ, Yi JY, Jin YB, Lee YJ, Lee JS, Lee YS, Ko YG, Lee M. Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.*, Vol.83, No.7, 2012, 849-857.

Grantab RH, Tannock IF. Penetration of anticancer drugs through tumour tissue as a function of cellular packing density and interstitial fluid pressure and its modification by bortezomib. *BMC Cancer*, Vol.12, 2012, 214.

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.*, Vol.48, No.11, 2014, 1371-1385.

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.*, Vol.230, 2015, 30-39.

Crosas B, Hyndman DJ, Gallego O, Martras S, Parés X, Flynn TG, Farrés J. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: Consequences for retinoid metabolism. *Biochem. J.*, Vol.373, 2003, 973-979.

Ma J, Yan R, Zu X, Cheng JM, Rao K, Liao DF, Cao D. Aldo-keto reductase family 1B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase- α in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, Vol.283, No.6, 2008, 3418-3423.

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 Matsunaga T, Kawabata S, Yanagihara Y, Kezuka C, Kato M, Morikawa Y, Endo S, Chen H, Iguchi K, Ikari A.	4. 巻 314
2. 論文標題 Pathophysiological roles of autophagy and aldo-keto reductases in development of doxorubicin resistance in gastrointestinal cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Biol. Interact.	6. 最初と最後の頁 108839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbi.2019.108839.	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 松永 俊之、奥村 奈央子、井口 和弘、遠藤 智史、五十里 彰
2. 発表標題 大腸がん細胞のイリノテカン耐性化におけるアルドケト還元酵素1C3とABCトランスポーターB1の意義
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀之内 美智、松永 俊之、斎藤 晴陽、井口 和弘、遠藤 智史、五十里 彰
2. 発表標題 乳癌細胞のパクリタキセル耐性化におけるアルドケト還元酵素1C3とABCトランスポーターB1の意義
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大久保 沙知、奥村 奈央子、山地 由紀子、堺 千紘、横山 聡、伊野 陽子、井口 和弘、五十里 彰、松永 俊之
2. 発表標題 前立腺癌細胞株における抗アンドロゲン剤の細胞増殖抑制作用への抗酸化酵素の関与
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林 美緒、土村 冴花、堀之内 美智、遠藤 智史、井口 和弘、五十里 彰、松永 俊之
2. 発表標題 乳癌細胞のシスプラチン耐性化におけるアルドケト還元酵素103とプロテアソームの意義
3. 学会等名 第83回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永 俊之、川畑 沙織、小林 美緒、岩佐 華、井口 和弘、遠藤 智史、五十里 彰
2. 発表標題 消化器癌細胞のドキシソルピシン耐性化におけるオートファジーとアルドケト還元酵素の意義
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 生化学研究室 ホームページ http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/

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	井口 和弘 (Iguchi Kazuhiro) (10295545)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701)	