

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08424

研究課題名（和文）がん化学療法治療反応性に対する血中胆汁酸の影響とそのメカニズムに関する研究

研究課題名（英文）Effect of bile acid with elevated levels in human serum on cancer cell proliferation and sensitivity to anticancer drugs.

研究代表者

鈴木 小夜（SUZUKI, Sayo）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・教授

研究者番号：90424134

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：がんの早期発見方法や標準的治療法の確立、新しい分子標的薬の登場など、診断・治療技術の進歩はがん治療成績の向上をもたらしつつあるが、いまだ十分とは言えない。本研究では、消化器がんに影響を及ぼすことが知られている高濃度胆汁酸のみならず、肝障害やがんによる胆管の閉塞、その他の理由により血液中で上昇する濃度範囲の胆汁酸上昇（消化管中に流れ込む胆汁酸よりも低濃度）が、がん細胞の種類や胆汁酸に曝露される濃度や環境により、がん細胞の増殖を促進し、抗がん剤の抗腫瘍効果を低下させる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、臨床で生じ得る血中胆汁酸濃度の上昇・変動ががん細胞の増殖や抗がん剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響やそのメカニズムを明らかにすることができれば、例えば肝障害があり血液中に胆汁酸が滞っている胆汁うっ滞などが生じている場合等で抗がん剤治療を行う必要がある場合に、あらかじめ手術で摘出した腫瘍組織中の関連タンパク質や関連遺伝子を分析することにより個々の患者に合わせた適切な薬物治療の選択が可能となる（治療の個別化）。さらにそれが可能となれば、治療開始段階から効果の期待できる抗がん剤を選択できるため医療経済の観点からも有意義であり、社会的貢献も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）： Recently, many standard-of-care chemotherapy regimens have been established and new approaches to improve the prevention and early detection of cancer have also been developed. However, unfortunately, they leave much to be desired.

In this study, we focused on the cancer treatments of patients with conditions like cholestasis. As a first step of this study, we mainly used several human cancer cells and deoxycholate (DCA) or chenodeoxycholate (CDCA) which are components in bile acids. We showed that DCA and / or CDCA with concentrations corresponding to elevated serum levels in such as cholestasis or biliary obstruction by tumors enhanced cell proliferation and / or decreased sensitivity to anticancer drugs depending on the kinds of cancer cells and conditions of bile acids exposure.

研究分野：医療薬学

キーワード：がん 胆汁酸 抗がん剤感受性 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

個々の患者の薬剤反応性に基づく治療の個別化は、がんの治療成績向上、患者の QOL 向上に不可欠である。特に、臓器障害など特別な背景を有するがん患者に対する化学療法実施に際しては臨床症状や治療方針等を考慮した適切な薬剤選択・用量調節が必要である。

近年、胆汁酸は核内受容体と結合して遺伝子の転写発現調節を司る生理活性物質として注目されている (*J Lipid Res* 2009,50:1509)。活性酸素の産生による細胞の DNA 障害、アポトーシス誘導が報告されている一方、細胞の致死量に満たない濃度の胆汁酸の持続的曝露は細胞にアポトーシス抵抗性をもたらすことが報告されており、大腸がん、食道上皮がん、胃がん、膵臓がん、胆管がんなどにおいて 100  $\mu\text{M}$  以上の高濃度でプロモーターとしての作用が報告されている (*World J Surg Oncol* 2014,24:16、*J Physiol Pharmacol* 2010,61:185、*Gastric Cancer* 2002,5:16、*World J Gastroenterol* 2016,7:7463、*Free Radic Biol Med* 2005,39:1418)。しかし、これらはいずれも高濃度胆汁酸に直接曝露される環境に存在する消化器がんに関する報告である。健康成人の血中胆汁酸を構成する各成分濃度はおよそ 0.01 ~ 1  $\mu\text{M}$  程度であるが、胆汁うっ滞型肝障害や肝外胆管の閉塞により胆汁排泄が滞った場合は 10 ~ 80  $\mu\text{M}$  にも達する。血液中の胆汁酸濃度上昇時には基本的にはすべての臓器がん及び血液がんは胆汁酸成分に曝露されていると考えられ、このような血中胆汁酸が上昇する病態を呈する患者のがん細胞は血中の高濃度胆汁酸に曝露され、がん細胞増殖促進機構が働いているのではないかと期待される化学療法治療反応性・有効性は得られるのであろうか、との懸念が湧く。しかし臨床血液中で想定され得る胆汁酸濃度の上昇時の他がん種への影響についての報告はほとんどなく、わずかに乳がん細胞や食道上皮がん細胞において 100  $\mu\text{M}$  以下の濃度で細胞増殖が促進するとの報告があるが (*J Lipid Res.* 2006; 47: 724、*J Surg Res.*2006;132:130)、抗がん剤感受性への影響について検討されたものはない。がん細胞増殖と化学療法治療反応性に対する胆汁酸の影響を明確にすることで、患者背景に基き治療反応性を適切に評価した上での治療方針の決定、つまり治療の個別化に関わる一因を明らかにすることができる。と考える。

## 2. 研究の目的

抗がん剤に対する治療反応性の個体差 (レスポnder・ノンレスポnder) 解明と治療個別化による効果的かつ安全な治療の実現はがん薬物治療における究極の目標である。その一環として、本研究では、近年、遺伝子の転写発現調節を司る生理活性物質として注目されている胆汁酸に着目し、胆汁うっ滞型障害等により臨床血液中で想定される胆汁酸濃度の上昇・変動ががん細胞の増殖及び抗がん剤感受性に及ぼす影響とその機序について明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下の方法で研究を行った。

(1) がん細胞増殖及び抗がん剤感受性に対する胆汁酸濃度及び曝露時間の影響についての検討 (*in vitro*)

ヒト慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株 K562、ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト乳がん細胞株 MCF-7、マウス乳がん細胞株 4T1 に胆汁酸成分であるデオキシコール酸 (DCA) 及びケノデオキシコール酸 (CDCA) を、抗がん剤併用もしくは非併用時に各種濃度及び時間で曝露し、これら細胞株の細胞生存・細胞増殖及び抗がん剤感受性に与える影響について検討した。細胞生存率及び抗がん剤感受性は CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution (Promega) を用いた MTS assay もしくは Vi-CELL (Becman Coulter) を用いたトリパンブルー色素排除法によ

る生細胞数測定により評価した。

#### (2) *In vivo* モデル動物による評価

BALB/cAnNCrCrIj マウス (雌、5 週齢) にマウス乳がん細胞株 4T1 を移植した担癌マウスの胆管を結紮することにより胆汁うっ滞モデルマウスを作製し、腫瘍増殖への影響を評価した。具体的には、マウス入手日含めて 7 日間馴化した後、マウス乳がん細胞株 4T1 を右側第二乳頭部皮下に移植し、移植日を Day 0 とし、Day 10 に生食投与を実施し、胆管結紮群及び sham 群に分け、Day 1 ~ Day 30 まで目視観察、体重測定及び腫瘍系測定を行った。観察終了後は安楽死させた後に摘出腫瘍重量、肺重量測定及び肺転移の有無 (結節数カウント) を実施した。

#### (3) 胆汁酸のがん細胞増殖・薬剤感受性に影響を与える機序についての検討 (*in vitro*)

DCA もしくは CDCA 曝露により細胞生存率が有意に上昇したヒト CML 細胞株 K562 について、DCA もしくは CDCA 曝露前後で mRNA 及びタンパク質を抽出し、シクロオキシゲナーゼ (COX)-1、COX-2、オーファン核内受容体関連分子 brain and reproductive organ-expressed (BRE) の経時的発現変化について検討し細胞増殖との関連について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) がん細胞増殖及び抗がん剤感受性に対する胆汁酸濃度及び曝露時間の影響についての検討 (*in vitro*)

CM 細胞株 K562 では DCA 及び CDCA が細胞毒性を示すよりも低い濃度 1 ~ 10  $\mu$ M で細胞増殖促進的に作用し、さらに、DCA もしくは CDCA の 3 日間曝露は代謝拮抗剤 MTX 72h 曝露後細胞生存率に影響を与えなかったが、17 日間曝露は MTX 曝露後細胞生存率を有意に上昇させ MTX 感受性は低下した。一方、1  $\mu$ M DCA 曝露は分子標的薬イマチニブ (IM) 72h 曝露後の細胞生存率を上昇させたが、17 日曝露は DCA、CDCA いずれも IM 曝露後生存率を低下させる傾向が強く認められた。

ヒト肝細胞がん株 HepG2 に対する DCA もしくは CDCA 0 ~ 100  $\mu$ M、24 ~ 96h 曝露は、HepG2 細胞生存率及び白金系抗がん剤シスプラチン (CDDP) の 48h 曝露後細胞生存率に顕著な影響は与えなかった。

ヒト肺がん細胞株 A549 及びヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いた検討では、胆汁酸が抗がん剤曝露時の細胞内環境に変化をもたらすのか、もしくは抗がん剤曝露後の細胞傷害回復や修復に関わるのかを検討するために、DCA もしくは CDCA 曝露を、抗がん剤曝露前後 (それぞれ前曝露及び後曝露) で実施する 2 条件で検討した。その結果、いずれの条件にても 50  $\mu$ M DCA 曝露は A549 細胞生存率を低下させたが、CDDP 曝露後生存率に対する DCA 及び CDCA の影響は認められなかった。一方、MCF-7 では、DCA 及び CDCA いずれもドキソルビシン (DXR) 非曝露時の細胞生存率に大きな影響を与えなかったものの、DXR 単独曝露時 24.0% まで低下した細胞生存率を、10  $\mu$ M DCA 後曝露は 37.1%、10  $\mu$ M CDCA 後曝露は 68.6% に上昇させ、DXR 感受性を低下させた (図 1)。統計学的有意差は認められなかったものの 10  $\mu$ M DCA 前曝露及び 10  $\mu$ M CDCA 前曝露も DXR 感受性を低下させる傾向が認められた。

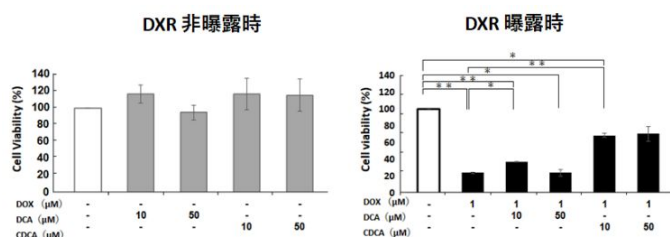


図1 胆汁酸 (DCA, CDCA) がヒト乳がん細胞株 MCF-7 の細胞増殖 (左) 及び抗がん剤 DXR 感受性に及ぼす影響 (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

これらの結果を踏まえ、胆管拘束がんモデルマウスを用いた *in vivo* 実験ではマウス乳がん細胞株 4T1 細胞を用いることとし、MCF-7 と同様のスケジュールにて細胞生存率への影響を検討した結果、MCF-7 と同様、DXR 非曝露時には DCA や CDCA は 4T1 の細胞生存率に大きな影響を与えず、DXR 曝露時には DXR 感受性を大きく低下させた (図 2)。

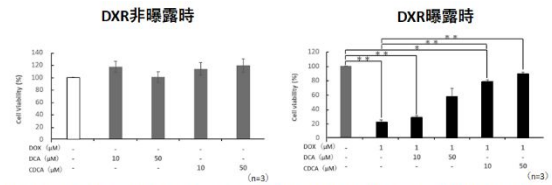
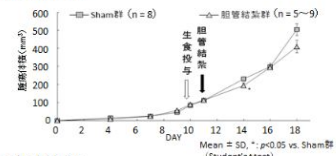


図2 胆汁酸 (DCA, CDCA) がマウス乳がん細胞株4T1の細胞増殖 (左) 及び抗がん剤DXR感受性に及ぼす影響(\*: p < 0.05, \*\*: p < 0.01)

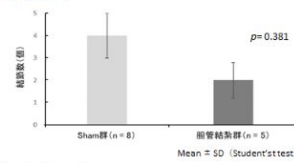
## (2) *In vivo* モデル動物による評価

4T1 細胞を移植した胆管拘束がんモデルマウスにおいて、胆管結紮群と sham 群とでは腫瘍体積 (図 3a) 肺結節数 (図 3b) 及び肺重量に有意な差は認められず、抗がん剤非曝露時には DCA 及び CDCA 曝露が細胞生存率に影響しなかった *in vitro* 実験 (図 1、図 2) と矛盾しない結果であった。但し、胆管結紮群 9 匹のうち 4 匹が死亡し、結紮群では胆管結紮後の体重が sham 群と比較して有意に低下したことから (図 3c)、今回用いた胆管結紮モデルはマウスへの負担が大きく、腫瘍増殖にもたらす胆汁うっ滞の影響を十分に評価できていない可能性もあるため、今後さらなるモデル改良による再検討が必要と考える。

### a) 腫瘍体積



### b) 肺結節数



### c) 体重変化率

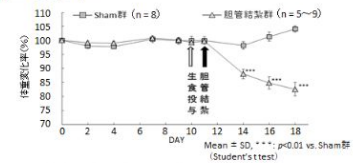


図3 胆管拘束がんモデルマウスにおける胆汁うっ滞状態の腫瘍増殖に与える影響

## (3) 胆汁酸のがん細胞増殖・薬剤感受性に影響を与える機序についての検討 (*in vitro*)

K562 を用いて DCA、CDCA 曝露時の COX-1、COX-2 及び BRE 遺伝子発現量の経時的変化を検討した結果、DCA 曝露は COX-2、CDCA 曝露は COX-1 及び BRE 遺伝子の経時的発現プロファイルを前にシフトさせる傾向が認められ、特に 50 μM CDCA の 72 時間曝露時の BRE 遺伝子発現量は control と比較して有意に増加した。COX-1 遺伝子は、DCA、CDCA の 48 時間及び 2 週間曝露で増加傾向を示したが、COX-2 mRNA に著変はなかった (図 4)。胆汁酸による細胞増殖促進や抗がん剤感受性低下には BRE 及び COX-1 が関与する可能性が示唆された。

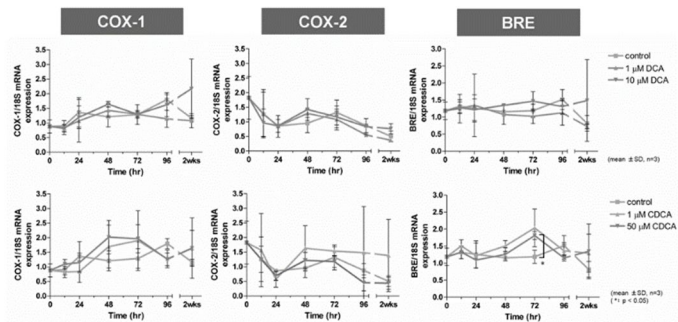


図4 DCAおよびCDCA曝露によるCOX-1、COX-2、BRE 遺伝子発現量の経時的変化

以上より、高濃度胆汁酸に晒される消化器がん以外のがん種において、臨床血中で変動・上昇し得る濃度、すなわち消化管内よりも低濃度の胆汁酸成分ががん細胞の増殖を促進させることが示された。さらに本研究では、この濃度レベルの胆汁酸が抗がん剤感受性を低下させることを初めて明らかにした。その影響は慢性骨髄性白血病細胞 K562、とくに乳がん細胞 MCF-7 で顕著であり、その影響は抗がん剤の種類、胆汁酸曝露濃度や曝露時間、また抗がん剤曝露とのタイミングによっても異なることが明らかとなった。K562 を用いた検討からは、本研究で検討した濃度レベルの胆汁酸では、これまでに高濃度胆汁酸による消化器がん細胞増殖促進作用への関与が報告されている COX-2 の発現量に変化は認められず、アポトーシスや CDDP 耐性との関与も

報告されている BRE 遺伝子発現量が上昇していたことから、血中胆汁酸濃度上昇時には COX-2 上昇以外の細胞増殖促進機序が働いていると考えられる。MCF-7 を用いた検討からは、胆汁酸成分である CDCA が抗がん剤曝露後の障害を受けたがん細胞の細胞増殖回復期に作用している可能性も新たに示唆されたことから、この点に着目しながら、血中で変動し得る濃度の胆汁酸ががん細胞に与える影響を明らかにするための機能解析を今後さらに継続する予定である。抗がん剤非存在下における胆汁酸の影響の一部は胆汁うっ滞モデル動物を用いた実験においても再現されたが、抗がん剤併用時の検討も含め、よりマウスにとってより負担の少ないモデルを用いたさらなる検討が必要である。

本研究により、消化器がん以外のがん種において、胆汁うっ滞時などに生じる臨床血液中での胆汁酸濃度上昇によって化学療法治療反応性が低下する可能性が示され、がん種や抗がん剤の種類によってもその影響が異なる可能性が示唆された。今後、さらに詳細について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Masatoshi, Karigane Daiki, Kasahara Hidenori, Matsuki Eri, Hashida Risa, Yamane Yusuke, Abe Ryohei, Koda Yuya, Toyama Takaaki, Kikuchi Taku, Kato Jun, Shimizu Takayuki, Yokoyama Yuta, Suzuki Sayo, Nakamura Tomonori, Okamoto Shinichiro, and Mori Takehiko	4. 巻 109
2. 論文標題 Renal dysfunction and anemia associated with long-term imatinib treatment in patients with chronic myelogenous leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 292-298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-019-02596-z	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 該当する

1. 著者名 鈴木小夜, 地引綾, 横山雄太, 河添仁, 中村智徳.	4. 巻 4
2. 論文標題 がん薬物治療と臨床試験におけるスペシャル・ポピュレーション.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医薬品安全性学（日本医薬品安全性学会会誌）	6. 最初と最後の頁 83-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suzuki Sayo, Hattori Yuki, Takagi Akinori, Aomori Tohru, Kasai Hidefumi, Nakamura Tomonori.
2. 発表標題 Meta-analytic population pharmacokinetic analysis to evaluate the effect of renal dysfunction on imatinib clearance in Japanese subjects.
3. 学会等名 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology 2017. (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水谷顕洋, 中村智徳, 林哲也, 武藤章弘, 齋藤義正, 齋藤英胤, 細山田真, 末岡浩, 小佐野博史, 小川郁, 佐藤卓美, 柴田洋孝, 加藤宏一, 落合高德, 田邊稔, 櫻井正寿, 岡本真一郎, 鈴木小夜, 大井一弥, 宮地勇人など	4. 発行年 2018年
2. 出版社 ネオメディカル	5. 総ページ数 1199
3. 書名 Principal Pharmacotherapy 改訂版	

〔産業財産権〕

