

令和元年6月17日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16576

研究課題名(和文) アクアポリン5発現解析に基づく新たな膵癌低浸透圧腹腔内パクリタキセル療法の開発

研究課題名(英文) Hypotonic stimulation enhances paclitaxel uptake into cancer cells via regulation of aquaporin

研究代表者

小菅 敏幸 (Kosuga, Toshiyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00457946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低浸透圧刺激によるヒト胃癌細胞株(MKN45)へのパクリタキセル(PTX)取り込み増強を確認した。PTXの膜輸送体(OATP1B3、MDR1)発現変化や、Rifampicin(OATP1B3の阻害薬)併用によるPTX取り込み変化を認めなかった。また、HgCl<sub>2</sub>(アクアポリン5(AQP5)阻害薬)併用あるいはAQP5-siRNAによりAQP5発現を下方制御することによるPTX取り込み変化を認めなかった。一方、低浸透圧刺激時にクロライドイオン輸送阻害薬のNPPBを併用すると、調節性細胞容積減少(RVD)の抑制とともに細胞内PTX取り込みの増強を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹腔内パクリタキセル投与は、難治性の胃癌・膵癌腹膜播種性転移に対する新たな治療選択肢の一つとして注目されているが、浸透圧・イオン輸送体・水輸送体制御による治療効果増強や、その分子生物学的・細胞生理学的メカニズムについての研究報告は存在しない。本研究は、低浸透圧刺激併用による腹腔内パクリタキセル投与療法という新しい治療概念を構築するとともに、クロライドイオン輸送阻害薬併用によるRVD抑制を介した低浸透圧細胞内PTX取り込み増強効果という全く新たな知見を明らかにしたという点で、学術的・社会的に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：At first, we confirmed that hypotonic stimulation enhanced paclitaxel (PTX) uptake into MKN45 cells (human GC cell line) with increasing their cell volume. The mRNA expressions of influx (OATP1B3) and efflux (MDR1) transporters for PTX were not changed by hypotonic stimulation, and the blockade of OATP1B1/3 with rifampicin did not affect hypotonicity-induced PTX uptake into GC cells; thus, hypotonic stimulation did not alter the expression and function of transporters for PTX. Next, we examined the influence of the expression and function of aquaporin 5 (AQP5) on hypotonicity-induced PTX uptake into GC cells. Neither the blockade of AQP5 with HgCl<sub>2</sub> nor the knockdown of AQP5 using AQP5-siRNA affected hypotonicity-induced cellular uptake of PTX. Meanwhile, the blockade of chloride transports with NPPB inhibited the occurrence of regulatory volume decrease (RVD), and significantly enhanced PTX uptake into GC cells.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌 アクアポリン 低浸透圧刺激 調節性細胞容積減少 パクリタキセル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腹腔内パクリタキセル (PTX) 投与は、消化器癌腹膜播種性転移に対する有効な治療法として注目されているが、浸透圧・イオン輸送体・水輸送体制御による治療効果増強や、その分子生物学的・細胞生理学的メカニズムについての研究報告は存在しない。

### 2. 研究の目的

本研究では、“水輸送体であるアクアポリン 5 (AQP5) 発現レベルにより、低浸透圧刺激時の癌細胞内への PTX 取り込みが異なる”という実験仮説の検証を行う。その結果から、“AQP5 制御を介した低浸透圧併用の腹腔内 PTX 投与療法”という、消化器癌腹膜播種性転移の制御に対する斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み変化の解析

ヒト胃癌細胞株 (MKN45) を低浸透圧下に蛍光標識された PTX (Flutax-2: Oregon green 488 PTX) で処理し、細胞内への PTX 取り込み、細胞外への PTX 排出をプレートリーダーや蛍光顕微鏡にて測定する。また、浮遊癌細胞への PTX 取り込みをフローサイトメトリーで解析する。

#### (2) 低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み増強のメカニズム解析

低浸透圧刺激による、PTX 取り込みまたは排出に關与する膜輸送体 (取り込み: OATP1B3、排出: MDR1) の mRNA 発現変化を解析する。また、OATP1B1/3 の阻害剤である Rifampicin を併用した際の、低浸透圧下細胞内 PTX 取り込み変化を解析する。

#### (3) AQP5 阻害薬・発現制御による細胞内 PTX 取り込み変化の解析

AQP5 阻害薬の HgCl<sub>2</sub> を併用した際の、低浸透圧下細胞内 PTX 取り込み変化を解析する。また、胃癌細胞株に AQP5-siRNA をトランスフェクションして AQP5 発現を下方制御した際の、低浸透圧下細胞内 PTX 取り込み変化を解析する。

#### (4) イオン輸送制御による細胞内 PTX 取り込み変化の解析

クロライドイオン (Cl<sup>-</sup>) 輸送阻害薬の NPPB を併用した際の、低浸透圧下細胞内 PTX 取り込み変化を解析する。

### 4. 研究成果

まず、接着状態のヒト胃癌細胞株 (MKN45) を低浸透圧下 (1/2 浸透圧) に Flutax-2 で処理し細胞内 PTX 取り込みを測定したところ、等浸透圧に比し低浸透圧下で細胞内 PTX 取り込みが増強することを確認した (図 1)。

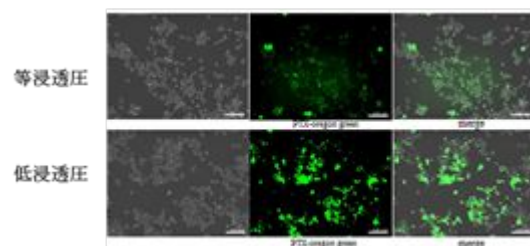


図 1 低浸透圧刺激下の細胞内 PTX 取り込み増強 (接着細胞: 蛍光顕微鏡)

また、浮遊状態での 1 細胞当たりの細胞内 PTX 取り込みを解析したところ、低浸透圧刺激 (1/2 浸透圧) により細胞内 PTX 取り込みが増強することを確認した (図 2)。

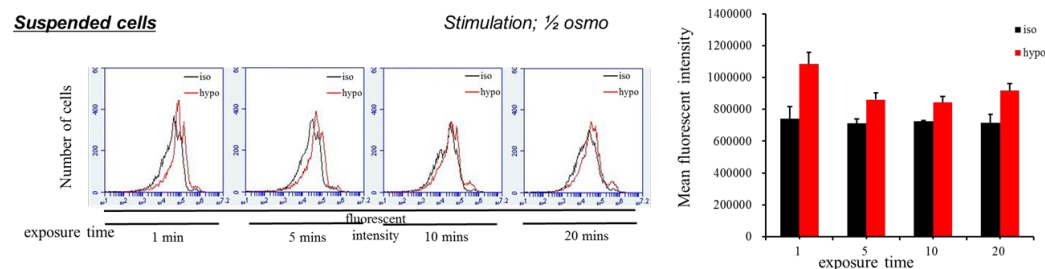


図 2 低浸透圧刺激下の細胞内 PTX 取り込み増強 (浮遊細胞: フローサイトメトリー)

次に、低浸透圧刺激による細胞内 PTX 取り込み増強のメカニズムを解析するため、PTX の膜輸送体である OATP1B3、MDR1 の mRNA 発現を解析したが、低浸透圧刺激 (1/2 浸透圧) による遺伝子発現変化は認めなかった (図 3)。また、Rifampicin 併用による細胞内 PTX 取り込みの違い

も認めなかった(図3)。したがって、低浸透圧刺激に伴うPTX細胞内取り込み増強は、PTX膜輸送体の発現・機能亢進によるものではなく、脂質二重層を介して生じた可能性が高いと考えられた。

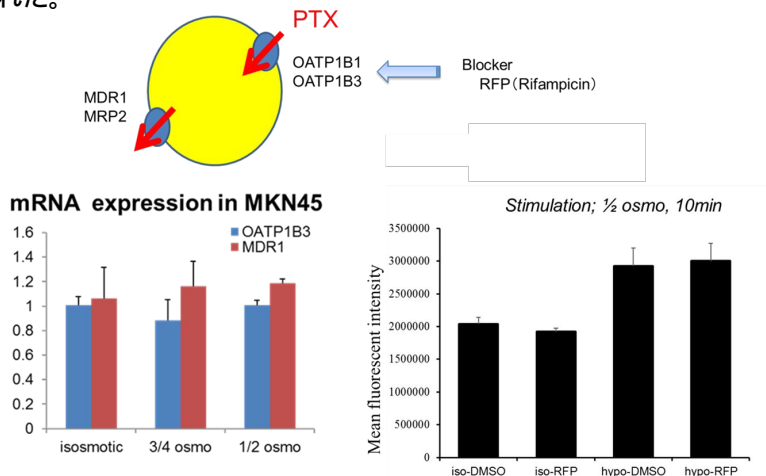


図3 低浸透圧刺激によるPTX膜輸送体の発現・機能変化

続いて、AQP5阻害薬・発現制御による低浸透圧刺激時(1/2浸透圧)の細胞内PTX取り込み変化の解析を行った。AQP5阻害薬であるHgCl<sub>2</sub>を併用した際、低浸透圧細胞内PTX取り込みに変化を認めなかった(図4)。また、AQP5-siRNAを用いてMKN45のAQP5発現を下方制御した際にも、低浸透圧細胞内PTX取り込みに変化を認めなかった(図4)。これらの結果からは、今回の実験仮説である“AQP5の発現・機能制御による低浸透圧細胞内PTX取り込み変化”は確認できなかった。

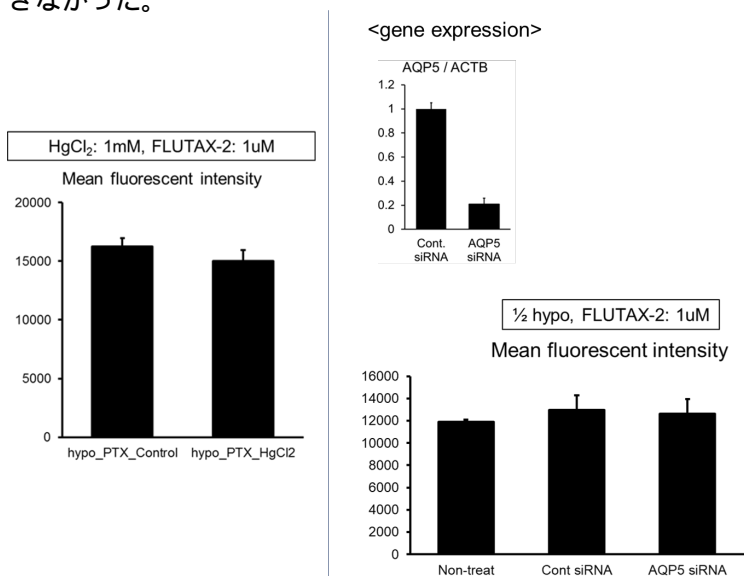


図4 AQP5阻害薬・発現制御による低浸透圧細胞内PTX取り込み変化

一方で、Cl<sup>-</sup>輸送阻害薬のNPPBを併用した際、調節性細胞容積減少(Regulatory volume decrease: RVD)の抑制とともに細胞内PTX取り込みの増強を認めた(図5)

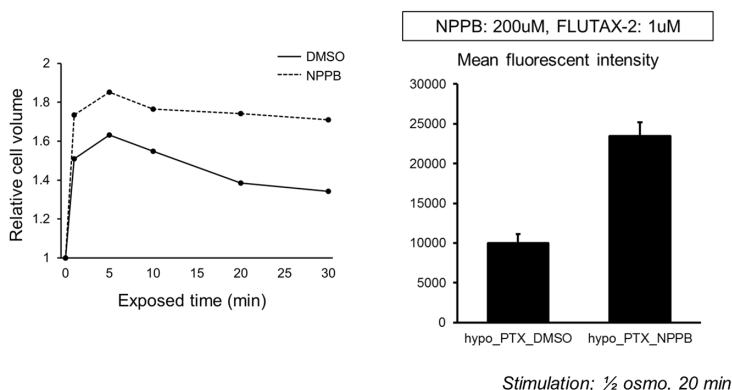


図5 Cl<sup>-</sup>輸送阻害併用による細胞容積変化と細胞内PTX取り込み変化

以上、実験仮説であった“ AQP5 発現レベルによる低浸透圧細胞内 PTX 取り込みの違い ”は確認できなかったものの、“ Cl<sup>-</sup> 輸送阻害薬による RVD 抑制を介した低浸透圧細胞内 PTX 取り込み増強効果 ”という新しい知見を得た。これらの研究結果については、現在英文雑誌への投稿準備中である。

研究期間中、同時に低浸透圧細胞破壊療法の基礎的検討も進め、ヒト胃癌細胞株において、カリウムチャネル阻害薬併用による低浸透圧細胞増強効果を *in vitro*、*in vivo* 両実験系で明らかにした (Oncotarget. 2017)。また、消化器癌における AQP1 (Oncotarget. 2018)、CLIC1 (Oncotarget. 2018)、AE2 (Oncotarget. 2018)、NIS (Gastric Cancer. 2019) などの細胞生理学的因子の機能解析・臨床病理学的意義を明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- (1) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. Functional analysis and clinical significance of sodium iodide symporter expression in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2019;22(3):473-485. 査読有, doi: 10.1007/s10120-018-0874-2.
- (2) Yamazato Y, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Aquaporin 1 suppresses apoptosis and affects prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(52):29957-29974. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.25722.
- (3) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. Anion exchanger 2 suppresses cellular movement and has prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(40):25993-26006. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.25417.
- (4) Kobayashi T, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Chloride intracellular channel 1 as a switch among tumor behaviors in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(33):23237-23252. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.25296.
- (5) Kosuga T, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Blockade of potassium ion transports enhances hypotonicity-induced cytotoxic effects in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017;8(60):101394-101405. 査読有, doi: 10.18632/oncotarget.20736.
- (6) Kudou M, Shiozaki A, Kosuga T, et al. Heat shock exerts anticancer effects on liver cancer via autophagic degradation of aquaporin 5. *Int J Oncol*. 2017; 50: 1857-1867. 査読有, doi: 10.3892/ijo.2017.3940.
- (7) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. Regulation of osmolality for cancer treatment. *J Physiol Sci*. 2017; 67: 353-360. 査読有, doi: 10.1007/s12576-017-0528-x.

[学会発表](計27件)

- (1) 山里有三、塩崎敦、小菅敏幸ら。胃癌におけるカリウムイオンチャネル阻害剤による低浸透圧細胞増強効果。日本胃癌学会。2018。
- (2) 葛原啓太、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道癌幹細胞に高発現する TRPV2 を標的とした新たな治療方法の開発。日本外科学会。2018年。
- (3) 松本順久、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の発現意義。日本外科学会。2018年。
- (4) 山里有三、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における Aquaporin 1 の発現機能。日本外科学会。2018年。
- (5) 小林利行、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における CLIC1 の発現意義と機能解析。日本外科学会。2018年。
- (6) 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道癌における Leucine-Rich Repeat-Containing protein 8A (LRRC8A) 発現の臨床的意義について。日本外科学会。2018年。
- (7) 満田雅人、塩崎敦、小菅敏幸ら。胃癌細胞の低浸透圧下調節性容積減少に及ぼす温度の影響。日本外科学会。2018年。
- (8) 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における LRRC8A の発言と機能について。日本癌学会。2018年。
- (9) 小林利行、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の発言意義。日本癌学会。2018年。
- (10) 松本順久、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における CLIC1 発現と役割。日本癌学会。2018年。
- (11) 満田雅人、塩崎敦、小菅敏幸ら。食道扁平上皮癌における AQP1 の役割。日本癌学会。2018年。
- (12) 塩崎敦、小菅敏幸、大辻英吾ら。胃癌における sodium iodide symporter (NIS) の発現・機能解析。日本癌学会。2018年。
- (13) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら。低浸透圧刺激による細胞容積制御を介した胃癌細胞パクリタキセル取り込み増強効果。日本癌学会。2018年。
- (14) 山里有三、塩崎敦、小菅敏幸ら。胃癌細胞における低温刺激がもたらす細胞容積変化への影響。日本癌学会。2018年。

- (15) 満田雅人、塩崎敦、小菅敏幸ら．胃癌細胞における低温刺激がもたらす Regulatory Volume Decrease (RVD) への影響．日本消化器外科学会．2018年．
- (16) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら．肝癌における温熱刺激による Aquaporin5 制御を介した抗腫瘍効果．日本外科学会．2017年．
- (17) 有吉重輔、塩崎敦、小菅敏幸ら．胃癌における sodium iodide symporter(NIS)の機能とその臨床病理学的意義．日本外科学会．2017年．
- (18) 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道癌における anion exchanger 1(AE1)の発現と役割．日本外科学会．2017年．
- (19) 小林利行、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道扁平上皮癌における CLIC1 (Chloride Intracellular Channel-1) 発現の意義．日本外科学会．2017年．
- (20) 山里有三、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道扁平上皮癌における Aquaporin1 発現の臨床病理学的意義．日本外科学会．2017年．
- (21) 有吉重輔、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道癌における sodium iodide symporter の発現とその意義．日本癌学会．2017年．
- (22) 小林利行、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道扁平上皮癌における CLIC1(Chloride Intracellular Channel-1)の発現と役割．日本癌学会．2017年．
- (23) 小西智規、塩崎敦、小菅敏幸ら．胃癌における NIS の発現と機能．日本癌学会．2017年．
- (24) 工藤道弘、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道癌幹細胞のイオン輸送体を標的とした治療法の開発．日本癌学会．2017年．
- (25) 山里有三、塩崎敦、小菅敏幸ら．食道扁平上皮癌における Aquaporin1 の発現と予後との検討．日本癌学会．2017年．
- (26) 小菅敏幸、塩崎敦、大辻英吾ら．胃癌におけるカリウムイオン輸送遮断による低浸透圧殺細胞増強効果．日本癌学会．2017年．
- (27) 塩崎敦、小菅敏幸、大辻英吾ら．食道扁平上皮癌における Anion Exchanger 2 の発現・機能解析．日本癌学会．2017年．

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。