

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07198

研究課題名（和文）新規抗がん剤開発を目指したcSBLの抗腫瘍効果解析

研究課題名（英文）Analysis of the antitumor effect of cSBL for the development of new anticancer drug

研究代表者

立田 岳生（Tatsuta, Takeo）

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70438563

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）：膀胱がんに対する cSBL の効果の解析を行った結果、cSBL の有効性が認められ、他の薬剤と比較してもがん細胞選択性などの点で有効な知見が得られた。また、cSBL の耐性細胞と親株を比較した網羅的遺伝子解析を介し、がんの悪性度や耐性に関与するABCトランスポーターの発現を cSBL が減少させることや、ドキソルビシンなどの耐性に関与すると報告のある AKR1B10 の発現上昇を cSBL が抑制することなどを見出した。さらに、cSBL が強い c-Jun の活性化を引き起こすことが明らかになり、cSBLの抗腫瘍作用にその活性化が重要な役割を持つ可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、有効な新規治療薬が望まれている膀胱がんに対する cSBL の有効性が示された。また悪性中皮腫を用いた研究では、cSBL の抗腫瘍作用機序の解明が進んだ他、多剤耐性に関わる分子の発現を cSBL が抑制することが見出された。これは、がんの耐性化や悪性化といった現行のがん治療おける課題を、cSBL を用いることにより克服できる可能性を示すものである。したがって、既存のがん療法に cSBL を加えることにより新しい選択肢を与える可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：An analysis of the effects of cSBL on bladder cancer demonstrated its effectiveness, with advantages in terms of cancer cell selectivity compared to other drugs. Comprehensive genetic analysis comparing cSBL-resistant cells with the parent cell line revealed that cSBL reduces the expression of ABC transporters, which are involved in cancer malignancy and resistance, and suppresses the increased expression of AKR1B10, known to contribute to resistance to doxorubicin and other drugs. Additionally, it was found that cSBL induces strong activation of c-Jun, suggesting that this activation may play an important role in the antitumor action of cSBL.

研究分野：生化学

キーワード：リボヌクレアーゼ アポトーシス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボヌクレアーゼは、あらゆる生物に存在し RNA の成熟などに重要な酵素であるが、一部のリボヌクレアーゼは、抗菌、抗ウイルスあるいは抗腫瘍作用を有する。抗腫瘍性リボヌクレアーゼは、“RNA を標的とする”という新しい機序による抗腫瘍活性と高いがん細胞選択性を示すことがわかっている。また、RNA を標的とする利点として、従来の DNA 障害型薬剤や放射線治療と異なり遺伝毒性がないことや、リボヌクレアーゼが熱やプロテアーゼに対する高い安定性を持つことが示されており血中での安定性も期待できることなどが挙げられる。これらのことからリボヌクレアーゼは新規抗がん剤候補として期待されている。

本研究室で発見された *Rana catesbeiana* 由来シアル酸結合性レクチン (cSBL) は、リボヌクレアーゼ活性とレクチン活性を併せ持つ多機能性タンパク質であり “Leczyme (Lectin + enzyme)” とも呼ばれている。我々はこれまで、cSBL が多種類のがんに細胞毒性を示すが正常細胞への毒性は低いこと¹⁾、TRAIL や Pemetrexed などと相乗的な抗腫瘍効果を示し、がん細胞選択性や他の薬剤との相乗性は既存の薬剤と比較しても優れていること^{2,3)}、Xenograft モデルを用いた *in vivo* 実験においても抗腫瘍効果を示すことなどを明らかにしてきた⁴⁾。これらの研究により cSBL が新規抗がん剤候補になる可能性が示されたが、一方で、安全で効果的な臨床への応用には、その作用機序のさらなる解明が不可欠であった。cSBL の抗腫瘍作用について、これまでに明らかにされた作用機序は以下の通りである。(1) cSBL が細胞表面に結合し、(2) 細胞内に移行後、(3) 細胞内 RNA が分解され、(4) ミトコンドリア障害あるいは小胞体ストレスが引き金となりアポトーシスシグナルが誘導される。上記機序は、これまでに無い新しいメカニズムである一方、不明な点も多くあった。

2. 研究の目的

上記の通り、cSBL の抗腫瘍作用機序に関して不明な点が多くある。本研究は、新規抗がん剤候補である cSBL の可能性を特に安全面・効率面でさらに追求するため、その作用機序を明らかにすること、および cSBL の効果を最大限に利用する他の薬剤との併用などの検討を目的とした。また cSBL の有効性検討のために、これまでに cSBL の効果が調査されていないがん腫に対する cSBL の抗腫瘍効果についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) cSBL の膀胱がん細胞に対する抗腫瘍効果

正常膀胱粘膜由来細胞 (HCV29)、非浸潤性膀胱がん細胞 (KK47 および RT4) ならびに浸潤性膀胱がん細胞 (YTS-1 および YTS-3) を対象に WST 法により細胞生存率を測定した。各細胞は cSBL の他、膀胱がんの既存治療薬である cisplatin または gemcitabine で処理し、その生存率から IC₅₀ 値を、さらにがん細胞選択性の指標として Relative sensitivity (RS) 値 (RS = IC₅₀ normal cells / IC₅₀ cancer cells) を算出した。

(2) 悪性中皮腫 H28 細胞およびその cSBL 耐性株を用いた ATP binding cassette transporter C2 (ABCC2) の発現解析。

H28 細胞および cSBL 耐性細胞 (cSR-A1 および B10) を対象として実験を行った。ABCC2 の発現はウェスタンブロット法により測定した。細胞は cSBL の他、悪性中皮腫の治療薬である cisplatin または pemetrexed で処理し、各条件下における ABCC2 の発現を比較した。

(3) cSR 細胞における Aldo-keto reductase 1B10 (AKR1B10) の発現解析

AKR1B10 低発現 cSR 細胞において、doxorubicin 処理により AKR1B10 の発現に変化が起こるか否か、およびそれに対する cSBL の影響を調査した。cSR-A1 および B1 細胞をそれぞれ doxorubicin および cSBL で処理し、AKR1B10 の発現をウェスタンブロット法により観察した。

4. 研究成果

(1) cSBL は膀胱がんに対しても抗腫瘍効果を示し、既存薬剤と比較しても高いがん細胞選択性を示す。

各細胞に対する cSBL, cisplatin および Gemcitabine の細胞毒性を WST-8 法により測定し、細胞生存率の容量反応曲線で示した結果、いずれの薬剤においても濃度依存的な細胞毒性が認められた。各細胞の反応をより詳細に分析するため、IC₅₀ 値を算出した (Table 1)。cSBL に対しては、KK47 (IC₅₀; 0.09 μM) が高い反応性を示し、HCV29 (IC₅₀; 11.08 μM) が一番低い反応性を示した。Cisplatin に対しては、RT4 (IC₅₀; 3.31 μM) が高い反応性を、YTS-1 が (IC₅₀; 14.80 μM) 低い反応性を示し、HCV29 の IC₅₀ 値は 10.97 μM と用いた細胞の中では中程度であった。Gemcitabine でも cisplatin と同様に、RT4 (IC₅₀; 0.01 μM) が高い反応性を示し YTS-1 (IC₅₀; 5.23 μM) が低い反応性を示した。HCV29 の IC₅₀ 値は 0.08 μM となり比較的高い感受性を示した。細胞選択性の指標として、RS を算出した結果、cSBL はいずれのがん細胞に対しても 1 < の RS 値、すなわちがん細胞に対する選択性を示し、特に KK47 で 120.50 と高いがん細胞選

拮抗性が示された (Table 2). 一方, cisplatin では YTS-1 に対する RS は 0.74 となり, むしろ正常組織由来細胞と比較して抵抗性が見られ, 一番高い RS 値でも RT4 の 3.32 であった. Gemcitabine でも 4 種のがん細胞中 3 種で $1 >$ の RS が示され, 特に, KK47 (RS; 0.03) および YTS-1 (RS; 0.02) で低かった. 今回の実験結果から cSBL は膀胱がんに対しても抗腫瘍効果があり, 選択性高いことが示された. Cisplatin および gemcitabine と比較しても抗腫瘍効果, 選択性が上回っていることより膀胱がんの治療に今後応用できる可能性があると考えられる.

Table 1. IC₅₀ values (μM) of cSBL, cisplatin and gemcitabine against bladder cells

Drugs	HCV29	KK47	YTS1	YTS3	RT4
cSBL	11.08 (3.28 - 37.36)	0.09 (0.05 - 17)	1.64 (0.62 - 4.32)	3.08 (2.37 - 4.00)	5.33 (2.24 - 12.66)
Cisplatin	10.97 (8.01 - 14.93)	8.93 (7.04 - 11.32)	14.80 (11.23 - 19.50)	8.22 (6.35 - 10.65)	3.31 (2.28 - 4.80)
Gemcitabine	0.08 (0.05 - 0.14)	2.38 (1.27 - 4.47)	5.23 (2.43 - 11.20)	0.78 (0.41 - 1.48)	0.01 (0.003 - 0.034)

The 95% confidence intervals for each IC₅₀ value are shown in parentheses.

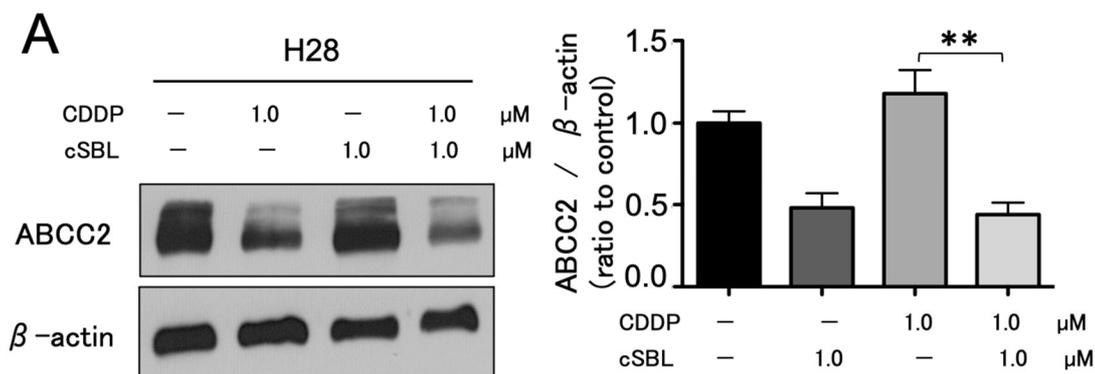
Table 2. RS of cSBL, cisplatin, and gemcitabine against bladder cells

Drugs	HCV29	KK47	YTS1	YTS3	RT4
cSBL	1.00	120.50	6.77	3.60	2.08
Cisplatin	1.00	1.23	0.74	1.33	3.32
Gemcitabine	1.00	0.03	0.02	0.10	7.75

The RS value was calculated as the IC₅₀ value of each agent in HCV29 cells divided by the IC₅₀ value of each cancer cell lines.

(2) cSBL は ABCC2 の発現を減少させる.

これまでに, 悪性中皮腫 H28 細胞を cSBL で持続処理することで, cSBL 耐性(cSR)細胞を樹立し, 得られたクローン株を用いたマイクロアレイ解析の結果から, ATP binding cassette transporter C2 (ABCC2)の発現がcSR細胞で低下していることを見出した.⁵⁾今回, ABCC2の発現をタンパク質レベルで確認し, H28細胞に比べてcSR細胞細胞におけるそれぞれの発現が低下すること, また, H28細胞にcSBLを72時間処理した際も濃度依存的なABCC2の発現低下傾向が観察されることを明らかにした. また, 昨今, 低分子抗がん剤などにより薬剤耐性に寄与するABCトランスポーターの過剰発現が引き起こされることが現行のがん治療で問題となっている. 今回, H28細胞においてもcisplatinおよびpemetrexed処理によりABCC2の発現が上昇するか否か, またそれら薬剤処理時にcSBLを共存させた場合のABCC2の発現について検討した. その結果, ABCC2の発現は, それぞれの抗がん剤により増加傾向が見られた一方, cSBL単独または各薬剤と共処理した際には, ABCC2の発現はコントロールに対しておよそ0.4倍~0.5倍に低下した (Fig. 1).



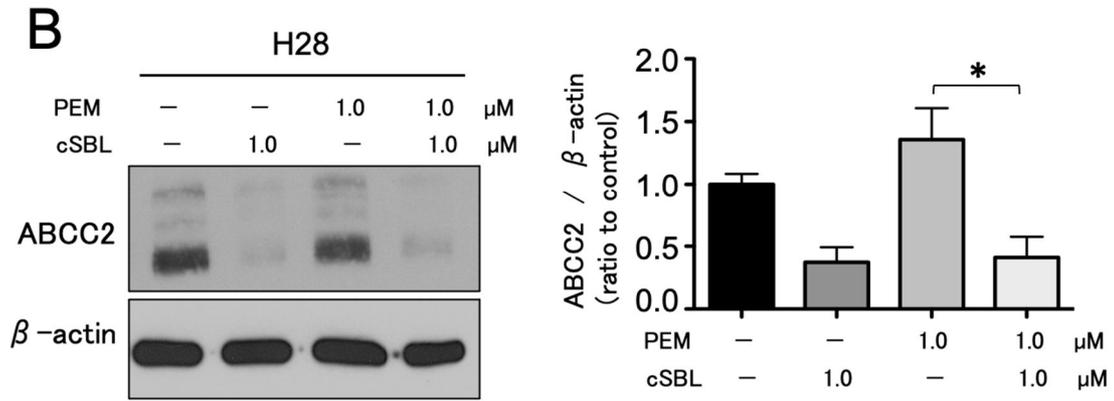


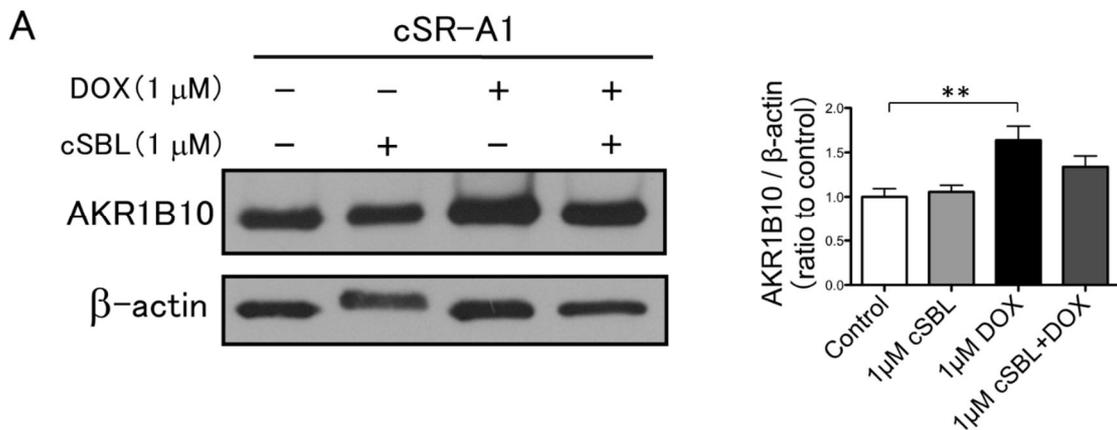
Fig. 1. ABCC2 expression analysis in CDDP, PEM and/or cSBL-treated H28 cells
 H28 cells were treated with CDDP and/or cSBL for 72 hours (A), and PEM and/or cSBL for 72 hours (B). Whole cell extracts were subjected to western blotting with anti-ABCC2 and β -actin antibodies. Densitometric quantification is performed using the results of at least three independent experiments (mean \pm SD). ** $P < 0.01$.

これらのことから cSBL は抗がん剤処理時においても ABCC2 の発現を著しく低下させることが明らかとなった。したがって cSBL を薬剤耐性がんに対して用いたり、ABC トランスポーターの過剰発現を誘導する薬剤と併用したりする薬剤療法が、現行の治療法の問題点を克服する新たながん治療戦略となる可能性があると考えられる。

(3) cSBL は doxorubicin 誘導性の AKR1B10 の発現上昇を抑制する

これまでの研究で我々は、cSR 細胞における AKR1B10 の発現レベルが H28 と比較して mRNA およびタンパク質レベルで大幅に減少することを明らかにしている。⁵⁾ AKR1B10 は、非小細胞肺癌、肝がん、子宮がん、膵がんおよび乳がんなどで高発現することが確認されており、新規バイオマーカーとして注目されている他、cisplatin, mitomycin C および doxorubicin などの抗がん剤によって発現が上昇し、薬剤耐性の獲得に関与していることも示唆されている。

本研究では、AKR1B10 の発現が低下している cSR を用い、DOX によりその発現上昇が起こるか否か、およびそれに対する cSBL の影響とその発現変化のメカニズムについて調査を行った。その結果 A1 細胞では doxorubicin 処理により約 1.7 倍に有意に上昇した一方、cSBL 共処理では約 1.3 倍となり、A1 での発現に対し有意差は認められなかった。B1 でも同様に doxorubicin 処理により約 1.4 倍に上昇した一方、cSBL 共処理では約 1.1 倍に留まり、doxorubicin 誘導性の発現上昇が抑制される結果となった (Fig. 2)。



B

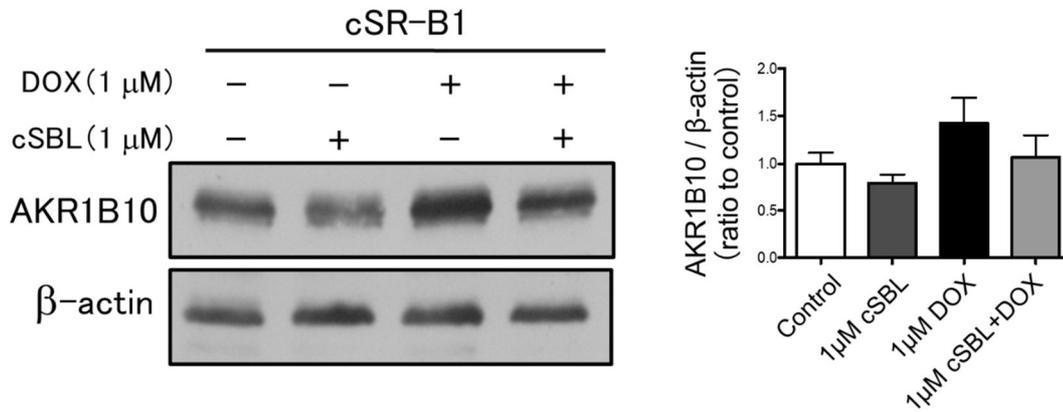


Fig. 1. AKR1B10 expression analysis in DOX and/or cSBL-treated cSR cells

A1 (A) and B1 (B) cells were treated with DOX and/or cSBL for 72 hours. Whole cell extracts were subjected to western blotting with anti-AKR1B10 and β -actin antibodies. Densitometric quantification is performed using the results of at least three independent experiments (mean \pm SD). ** $P < 0.01$.

このことから、cSBL は doxorubicin 処理によって誘導される AKR1B10 の発現上昇を抑制する可能性が示された。またその作用機序解析の結果からは、cSBL による JNK の活性化を介した c-Jun の活性化が、AKR1B10 の発現抑制に関与していることが示された。さらに、この発見を契機に、cSBL は c-Jun の活性化を強く誘導するシグナルを誘導することが明らかになり、その上流にはストレスキナーゼが関与することが示唆されるデータが得られている。これは cSBL が誘導するアポトーシスにおいて、ミトコンドリア障害の上流に位置するシグナルに関与すると考えられた。これらは、これまでに明らかにならなかった cSBL の抗腫瘍作用機序の一旦を明らかにするものとなった。

<引用文献>

- 1) Tatsuta T., Sugawara S., Takahashi K., Ogawa Y., Hosono M., Nitta K., *Biomed Res. Int.*, **2014**, 421415 (2014).
- 2) Tatsuta T., Hosono M., Takahashi K., Omoto T., Kariya Y., Sugawara S., Hakomori S., Nitta K., *Int. J. Oncol.*, **44**, 377-384 (2014).
- 3) Satoh T., Tatsuta T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *Oncotarget*, **8**, 42466-42477 (2017).
- 4) Tatsuta T., Satoh T., Sugawara S., Hara A., Hosono M., *PLoS One*, **13**, 1-15 (2018).
- 5) Tatsuta T., Nakasato A., Sugawara S., Hosono M., *Mol. Med. Rep.*, **23**, (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Tatsuta Takeo, Ito Jun, Yamamoto Koji, Sugawara Shigeki, Hosono Masahiro, Sato Makoto, Miyagi Taeko	4. 巻 12
2. 論文標題 Sialidase NEU3 Contributes to the Invasiveness of Bladder Cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 192 ~ 192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines12010192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ito Jun, Sugawara Shigeki, Tatsuta Takeo, Hosono Masahiro, Sato Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Catfish Egg Lectin Enhances the Cytotoxicity of Sunitinib on Gb3-Expressing Renal Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2317 ~ 2317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11082317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fonseca Leonardo Marques da, Tatsuta Takeo, Park Seung-Yeol, Freire-de-Lima Leonardo	4. 巻 13
2. 論文標題 Editorial: Drug-resistance in cancer cells: A new wine in an old bottle	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2023.1161008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tatsuta Takeo	4. 巻 142
2. 論文標題 Basic Research on Bullfrog Egg-derived Sialic Acid-binding Lectin for Cancer Treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.22-00116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 T. Tatsuta, A. Nakasato, S. Sugawara, M. Hosono	4. 巻 23
2. 論文標題 Transcriptomic alterations in malignant pleural mesothelioma cells in response to long-term treatment with bullfrog sialic-acid binding lectin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2021.12106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 T. Tatsuta, M. Hosono	4. 巻 39
2. 論文標題 Discovery of antitumor effects of leczymses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconj. J.	6. 最初と最後の頁 157-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-021-10033-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 菅原 栄紀, 菊地聡大, 立田岳生, 細野雅祐
2. 発表標題 HeLa細胞におけるナマズ卵レクチンの細胞内輸送機構の解明
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊地聡大, 菅原 栄紀, 叶 江利花, 立田 岳生, 細野 雅祐
2. 発表標題 細胞内膜系Gb3 は抗がん剤によるアポトーシスに関与する
3. 学会等名 第16回東北糖鎖研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里 ありす, 立田 岳生, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞およびそのRNase 耐性細胞における ABC トランスポーターの発現に対する cSBL の影響
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 彬翔, 立田 岳生, 田口有里佳, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
2. 発表標題 AKR1B10 に対する cSBL の効果とそのメカニズムの調査
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中里 ありす, 立田 岳生, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞における多剤耐性輸送体への cSBL の影響
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原栄紀, 菊地聡大, 立田岳生, 細野雅祐
2. 発表標題 Gb3分子種によるナマズ卵レクチンのがん細胞に対する多様な効果
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeo Tatsuta
2. 発表標題 Research on a leczyne as a candidate of novel anticancer drug
3. 学会等名 第2回 東北医科薬科大学・台湾アカデミアシニカ合同シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立田 岳生, 佐藤 祥子, 菅原 栄紀, 細野 雅祐,
2. 発表標題 cSBL誘導性EGFR発現減少のメカニズム解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 cSBLのAKR1B10発現抑制効果とJNK経路の関与
2. 発表標題 佐藤 彬翔, 立田 岳生, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 立田岳生、菅原栄紀、細野雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞のウシガエル卵由来シアル酸結合レクチン処理におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中里ありす、立田岳生、菅原栄紀、細野雅祐
2. 発表標題 確立された RNase 耐性がん細胞における AKR1B10 と ABCC2 の発現に対する cSBL の影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立田岳生、中里ありす、菅原栄紀、伊藤淳、佐藤信、細野雅祐
2. 発表標題 膀胱がん細胞に対するcSBL の抗腫瘍効果について
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立田岳生
2. 発表標題 がん治療への応用を目指したウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン(cSBL) の基礎研究
3. 学会等名 第43回東北薬学セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立田岳生、中里ありす、佐藤彬翔、菅原栄紀、細野雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫細胞に発現するAKR1B10およびABCC2に対するcSBLの効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takeo Tatsuta and Masahiro Hosono	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 23
3. 書名 Glycosignals in Cancer-Molecular assembly and recognition "Effects of Bullfrog sialic acid-binding lectin in cancer cells"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Frontiers in Oncology Research Topic https://www.frontiersin.org/research-topics/31721/drug-resistance-in-cancer-cells-a-new-wine-in-an-old-bottle

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

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