

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659278

研究課題名（和文）腸管免疫を指標とした抗がん剤の副作用予測とその評価法の開発

研究課題名（英文）The development of the side effect prediction of the anticancer agent which assumed intestinal tract immunity an index and the rating system

研究代表者

井関 健（ISEKI KEN）

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40203062

研究成果の概要（和文）：

抗がん剤ががん患者に与えるリスクを免疫活性の観点から提示するための評価系を確立するため、ヒト小腸株化細胞を用いて、経口抗がん剤処理後の α -defensin mRNA 発現変動を測定することによって腸管免疫への影響を評価した。抗がん剤暴露によって、腸管免疫の指標とした defensin 5 および 6 発現は低下した。また同時に、サイトカインの発現に及ぼす影響についても検討を行い、IL-8 および IL-1 β の発現上昇を確認した。さらに、がん患者においてはサプリメントの使用が多く見られるため、日常摂取される食品機能性成分との併用時のリスクを評価し、抗酸化成分が抗がん剤による腸管免疫低下を回復する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We detected HD-5 and HD-6 mRNA in Caco-2 cells and evaluated the effects of an oral anticancer drugs. HD-5 and HD-6 mRNA levels were decreased by exposure of tegafur. Moreover, the decrease of the HDs mRNA levels were associated with the increase of IL-1 and IL-8 by tegafur. In addition, we clarified antioxidant materials suppressed the expression of α -defensins induced by FT at the transcriptional level in Caco-2 cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：がん化学療法，相互作用，腸管免疫， α -ディフェンシン，食品素材，経口抗がん薬

1. 研究開始当初の背景

がんは日本の死亡原因の第一位を占めており、今後も、がん患者の数は増加の一途を辿ることが予想される。また、近年の医療費の増大傾向や患者のQOL向上に対する意識の変

化からもがん治療における問題は山積している。特に、抗がん剤の副作用に関しては、治療効果が優先とされてきたため未だ途上過程にある。代表的な副作用として知られる、白血球減少、吐き気・嘔吐については、現在、

GSF製剤や制吐剤の使用で飛躍的に改善したが、未然に防ぐ取組みについてはほとんどなされていない。

近年インターロイキンおよびINF- γ などのサイトカインに代わる新しい腸管免疫の指標として、小腸パネート細胞から分泌される抗菌ペプチド、 α -defensinが注目を浴びている。しかしながら、このペプチドを用いた免疫機能評価法はまだ確立されていない。本研究では、抗がん剤における副作用発現の事前回避を目的として、腸管免疫物質を指標とした評価法の構築を行った。

2. 研究の目的

抗がん剤がもたらす生体へのダメージは多大であり、事前の副作用回避が治療の効果発現には不可欠である。本研究では抗がん剤が、がん患者に与えるリスクを免疫活性から科学的根拠に基づいて提示するとともに、確立された評価法を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Caco-2細胞

ヒト結腸癌由来Caco-2細胞を継代数45-60で使用した。Caco-2細胞の培養は、D-MEMに10% (v/v) FBS、0.1mM NEAA、2 mM L-グルタミン、100 IU/mL ペニシリン-100ng/mL ストレプトマイシンを添加した培養液を用い、37°C-5% CO₂下で行った。

(2) Total RNA 抽出

Caco-2細胞1×10⁵ cells/mL懸濁液を調製後、6 wellプレート (coster) に2 mL/wellずつ播種し、37°C -5% CO₂ インキュベーター内でコンフルエントとなるまで培養を行った。その後、テガフルおよび食品成分を添

加し、規定の時間細胞に接触させた。テガフルおよび食品成分処理後、培養液を吸引し氷冷したPBSを加えた。セルスクレーパーにより細胞をかきとり、遠心分離 (1,500×g, 5 min, 4°C) により細胞を回収した。回収した細胞を氷冷したPBSで洗浄後、ISOGEN® 0.5 mLに溶解させた。ISOGEN溶液に chloroform 0.2 mLを加え、15秒間激しく転倒混和し、室温で3分間静置した。遠心分離 (12,000×g, 15 min, 4°C) により得られた上清に2-propanol 0.5 mLを加え、室温で約5分間静置した。その後、遠心分離 (12,000×g, 10 min, 4°C) により沈殿を回収し、70% ethanol 1 mLを加えた。遠心分離 (7,500×g, 10 min, 4°C) を行い、沈殿した total RNA を乾燥後、RNase free water (DEPC-treated water) に溶解させた。

(3) 逆転写反応

逆転写反応は、ReverTra Aceを用い、得られた total RNA 5 μ g について逆転写反応を行い cDNA を合成し、Real-time PCR のテンプレート DNA として用いた。なお、逆転写反応には iCycler™ (BIO-RAD) を使用した。

(4) Real-time PCR

Real-time PCR は、Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG を用い、95 °C で15分間変性させた後、さらに94 °C で30秒間変性、60 °C で30秒間アニーリング、72 °C で10分間伸長の条件で40サイクル増幅させた。また、反応および検出には、Mx3000™ Real-Time PCR System (STRATAGENE) を使用した。実験の結果はHD-5およびHD-6の結果をGAPDHで割り、コントロールの値を100%に換算したときの相対値を示した。

4. 研究成果

(1) 抗がん剤添加による腸管免疫への影響を確認するため、テガフルの曝露時間を変動させ α -defensin mRNA 量を評価した。予備培養後、Caco-2 細胞にテガフルを 3、6、12、24、48 時間曝露し、培養を行った。その結果、HD-5 および HD-6 mRNA 量はテガフル処理 3 時間において顕著に減少した。また、テガフルの曝露濃度の違いが α -defensin に与える影響については、実際の投与を想定し、腸管に曝露される 1~100 μ M の濃度範囲で検討を行った。テガフル 1、10 μ M 曝露によって HD-5 および HD-6 mRNA 量に変化は見られなかったが、100 μ M において、両 mRNA 量は有意に低下した。さらに、IL-1 および IL-8 の発現上昇、および免疫染色法における発現の差も確認した。

(2) テガフルによる α -defensin mRNA 量の減少に対する食品素材の影響について検討を行った。

数種の食品成分について検討を行い、特に抗酸化食品素材曝露において、HD-5 および HD-6 mRNA 量の増加を確認した。テガフルとの併用においては、濃度依存的にテガフルによる HD-5 および HD-6 mRNA 量の減少を抑制する傾向が見られた。特に、HD-5 における抑制効果は、HD-6 と比較して、より低濃度で効果があることが明らかとなった。一例として

Epigallocatechin gallate (EGCg)併用がテガフルの HD-5 mRNA 量低下に及ぼす影響を評価した結果を図 1 に示す。

テガフルおよび EGCg の曝露時間は、自然免疫系の働きが早期であることを考慮し 3 時間に設定した。また、テガフルの濃度は、1 の検討より変動が見られた 100 μ M とし、1、10、100 μ M の各濃

度の EGCg を同時に曝露した時の影響を評価した。

なお、テガフル、EGCg を 100 μ M で曝露しても Caco-2 細胞障害性は生じないことを確認している。

EGCg は、曝露濃度依存的に、テガフルによる HD-5 mRNA 量減少を抑制することが明かであった。

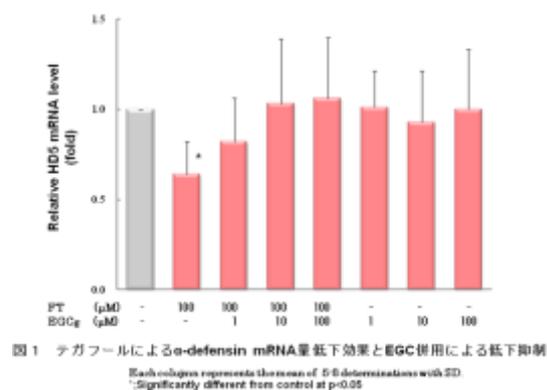


図 1 テガフルによる α -defensin mRNA 量低下効果と EGCg 併用による低下抑制

以上の結果より、EGCg は小腸において、テガフルによる α -defensin mRNA 量減少を抑制し、抗がん薬治療による免疫低下を改善できる食品素材となり得る可能性が示唆された。この事は、経口抗がん剤によって腸管免疫が低下する可能性があること、また抗酸化成分を摂取することによって、抗がん薬治療による免疫低下を未然に防ぐことができる可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takahashi N, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Takekuma Y, Sugawara M, Iseki K.: Basic investigation for classification of anticancer drugs by

pharmacological effects., Yakugaku
Zasshi. 132(6), 777-783, 2012. 査読
有り

[学会発表] (計3件)

- ① 井関 健 「サプリメントの効用とデメリット～科学的考察を軸にして～」第2回日本未病システム学会北海道支部会、2012.11.23-24 (札幌、北海道大学学術交流会館)」
- ② 澤田真衣、高橋夏子、小林正紀、佐々木将太郎、井関健. 「テガフルの腸管吸収機構に関する研究」 第26回北海道薬物作用談話会、2012.7.28 (札幌、北海道大学薬学部臨床薬学講義室)
- ③ 高橋 夏子、小林 正紀、澤田 真衣、山田 武宏、井関 健. 「Epigallocatechin gallate が経口抗がん薬由来の腸管免疫低下に与える影響」 第21回日本医療薬学会、2011.10.1-2 (神戸、神戸国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井関 健 (ISEKI KEN)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：40203062

(2) 研究分担者

高橋 夏子 (TAKAHASHI NATSUKO)

北海道薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60535293

(3) 連携研究者

なし