

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460233

研究課題名(和文)ヒ素化合物とテtrandリン併用の乳がん治療への応用に関する基盤的研究

研究課題名(英文) Fundamental research of application of arsenic compound in combination with tetrandrine to combat breast cancer

研究代表者

袁 博 (Yuan, Bo)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10328552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：早期発見・診断及び分子標的治療が進んでいたが、乳がんは女性によく見られるがんであり、がん関連死の重要な要因の一つである。抗がん剤の薬物耐性及びがんの再発などにより、新たな乳がん薬物治療法開発が求められている。

本研究では、乳がん細胞に対するヒ素化合物単独及びテtrandリンとの併用効果を検討し、両薬物併用による相乗的な殺細胞効果を明らかにした。さらに、乳がん動物モデルにおける両薬物の併用効果を解明するとともに、いずれの投与群における動物体重の変化が殆ど観察されなかったことから両薬物併用による副作用が少ないことを示唆し、乳がん薬物治療にヒ素化合物を主体とした新たな治療法開発につながる研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Despite advances in early detection, diagnosis, and targeted treatment, breast cancer is still among the leading cause of cancer-related deaths in women. The need for novel therapeutic strategies remains paramount given the sustained development of drug resistance, and tumor recurrence.

In this study, we investigated the cytotoxicity of a combination of arsenite (AsIII) and tetrandrine (Tetra) against breast cancer cells, and clarified that Tetra significantly synergistically enhanced the cytotoxicity of AsIII against the cells. We also clarified their antitumor activity in a mouse xenograft model, and demonstrated that no alteration in the body weight was observed in mice between control and treatment group regardless of the long-term administration of the combination, indicating the combined treatment was well tolerated by all mice. Our findings thus provide novel insight into the development of new therapeutic strategies to combat breast cancer using AsIII-based combination therapy.

研究分野：がん関連

キーワード：乳がん 亜ヒ酸化合物 テtrandリン オートファジー 薬物トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生涯に乳がんを患う日本人女性は、15人に1人と言われ、年間約5～6万人の女性が罹ると推定される。乳がん薬物治療において、従来型の抗がん剤のほかに、タモキシフェン【エストロゲン受容体 (ER) 調節薬】、トラスツズマブ (ヒト化抗 HER2 抗体) などの分子標的薬が用いられるが、临床上における薬物耐性、副作用が依然として大きな問題となっている。

古くから薬として用いられたヒ素化合物 (As_2O_3 、 As_2S_2) が、近年急性前骨髄球性白血病 (APL) のみならず、骨髄異形成症候群にも優れた治療効果を示すことが報告された。研究代表者はかねてより、長期にわたり As_2O_3 の治療を受けた患者から経時的に生体試料を採集し、ヒ素体内動態の体系的な解析を行ってきた。また、ヒト由来正常細胞、白血病細胞株および初代培養 APL 細胞に対するヒ素化合物の作用を検討した結果、酸化的ストレスおよび分化誘導がヒ素化合物のがん細胞抑制効果に関与することを明らかにした。さらに、薬剤耐性および薬物相互作用における重要な役割を果たす薬物トランスポーターが、ヒ素化合物の臨床効果と密接に関係し、特にヒ素細胞内への取込みを担う aquaporin 9 (AQP9) がその治療効果を予測するためのバイオマーカーの一つになり得ることを提唱した。近年、液性がんにも優れた治療効果が認められたヒ素化合物が、難治性固形がんを含む種々のがん細胞に殺細胞作用を示すことが報告されたことから、乳がん治療へのヒ素化合物の応用が考えられた。一方、その抗腫瘍機構に関する不明な点が多いゆえに臨床応用の拡大が阻まれている。

伝統的ながん治療の代替薬となり得る漢方薬を含む天然物由来物質は、正常細胞に及ぼす影響が少なく、がん治療薬の効果を維持・増強しつつ、投与量の減量による副作用の軽減をもたらすことが期待されている。Tetrandrine (Tetra) は漢方薬である粉防己由来のアルカロイドであり、その注射剤が中国で抗炎症薬、利尿薬として临床上で使用されている一方、白血病細胞 HL-60 および MOLT-4 に対する殺細胞作用も報告されている。しかしながら、乳がん細胞に対する作用を殆ど検討されていない。

2. 研究の目的

研究代表者によるこれまでの研究で、ヒ素化合物と Tetra は、乳がん細胞 MCF-7 (ER α +) のみならず、MDA-MB-231 (ER α -) にも濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示し、併用することにより増殖抑制効果が増強する傾向が明らかとなった。また、両薬物の併用処理においては、ヒ素化合物単独処理に比較し、がん細胞における細胞内ヒ素蓄積量 (As[i]) が増加する傾向を見出した。そこで、本研究は

ヒト乳がん細胞 (MCF-7 および MDA-MB-231) に対するヒ素化合物および Tetra との併用効果を、in vitro および in vivo で細胞毒性・細胞分化・薬物トランスポーター・細胞の浸潤/遊走を中心に、分子細胞学的な観点から詳細に検討し、新たな乳がん薬物治療法開発に基礎的な知見を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞生存率の検討

コンフルエントになった乳がん細胞をハーベストし、 1×10^5 cells/ml に調製し、所定の培養容器に一晩培養させた後、ヒ素化合物である arsenite (As^{III}) と Tetra 単独および併用で処理し、XTT 法を用いて、細胞の生存率を評価した。

(2) Colony formation assay (コロニー形成アッセイ)

乳がん細胞を 12 ウェルプレートに撒き (500 cells/well)、一晩培養した後、所定濃度の両薬物単独、および併用で 24 時間処理した。次いで、薬物を含む培地を除去し、フレッシュな培地を加え、さらに 8～12 日間培養した。培養後、がん細胞のコロニーをギムザ染色で染色し、カウントした。

(3) Wound healing assay (創傷治癒アッセイ)

24 ウェルプレートに乳がん細胞を撒き (5×10^4 cells/well)、コンフルエントな培養細胞単層に形成させた。次いで、20～200 μ l マイクロピペットチップを用いて、形成された培養細胞単層に傷をつけ、一定の創傷 (約 0.5 mm のギャップ) を作成した。PBS で細胞を優しく洗浄した後、両薬物の単独および併用で 48 時間処理した。処理後の細胞を顕微鏡下で撮影し、創傷 (ギャップ) の幅を計量した。

(4) 細胞周期アッセイ

As^{III} と Tetra 単独および併用により処理された乳がん細胞をハーベストし、PBS で洗浄した後、1% PFA/PBS を用いて 30 分間氷上で固定した。次いで、PBS で 2 回洗浄した後、70% 冷エタノールで懸濁し、 -20°C 、4 時間静置した。PBS で洗浄した後、0.25% Triton-X 100 で 5 分間氷上にてインキュベーションした。次いで、PBS 洗浄後 Propidium Iodide (PI)/RNase/PBS で、暗所室温で 30 分間インキュベーションした後、フローサイトメーターを用いて細胞周期の変動を測定した。

(5) 細胞障害性アッセイ (乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性)

As^{III} と Tetra 単独および併用により処理された乳がん細胞の培養上清を回収し、LDH-細胞障害性検出キットを用いて、下記の式によって細胞障害性を測定した：

$$\text{LDH leakage (\%)} = (\text{Sup-NC}) / (\text{P-NCT}) \times 100\%$$

Sup: 培養上清; NC: ネガティブコントロール; P: ポジティブコントロール; NCT: 0.2% Tween を含む培地

(6) Real-time PCR

ISOGEN II を用いて、As^{III} と Tetra 単独および併用により処理された乳がん細胞から Total RNA を抽出し、cDNA を合成した。目的遺伝子のプライマーセットを用い、real-time PCR を行った。次いで、real-time PCR の $\Delta \Delta Ct$ を使い、遺伝子 mRNA 発現量の変動に関する解析を行った。

(7) ウェスタンブロット解析

Laemmli サンプルバッファーを用いて、As^{III} と Tetra 単独および併用により処理された乳がん細胞、および担がんマウスから摘出された腫瘍組織からタンパク質を調製した。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法でタンパク質を分離し、PVDF 膜への転写を行った。次いで、一次/二次抗体を用い、化学発光法にて抗体陽性バンドの検出を行い、目的タンパク質発現の量的変化を測定した。

(8) 細胞内ヒ素蓄積量 (As[i]) の測定

As^{III} と Tetra 単独および併用により処理された乳がん細胞を PBS で優しく洗浄した後、2% SDS で溶解させた。細胞溶解液中のタンパク質濃度を Bradford's 法で測定した。次いで、研究代表者らが確立した高周波誘導結合プラズマ質量分析系 (ICP-MS) を用い、細胞溶解液中の総ヒ素の量を測定した。

(9) MDA-MB-231 担がんマウスの作製および担がんマウスに対する両薬物の併用効果

5 週齢の BALB/c ノードマウス (♀) を大学の動物施設に数日間に適応させた。1 × 10⁷ 個 MDA-MB-231 細胞を 0.1 ml 生理食塩水に懸濁し、マウスの右腋窩に接種し、担がんマウスを作製した。約 1 週間後に腫瘍が明らかに確認された時点から、腹腔内に As₂O₃ (2 mg/kg/day) および/または Tetra (20 mg/kg/day) を 1 日 1 回、10 週間投与し、経時的に動物体重・腫瘍体積を計量した。投与期間終了時に、三種混合麻酔液 (塩酸メドミジン、ミタゾラム、酒石酸ブトルファンール) を腹腔内に投与し、解剖を行った。摘出された腫瘍組織の重量を計り、免疫組織染色およびウェスタンブロット解析用のためのサンプルを調製した。

4. 研究成果

(1) 乳がん細胞に対する As^{III} と Tetra の併用による相乗的な殺細胞作用

As^{III} と Tetra で乳がん細胞を 48 時間処理したところ、両薬物は、MCF-7 (ER α +) のみならず、MDA-MB-231 (ER α -) にも濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示した。MCF-7 (ER α +) および MDA-MB-231 (ER α -) における

As^{III} の IC₅₀ (50% 阻害濃度) は、6.1 ± 0.9 μ M、19.2 ± 2.6 μ M であり、Tetra の IC₅₀ は、

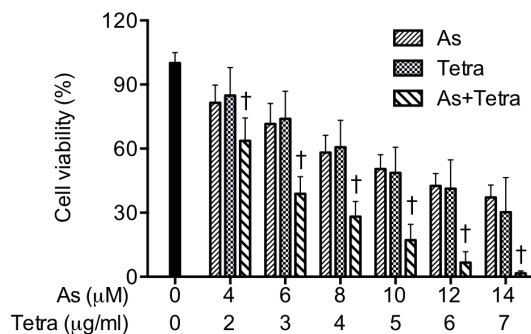


図 1

3.5 ± 0.6 μ g/ml、4.3 ± 0.2 μ g/ml であった。

上記の両薬物の IC₅₀ 値に基づいて、併用時の両薬物の濃度を設定し、併用処理によるがん細胞への増殖抑制効果が顕著に増強したことが明らかとなった (図 1: MCF-7 細胞結果。†, p < 0.05 vs. each alone)。さらに、Ting-Chao Chou らが開発したソフトを用いて薬物併用効果を解析したところ、乳がん細胞における As^{III} と Tetra の併用による相乗的な殺細胞作用が認められた。これらの結果から、両薬物の併用が乳がん細胞の ER α の発現有無に関わらず、効率良くがん細胞の増殖を抑制することが示唆された。

(2) 乳がん細胞のコロニー形成能および転移能に対する As^{III} と Tetra の併用による阻害効果

MCF-7 細胞における両薬物の処理によるコロニー形成能および転移能への影響を検討したところ、それぞれの単独処理と比較し、併用の方がより顕著にがん細胞のコロニー形成能および転移能を抑制した。改めて乳がん細胞における両薬物併用による相乗的な細胞増殖抑制効果が確認された。

(3) As^{III} と Tetra の併用による乳がん細胞の細胞周期の攪乱

MCF-7 細胞において、As^{III} 単独処理では、有意な G₀/G₁ 期アレストが観察された。Tetra 単独処理が、同様なアレストを誘導しなかったが、As^{III} による G₀/G₁ 期アレストを有意に増強させた。また、乳がんの発生等にも関係する転写因子である FOXO3a、およびその下流に位置する遺伝子である p21, p27, cyclin D1 の変動が、両薬物それぞれ単独処理より併用処理においてより顕著であった。これらのことから、両薬物による乳がん細胞の細胞周期攪乱に上記遺伝子が強く関係することが示唆された。

興味深いことに、MDA-MB-231 細胞において、両薬物単独処理はともに S 期アレストを誘導し、併用による誘導作用がさらに増強された。両乳がん細胞において、異なるタイプの細胞周期攪乱が誘導されたにもかかわらず、MCF-7 細胞に観察された FOXO3a と p27 の変動

が MDA-MB-231 細胞においても確認された。以上のことから、両薬物による殺細胞作用に細胞周期の攪乱が関与することが示唆された。また、異なるタイプの細胞周期攪乱は、ER α の有無に関係する可能性が考えられた。

(4) As^{III} と Tetra の併用に誘導される乳がん細胞の細胞障害

MCF-7 細胞において、As^{III} 単独処理では、濃度依存的に LDH の漏出が観察された。Tetra 単独処理は LDH の漏出を誘導しなかったものの、As^{III} に誘導される LDH の漏出を増強させた。一方、MDA-MB-231 において、両薬物のそれぞれの単独処理では、LDH の漏出が観察されなかったが、併用処理では顕著に誘導された。これらのことから、両薬物の併用による細胞障害は、両薬物併用に誘導される相乗的な細胞増殖抑制に関与することが示唆された。

(5) As^{III} と Tetra の併用による乳がん細胞オートファジー細胞死

両薬物に誘導される相乗的な細胞増殖抑制効果にオートファジー関与の有無について、ウェスタンブロット法を用いて検討したところ、両乳がん細胞におけるオートファジーのマーカーである LC3 の発現が、それぞれの単独処理により誘導され、併用によってさらに増加した。また、オートファジー誘導カスケード活性化を示す遺伝子タンパク質の発現も観察された。さらに、オートファジー阻害剤であるウォルトマンニン (wortmannin) の共存下で、両薬物に誘導される MDA-MB-231 細胞の細胞増殖抑制が顕著に回復した。これらのことから、オートファジー細胞死は、両薬物に誘導される相乗的な細胞増殖抑制効果に寄与することが示唆された。

一方、両薬物の処理を受けた乳がん細胞におけるアポトーシス誘導の有無について検討したところ、アポトーシスに特徴的な生化学的な変化の 1 つである DNA の断片化が観察されなかったことから、両薬物の細胞増殖抑制効果にアポトーシスが関与する可能性が低いと思われた。

(6) As^{III} と Tetra の併用による乳がん細胞の細胞増殖抑制への survivin の関与

両薬物単独処理によって、MCF-7 細胞における survivin 遺伝子 mRNA 発現のダウンレギュレーションが観察された。そして、単独処理より、併用に誘導されるダウンレギュレーションがより顕著に増強された (図 2: *, p<0.05 vs. control; †, p<0.05 vs. each alone)。さらに、両薬物の処理を受けた MCF-7 細胞における survivin 遺伝子タンパク質も同様な挙動が示された。

(7) As^{III} と Tetra の併用による乳がん細胞

の相乗的な増殖抑制効果と細胞内ヒ素蓄積量 (As[i]) の相関関係

As^{III} 単独処理を受けた MCF-7 細胞における

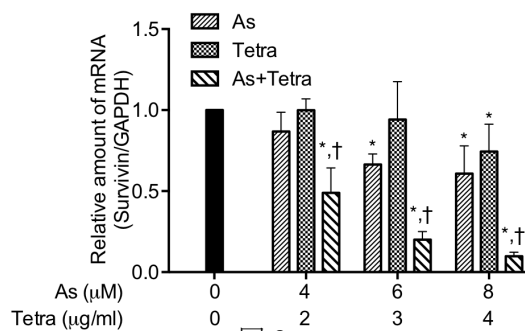


図 2

As[i] は時間依存的に増加した。また、Tetra の添加は As[i] の量を顕著にアップレギュレーションした。それと同時に、As^{III} に誘導される細胞増殖抑制効果も Tetra の添加により強くなることが確認された。興味深いことに、breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) インヒビターである Ko134 の共存下においても、As[i] 量のアップレギュレーションおよび細胞増殖抑制効果の増強が観察された。これらのことから、Tetra が BCRP のような薬物トランスポーターの機能を調節することにより、As[i] 量をアップレギュレーションし、As^{III} の細胞増殖抑制効果を増強させることが考えられた。

(8) in vivo における As^{III} と Tetra の抗腫瘍効果

MDA-MB-231 担がんマウスに両薬物単独および併用投与したところ、単独投与と比べ併

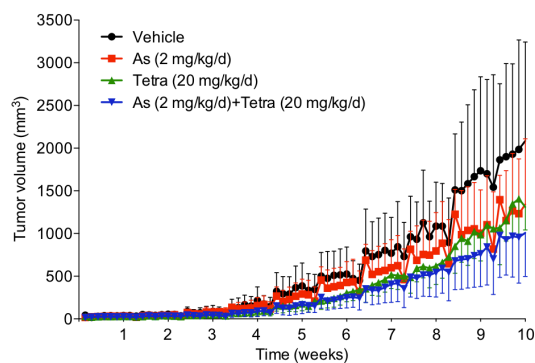


図 3

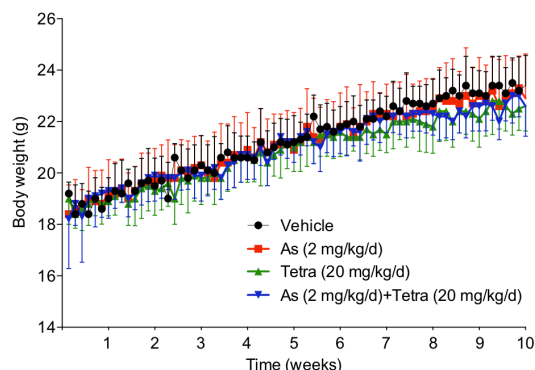


図 4

用投与された動物における腫瘍体積・重量が減少することが観察された(図3)。また、いずれの投与群における動物体重の変化が殆ど観察されなかったこと(図4)から、両薬物投与に起因する副作用が少ないことが示唆された。さらに、腫瘍組織におけるオートファジー関連遺伝子発現の検討により、MDA-MB-231細胞を用いたin vitro実験系に観察されたオートファジーカスケードの活性化およびLC3タンパク質の誘導が確認された。これらのことから、in vivoにおいても両薬物ががん組織にオートファジー細胞死誘導し、抗腫瘍活性を発揮することが考えられた。

以上の結果から、ER α +の発現の有無に関わらず、As^{III}とTetraの併用が効率良く乳がん細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。両薬物の相乗的な細胞増殖抑制効果に、細胞周期攪乱、ネクロシスおよびオートファジーが関与することが示された。また、Tetraが薬物トランスポーターを調節することにより、細胞内ヒ素蓄積量を高め、As^{III}の細胞増殖抑制効果を増強することが考えられた。さらに、in vivoの研究において、腫瘍体積と重量の減少に伴う腫瘍増殖抑制が観察され、且つ投与群と非投与群の動物体重に明らかな変化がなかったことが明らかとなった。以上のことにより、両薬物の併用は乳がん治療に対するとても有望な治療法であることが示唆された。

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 Yao, M. J., Yuan, B., Wang X., Sato, A., Sakuma, K., Kaneko, K., Komuro, H., Okazaki, A., Hayashi, H., Toyoda, H., Pei, X.H., Hu, X.M., Hirano, H., and Takagi, N. Synergistic cytotoxic effects of arsenite and tetrandrine against human breast cancer cell line MCF-7. Int J Oncol, 査読あり, Accepted.

[学会発表] (計4件)

- ① Yuan B., Sato A, Sakuma K, Kaneko K, Hayashi H, Toyoda H, and Takagi N., 乳がん細胞MCF-7におけるAs^{III}とテトランドリンの併用による殺細胞の増強効果, 第87回日本生化学会大会, 2014年10月15日国立京都国際会館(京都)

- ② Yao M. J, Wang X, Yuan B., Sato A, Sakuma K, Kaneko K, Hayashi H, Toyoda H, and Takagi N., Enhanced Antitumor Effect of the Combination of Arsenite with Tetrandrine in Breast Cancer, BMB2015 (第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学

会合同大会), 2015年12月1日神戸ポートアイランド(神戸)

- ③ Wang X, Yao M. J, Yuan B., Hayashi H, and Takagi N., Antitumor activity of arsenite and tetrandrine, each alone and in combination, against breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro and in vivo, 第136回日本薬学会年会, 2016年3月26日パシフィコ横浜(横浜)

- ④ 王 瀟, 姚 明江, 袁 博, 林 秀樹, 高木 教夫, In vitro および in vivo で乳がん細胞MDA-MB-231に対するAs^{III}とテトランドリンの単独・併用による抗腫瘍活性, 第22回ヒ素シンポジウム, 2016年11月17日国立研究開発法人産業技術総合研究所臨海副都心センター(東京)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/ouyoseika>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

袁 博 (YUAN, Bo)
東京薬科大学・薬学部・講師
研究者番号: 10328552

(2) 連携研究者

高木 教夫 (TAKAGI, Norio)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 50318193