

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 10 月 6 日現在

機関番号：30111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750053

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬による自然免疫能の変動と栄養輸送担体との発現調節の関連性

研究課題名(英文) Effects of anti-cancer drugs on regulation of intestinal transporters by intestinal immunity peptides in Caco-2 cells.

研究代表者

高橋 夏子 (TAKAHASHI, Natsuko)

北海道薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60535293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： Human  $\alpha$ -defensin(HD)5は、異物からの粘膜防御など先天性の免疫防御システムとして分泌される抗菌ペプチドである。このペプチドは、腸管上皮バリア機能の維持において重要と考えられているが、HD5と腸管トランスポーターの関連については研究されていない。本研究では、腸管に発現するトランスポーターに及ぼすHD5の影響を明らかにすることを目的とした。

HD5処理により、MRP2およびMDR1 mRNAの発現は減少した。さらに、HD5ノックダウンにより、MRP2およびMDR1 mRNAの発現は増加した。これらの結果から、HD5はMRP2およびMDR1の発現を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Human  $\alpha$ -defensin (HD) 5 was antimicrobial peptide secreted as components of the innate immune defense system. Although intestinal immunity peptides are considered to be important in intestinal epithelial barrier function, it has not been studied the relationships between HD 5 and intestinal transporters involved in the barrier for orally absorbed drugs. We performed to determine the effects of HD 5 on intestinal transporters in Caco-2 cells.

Firstly, we examined the effect of HD 5 on the expression of intestinal transporters. The results showed that HD 5 treatment was reduced expression of MRP2 and MDR1 in Caco-2 cells. Moreover, we examined the effects of treatment with HD5 knockdown on MRP2 and MDR1 expression in Caco-2 cells. The results showed MRP2 and MDR1 mRNA expression was induced by HD5 knockdown. These results suggest that MDR1 and MRP2 are regulated by HD 5.

研究分野： 栄養薬理

キーワード：  $\alpha$ -defensin トランスポーター

### 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、分子標的薬を中心としたがん治療法が急速に発展している現在においても完治は難しく、がん患者の数は今後も増加の一途を辿ることが予想される。

一方、がん患者の多くに、手術および抗がん薬の副作用による侵襲から腸粘膜の萎縮、さらには腸管免疫の機能低下が惹起されることが知られており、免疫機能の維持・向上が治療の効果を高めるには不可欠とされている。しかしながら、がん治療と免疫低下に関する研究では、獲得免疫に関する研究が多くを占め、最も重要と考えられる患者自身に本来備わる自然免疫(=腸管免疫)の影響については検討されていない。さらに、がん治療においては、治療効果および栄養状態の低下が引き起こされる可能性がある。これには、腸管の輸送の大部分を担うトランスポータの発現低下が示唆されるが、腸管免疫とトランスポータの関連について評価した例は少ない。また、トランスポータの発現には、外因性のみならず、サイトカインなど内因性の物質も関与することが知られている。この観点から、サイトカインと同様ヒトの免疫を担う抗菌ペプチドが腸管に発現するトランスポータを制御する可能性は高い。近年、小腸パネート細胞から分泌される抗菌ペプチド、 $\alpha$ -defensin が腸管免疫の分野で注目されている。このペプチドは、微生物に対する生体防御機構としてだけではなく、クローン病のような腸管疾患との関連や腸管免疫との関連等、生体における重要性が報告されている。しかしながら、このペプチドを用いた免疫評価に関する研究は少ないのが現状である。

本研究では、小腸管腔内で機能する代表的な抗菌ペプチドである  $\alpha$ -defensin とトランスポータの関連について検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、腸管免疫とトランスポータの関連について基礎的検討を行い、がん治療の効果向上の一助とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

小腸吸収モデルとして汎用されるヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 を用い、 $\alpha$ -defensin (human defensin 5 : HD5) を曝露後、1 および 3 時間培養し、real-time PCR 法を用いて各トランスポータの mRNA 発現量を解析した。また、タンパク質発現量については、western blot 法により評価した。HD5 の siRNA によるノックダウンは、Reverse transfection 法を用いた。抗がん剤曝露によるトランスポータへの影響の評価には、多剤耐性獲得モデルとして P-gp 強制発現細胞を使用した。抗がん剤は、作用機序の異なるシスプラチン (CDDP)、5-フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート (MTX)、パクリタキセル (PTX)、ビンブラスチン (VBL)、ドキシソルピシン

(DXR)、40487s (シクロホスファミド (CPA) の活性代謝物) を使用した。

### 4. 研究成果

(1) HD5 曝露がトランスポータの発現に及ぼす影響

小腸吸収モデルとして汎用されるヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 を用い、 $\alpha$ -defensin (human defensin 5:HD5) を曝露後、一定期間培養し、real-time PCR 法を用いて ABC トランスポータ (multidrug resistance-associated protein 2 : MRP2, multidrug resistance protein 1 : MDR1) および SLC トランスポータ (organic anion-transporting polypeptide 2B1 : OATP2B1, monocarboxylate transporter 1 : MCT1) の mRNA 発現量を解析した。

予備培養後、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 に 10 または 100 nM HD5 を曝露し、1 または 3 時間培養して real-time PCR 法を用いて 4 種のトランスポータの mRNA 量を解析した。

その結果、10 および 100 nM HD5 を 1、3 時間曝露後の MRP2 mRNA 量は、いずれの時間においても有意に減少することが明らかとなった (図 1)。

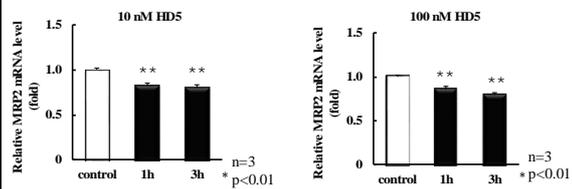


図 1 HD5 曝露が MRP2 mRNA 発現量に及ぼす影響

また、MDR1 mRNA 発現量は、10 nM HD5 を 3 時間曝露することにより有意に減少した。100 nM HD5 曝露においては、1 および 3 時間曝露することにより、有意に減少した (図 2)。一方、SLC トランスポーターである OATP2B1 では 10 および 100 nM HD5 を 1 および 3 時間曝露することにより、mRNA 発現量に有意な減少がみられた。MCT1 においては 10 および 100 nM HD5 を 1 時間曝露することにより mRNA 発現量に有意な減少が見られた (date not shown)。

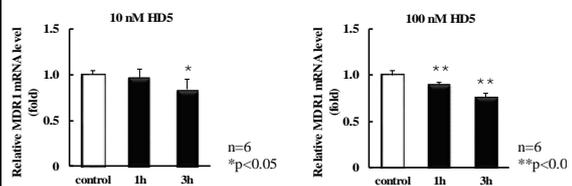


図 2 HD-5 曝露が MDR1 mRNA 発現量に及ぼす影響

(2) HD5 発現抑制がトランスポータの発現に及ぼす影響

さらに、これらの結果が HD5 曝露による影響であるか否かを検討するため、siRNA を用いて HD5 をノックダウンした。

トランスフェクト後 72 時間における

Caco-2 細胞のノックダウン効果を確認したところ、100 μM HD5 siRNA トランスフェクトにより、HD5 mRNA 発現量は、約 30 %まで減少した。さらに、MTT assay による細胞障害性についても検討を行い、以降の実験には上記の条件を用いた(図 3)。

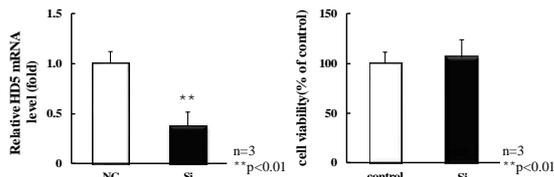


図 3 HD5 siRNA を用いた発現抑制および細胞障害性

さらに、HD5 ノックダウンにおける各トランスポートの mRNA 発現量について検討した結果、MRP2 および MDR1 mRNA は有意に増加した(図 4)。また、MRP2 および P-gp タンパク質発現量においても mRNA と相関し、有意に増加した(図 5)。一方、OATP2B1 および MCT 1 については、mRNA 発現量およびタンパク質発現量に相関は見られなかった (data not shown)。

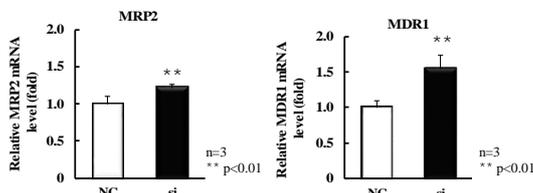


図 4 HD5 発現抑制が MRP2 および MDR1 mRNA 発現量に及ぼす影響

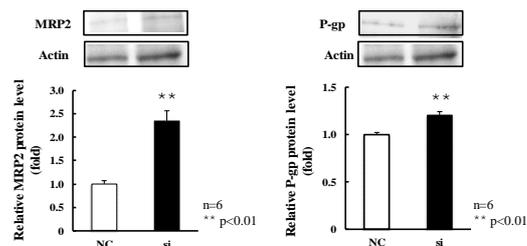


図 5 HD5 発現抑制が MRP2 および MDR1 タンパク質発現量に及ぼす影響

これらの結果より、HD5 が排出系トランスポートである MRP2 および MDR1/P-gp の発現を制御する可能性が示唆された。

### (3) 抗がん剤曝露がトランスポートの発に及ぼす影響

がんは抗がん剤投与に対して耐性ができると同時に、作用機序や構造が異なる複数の薬剤に対し、耐性を引き起こす。P-gp は、抗がん剤に対する多剤耐性を獲得したがん細胞において過剰に発現していることが知られており、多様な抗がん剤を細胞外に排出することから、多剤耐性因子として位置付け

られている。がんの多剤耐性の獲得時の HD5 の機能を評価する基礎検討として、P-gp 強制発現細胞を用い、抗がん剤曝露による P-gp の発現変動を評価した。

P-gp 強制発現細胞を用いて、作用機序の異なる抗がん剤曝露が P-gp/MDR1 の発現に及ぼす影響について検討した。その結果、P-gp の基質となる PTX および VBL、DXR は、MDR1 mRNA 発現量を時間依存的に増加させた。

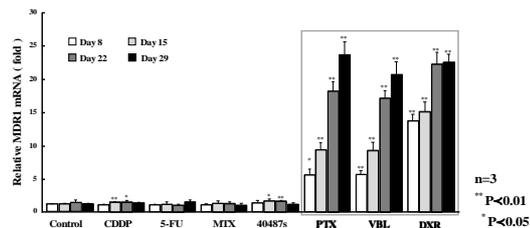


図 6 抗がん剤が MDR1 mRNA 発現量に及ぼす影響

現在、多剤耐性獲得時における HD5 のトランスポート制御に関する研究を遂行中である。

### 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 0 件)

(学会発表)(計 5 件)

- 1) 保田元気、窪田篤人、更科壮太、小林正紀、井関健、高橋夏子. -Defensin が排出系トランスポートへ及ぼす影響、第 27 回日本医療薬学会年会、2017、東京
- 2) 窪田篤人、小林正紀、竹野礼子、更科壮太、高橋夏子、保田元気、古堅彩子、鳴海克哉、井関健. 食品成分による腸管免疫の維持・改善に関する研究、日本薬学会第 137 年会、2017、仙台
- 3) 高橋夏子、保田元気、窪田篤人、小林正紀、井関健. 経口抗がん剤が腸管免疫に与える影響、第 26 回日本医療薬学会年会、2016、京都
- 4) 村中円香、小林正紀、宮崎稔、杉浦則男、井関健、高橋夏子. Caco-2 細胞におけるテガフルの吸収機構に関する研究、日本薬学会第 136 年会、2016、横浜
- 5) 柴田絵里子、更科壮太、窪田篤人、小林正紀、宮崎稔、杉浦則男、井関健、高橋夏子. 銀杏状霊芝が経口抗がん薬による腸管免疫低下に与える影響、日本薬学会第 136 年会、2016、横浜

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

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

取得状況(計 0件)

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

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 高橋 夏子  
(TAKAHASHI NATSUKO)

北海道薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60535293

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )