

O-3-1 

がん悪液質における代謝異常ならびに視床下部を介した脳-末梢連関の機能変化の解析

小嶋千潤¹、濱田祐輔¹、森美貴子¹、相内俊樹¹、須田雪明¹、成田道子¹、葛巻直子¹、成田 年^{1,2}

1) 星薬科大学 薬理学教室、2) 星薬科大学 先端生命科学研究センター (L-StaR)

がん悪液質は、体重減少や骨格筋減少を伴った複合的な代謝異常の症候群であり、多くの進行がん患者に認められ、QOLの低下や生存期間の短縮をもたらすため、臨床上問題となっている。一方、代謝などの様々な生理的恒常性は、中枢神経と末梢組織の密接な連関により維持されており、特に視床下部はこれらの調節の一端を担う重要な脳領域であると考えられる。しかしながら、がん悪液質に至るメカニズムやがん悪液質状態における脳機能変化については不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、がん悪液質における代謝異常ならびに視床下部を介した脳-末梢連関異常の解析を試みた。まず、体重の有意な減少が認められるLLC細胞誘発悪液質モデルマウスを用い、大腿四頭筋および後肢筋を摘出し、骨格筋重量の測定を行った。その結果、悪液質モデル群では両骨格筋重量の有意な低下が認められた。さらに、grip strength test、rotarod testおよび open field testにより、筋強度、筋持久力および身体活動量の変化を検討したところ、悪液質モデル群においてこれらすべての低下が認められた。このような条件下、悪液質モデルマウスにおける血中サイトカイン量の変化について検討したところ、IL-6、MCP-1、MIP-2、VEGFの有意な増加が認められた。一方、悪液質モデルマウスの視床下部領域における各種遺伝子発現変動を解析したところ、悪液質モデル群において NPY、AgRP の有意な発現上昇および POMC の発現低下が認められた。以上、本研究により、がん悪液質状態では、血中炎症性サイトカインの増加および視床下部領域における中枢性代謝調節異常が引き起こされている可能性が示唆された。

O-3-2 

漢方薬半夏瀉心湯は口内炎治癒促進作用を有する～ヒト口腔上皮細胞を用いた損傷治癒アッセイによる評価～

○江藤萌子^{1,2}、宮野加奈子²、平野絢音^{2,3}、大宮雄司⁴、野中美希²、白石成二²、藤井秀明³、樋上賀一¹、上園保仁^{2,5,6}

¹東理大院・薬・分子病理代謝、²国がんセ・研・がん患者病態生理、³北里大・薬・生命薬化学、⁴株式会社ツムラ・ツムラ研、⁵国がんセ・先端医療・支持療法開発、⁶国がんセ、中央病院、支持療法セ

【背景・目的】抗がん剤や頭頸部放射線治療を受けているがん患者は高頻度かつ広範囲に口内炎を発症する。これは痛みのみならず「食べる、飲む、話す」という基本生活を障害するため著しいQOLの低下をきたす。近年、漢方薬のひとつである半夏瀉心湯（HST）が第Ⅱ相二重盲検臨床試験において、抗がん剤治療中の大腸癌患者の口内炎発症期間を有意に短縮することが報告された。当研究室ではこれまでに、ヒト口腔上皮細胞（HOK細胞）において、HSTが炎症性メディエーターによるプロスタグランジンE₂産生を抑制することを明らかにし、HSTの構成生薬7種のうち黄連、黄芩、乾姜が抑制作用に関与していることを報告した。しかし、HSTの口内炎治癒メカニズムには抗炎症作用以外の作用も関与していると考えられる。そこで本研究では、口腔上皮の損傷治癒機能に焦点を当て、HSTの損傷治癒への効果を解析した。

【方法】HOK細胞の損傷治癒機能はWound healing assay法により評価した。コラーゲン・コートした96 well imagelock microplateにHOK細胞を播種し、専用の96 well woundmakerを用いて細胞を均一にスクラッチした後、HSTを添加した。その後IncuCyte ZOOM® live-cell imagingを用いて2時間ごとに損傷部の細胞像を撮影し、損傷部に占める遊走したHOK細胞の割合を定量化した。さらに、HSTの構成生薬エキス7種（半夏、黄芩、乾姜、甘草、大棗、人參、黄連）についても同様に評価した。

【結果・考察】確立したWound healing assay法により、HST（1-300 μg/mL）は濃度依存的にHOK細胞の遊走を促進し、損傷治癒機能を促進することが示唆された。さらに、HST構成生薬7種のうち、乾姜、人參に有意な遊走作用能が認められた。したがって、HSTによる損傷治癒機能には乾姜および人參成分が関与することが示唆された。現在、口内炎治癒を促進する漢方薬の作用メカニズム解明を目指し、HST構成生薬7種それぞれに含まれる成分レベルでの評価を行っているところである。

腸炎および腸炎関連大腸がんの進行における脂質メディエーター産生動態

宮崎悠介、濱端大貴、中村達朗、村田幸久

東京大学・院・放射線動物科学

【背景】潰瘍性大腸炎は、結腸粘膜のびらん形成を伴う炎症性腸疾患であり、原因不明で治療方法がない。この疾患が慢性化して寛解と再発を繰り返すと大腸がんの発症につながる。細胞膜のアラキドン酸 (AA) からシクロオキシナーゼ (COX) やリポキシゲナーゼ (LOX) などの酵素活性依存的に、または酵素非依存的な酸化反応により合成される多くの脂質メディエーターが炎症を制御する。本研究では潰瘍性大腸炎と腸炎関連大腸がんの発症と進行に伴う脂質メディエーターの産生動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】マウスに発がん性物質であるアゾキシメタンを投与したのち、腸炎誘発物質であるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 17日おきに3回に分けて投与することで腸炎および腸炎関連大腸がんモデル作製した。腸炎症状から、発症期、再発期、腫瘍形成期と病期を設定し、結腸組織中の脂質メディエーター産生量を質量分析器を用いて測定した。

【結果】DSSの投与回数に依存して腸炎の症状が悪化し、3回目の投与時には腫瘍形成が確認された。AA由来脂質メディエーターはDSSの投与回数に関わらず計9種類検出された。COX由来脂質メディエーターは、発症期と腫瘍形成期で増加したが、上皮組織の剥離が見られた再発期には減少した。LOX由来脂質メディエーターは、発症期と腫瘍形成期に減少したが、炎症細胞の浸潤が顕著にみられる再発期には増加した。酸化反応由来脂質メディエーターは、発症期と再発期には増減は見られなかったが、腫瘍形成期に増加した。

【結論】腸炎および腸炎関連大腸がんモデルにおいて、AA由来脂質メディエーターの各合成経路活性が病態進行に伴い劇的に変動していることが分かった。今後、各病期におけるその役割を解明していきたい。

セラミドキナーゼによるアクチン細胞骨格制御機構の解明

○富澤智史、中村浩之、村山俊彦

千葉大学・大学院薬学研究院・薬効薬理学研究室

【背景・目的】セラミドキナーゼ (CerK) はスフィンゴ脂質のセラミドからセラミド-1-リン酸を産生する酵素である。CerKは細胞遊走を制御することなどが報告されているが、その詳細なメカニズムは不明である。細胞遊走はがん細胞の転移や免疫反応など、様々な生命現象に関与しており、アクチンリッチな葉状仮足 (lamellipodia) の形成により調節されている。そこで、本研究ではCerKがlamellipodiaの形成を制御する可能性を考え解析を行った。

【方法・結果】ヒト乳腺癌由来MCF-7細胞やヒト肺胞基底上皮腺癌由来A549細胞などは、上皮成長因子 (EGF) 刺激依存的にlamellipodiaを形成する。そこで、EGF刺激によるlamellipodiaの形成へのCerKの関与を検討した。CerKの細胞内局在を観察したところ、EGF刺激により形成されるlamellipodiaにCerKが局在する様子が観察された。CerKのノックダウンはEGF刺激によるlamellipodiaの形成を促進した。一方で、CerKを一過性発現した細胞においてはlamellipodiaの形成が抑制された。EGF刺激によるlamellipodiaの形成はRhoファミリー低分子量G蛋白質のRac1の細胞膜への移行および活性化により調節される。CerKのノックダウンはEGF刺激によるRac1の細胞膜への移行を促進した。また、CerKのノックダウンによるlamellipodia形成の促進はRac1の阻害により抑制された。

【考察】CerKはEGF刺激依存的なRac1の細胞膜移行を抑制し、lamellipodiaの形成を負に制御していることが明らかとなった。

MDA-MB-231 CD44陽性細胞はTublin阻害剤曝露後miR-93増加によりp21発現を抑制する

飯島堅太郎、佐々木晶子、角田ゆう子、辻まゆみ、宇高結子、小山田英人、土屋洋道、古屋貫治、木内祐二

昭和大学医学部薬理学講座医科薬理学部門

【目的】 がん幹細胞は抗癌剤に治療抵抗性を有し、がんの再発や転移に関与する。治療抵抗性の要因としてp21を介するグルタチオン代謝経路に関わる遺伝子発現の上昇が報告された (Cell 160, 963-976, 2015)。本研究では乳癌のCD44陽性細胞を用いて、Tublin阻害剤のPaclitaxel, Eribulinおよび白金製剤Cisplatin曝露後のp21とグルタチオン代謝経路を観察した。さらにp21発現を抑制するmicroRNAを明らかとすることを目的とした。

【方法】 乳癌培養細胞はMDA-MB-231のCD44陽性細胞を用いた。PaclitaxelとEribulinおよびCisplatin 1nMを24時間曝露した後、MACS separatorを用いてCD44陽性細胞を抽出した。CD44陰性細胞をコントロールとしてp21とグルタチオンおよびCaspase-3を測定した。miRNA PCR arrayを用いてp21発現を調節するmicroRNAを検討した。

【結果】 Paclitaxel曝露後のCD44陰性細胞と陽性細胞のp21発現はそれぞれ0.36と0.34pg/ml, Eribulin曝露後は0.36と0.3 pg/ml, Cisplatin曝露後は0.41と0.31 pg/mlで、抗がん剤曝露後CD44陽性細胞のp21発現は減少し、miR-93はコントロールと比べて1.11倍増加した。グルタチオンの酸化率はPaclitaxel曝露後のCD44陽性細胞で65.3%, Eribulin曝露後は35.2%, Cisplatin曝露後は11.9%であった。グルタチオンの酸化率はPaclitaxel曝露後のCD44陽性細胞で高く発現した。Caspase-3はPaclitaxel曝露後のCD44陰性細胞と陽性細胞はそれぞれ1722と13483 nmol/mg/protein/hr, Eribulin曝露後は4040と6058 nmol/mg/protein/hr, Cisplatin曝露後は10378と8425 nmol/mg/protein/hrであった。Paclitaxel曝露後のCD44陽性細胞ではCaspase-3が有意に高く発現し、アポトーシスに導かれることが明らかとなった。

【結論】 MDA-MB-231 CD44陽性細胞はPaclitaxel曝露後miR-93増加によりp21発現を抑制することが明らかとなった。

O-3-6

3-Benzylidenechromanonesの定量的構造-細胞傷害性相関解析

○植沢芳広¹、坂上宏²、山下 毬藻³、高尾浩一³、杉田義昭³

¹明治薬科大学臨床薬剤学、²明海大学歯学部薬理学、³城西大学薬学部生物有機化学

【緒言】我々は、3-styrylchromone誘導体が高い腫瘍選択性を示すことを報告した。口腔扁平上皮癌細胞に対して高い選択毒性を有する化合物を探索するために、17種類の3-benzylidenechromanones誘導体の細胞毒性及び腫瘍選択性、そしてこれら相関する物理化学的特徴を定量的構造活性相関 (QSAR) 解析法を用いて検討した。【方法】2種のヒト口腔扁平上皮癌細胞 (歯肉由来Ca9-22, 舌由来HSC2) 及び2種の正常ヒト口腔間葉系細胞 (歯肉線維芽細胞, 歯髓細胞) に対する3-benzylidenechromanones誘導体の細胞毒性を、MTT法を用いて検討した。腫瘍選択性は、正常細胞に対する腫瘍細胞のCC50値の比として評価した。各化合物の物理化学的、構造的、量子化学的特徴量を、化学構造に基づいて取得した。すなわち、低振動モードにおける分子動力学配座解析により得られた最安定3次元配座を用い、計算機化学的手法に基づいてHOMOエネルギー、LUMOエネルギー、静電的特徴量等の多様な物理化学的特徴を算定するとともに、各特徴量のCC50値および腫瘍選択性に対する相関を解析した。【結果・考察】3-Benzylidenechromanones誘導体は全体的に高い腫瘍選択性を示した (TS=1.2~126.3)。特に、クロマノン環の7位の位置にOCH₃基、ベンゼン環の4'位にOH基あるいは、OCH₃基を置換した誘導体の腫瘍選択性 (TS = 55.2~126, 22.2~55.6) は、doxorubicin (TS=24.8~32.8)、5-FU (TS=1.9~13.1) を凌いだ。さらに、腫瘍選択性に寄与する構造的・物理化学的特徴を解明する目的でQSAR解析を実施した。化学構造式に基づき各官能基の有無を含む3000種類以上の特徴量を算出し、腫瘍選択性との相関を検討した。その結果、分子の3次元形状とサイズに関連する3D-MoRSE記述子および2次元形状と分極に関連するエッジ隣接指数が、本化合物群の腫瘍選択性を良く説明しうることを見出した ($r^2 = 0.54 \sim 0.61$)。さらに、ベンゼン環の3'位におけるOH基の導入が腫瘍選択性に対して有意に寄与していることが分った ($p = 0.0051$)。【結論】分子の形状、サイズ、および分極が3-benzylidenechromanones誘導体の腫瘍選択性の評価に有用であることが示唆された。