

Aldehyde dehydrogenase活性を指標とした悪性乳がんに対する時間薬理学的研究

原, 幸稔

<https://hdl.handle.net/2324/2348713>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (臨床薬学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

Aldehyde dehydrogenase 活性を指標とした悪性乳がんに対する時間薬理学的研究

薬剤学分野 3PS13025S 原 幸稔

【背景・目的】

乳がんは、女性における罹患率が最も高いがん種であり、現在も患者数は増加の一途を辿っている。乳がんに対する主な薬物療法はエストロゲン受容体 (Estrogen Receptor ; ER)、プロゲステロン受容体 (Progesterone Receptor ; PgR)を標的としたホルモン療法や上皮細胞増殖因子受容体 (Human Epidermal Growth Factor Receptor ; HER2)に対する阻害剤を用いた抗 HER2 療法であるが、悪性度の高い乳がん細胞ではこれら受容体の発現が低く、治療奏効率が低いことが問題となっている¹⁾。このような悪性度の高い乳がんへの罹患率は若年層で多く、その予後も悪いことから新たな治療法の開発が望まれている。

近年、腫瘍の組織学的な解析が進み、腫瘍組織が遺伝的な不均一性を示す細胞群で構成され、浸潤・転移・抗がん剤感受性・再発などに関与していることが明らかになってきた。その腫瘍組織中には Aldehyde dehydrogenase (ALDH) の活性が高値を示す「がん幹細胞」の存在が認められる。がん幹細胞はこれらの組織中に数%程度しか存在しないことが示されているが、多分化能を有し、体性幹細胞と同じような性質を備えており、腫瘍形成能、転移性能のみならず、薬剤抵抗性や放射線耐性とも深く関連している²⁾。そのため、がん幹細胞はがん化学療法の治療標的の一つとして注目されている。しかし、腫瘍組織中におけるがん幹細胞数の変容機構は未だ不明である。

一方、ヒトを始めとする多くの生物の生体機能には約 24 時間を一周期とする概日リズムが認められる。これらの概日リズムは、時計遺伝子と呼ばれる転写因子群が構成するフィードバックループ機構によって制御されている。時計遺伝子は、がんにおいても細胞増殖因子や細胞周期制御因子の発現にリズムを生じさせ、発症、病態および化学療法剤に対する感受性などに影響を及ぼしている。以上の所見より、概日時計機構が、腫瘍組織中のがん幹細胞数に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究では、悪性度の高い乳がんモデルとしてマウス乳がん細胞 4T1 を対象に、概日時計機構と腫瘍組織中のがん幹細胞数との関連性について研究した。その結果、腫瘍組織中の高い ALDH 活性を示す細胞数に概日リズムが認められ、これらのリズムは低い ALDH 活性を示す細胞により制御されていた。また腫瘍増殖は、腫瘍組織中の高い ALDH 活性を示す細胞数の概日リズムを指標にした ALDH 阻害剤の投薬により抑制され、新たな乳がんの薬物療法に応用できる可能性が示された。

【方法】**細胞培養**

マウス乳癌細胞株 4T1 は、10% FBS、1% penicillin-streptomycin を含む RPMI 培地で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養し各実験に用いた。

実験動物

九動株式会社(Saga, Japan)より購入した 4 週齢 Balb/c 雌性マウスを自由摂食水、明暗周期(7:00-19:00)、室温(24±1°C)条件下で 2-4 週間飼育し各実験に用いた。

ALDEFLUOR Assay 法を用いた ALDH 活性の測定およびセルソーティング

4T1 細胞を移植したマウスから ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 の 6 時点において腫瘍を採取し、0.25% Trypsin-EDTA 溶液中でハサミを用い裁断後、細胞を分散した。これらの細胞に対し ALDEFLUOR™ fluorescent kit (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を用いて、ALDH 活性を指標にセルソーティングおよびポピュレーション解析を行った。

マウス *Aldh3a1* 遺伝子プロモーターを対象にしたルシフェラーゼレポーターアッセイ

マウス *Aldh3a1* 遺伝子のプロモーター上の 5' 上流約 -538bp ~ -532bp に存在する TCF7L2 結合配列 (CTTTGA) に着目し、5' 上流域 -660 bp ~ +15 bp の配列を含む DNA 断片および -438 bp ~ +15 bp の配列を含む DNA 断片を増幅後、マウス *Aldh3a1* 遺伝子ルシフェラーゼレポーターベクター (*Aldh3a1*::Luc (-660) および *Aldh3a1*::Luc (-438)) を作製した。4T1 細胞に各種 Plasmid vector トランスフェクトし、ルミノメーターを用いてレポーターベクターのルシフェラーゼ活性を測定した。

Wnt10a 遺伝子ノックダウン 4T1 細胞株の作製

4T1 細胞株に *Wnt10a* shRNA 発現ベクター (pGFP-C-sh*Wnt10a* Vector; Origene Technologies, Inc., Rockville, MD) をリポフェクション法により細胞にトランスフェクションし作製した。

薬液の調製方法および投与方法

ALDH 活性阻害剤は N,N-diethylaminobenzaldehyde (DEAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用い、50 mg/kg を腹腔内に投与した。

統計解析

独立二群間比較には Student's t test を、独立多群間比較には一元配置分散分析 (One-way ANOVA) および Tukey's multiple comparisons test を用いた。2 つの要因を含む多群間比較には二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) および Tukey's multiple comparisons test を用い、有意水準 5% 以下を有意な差とした。

【結果・考察】

マウス乳がん細胞 4T1 移植腫瘍を対象にした高い ALDH 活性を示す細胞数の解析

4T1 細胞移植マウスから 6 時点において腫瘍を採取し、ALDEFLUOR Assay 法を用いて高い ALDH 活性を示す細胞数の割合を測定した。その結果、高い ALDH 活性を示す細胞数の割合は暗期前半にピークを示す有意な概日リズムを示した (Fig. 1A, B)。そこで ALDH 活性が高値を示す細胞を対象にマイクロアレイ解析を行った。その結果、ALDH のサブタイプのひとつである *Aldh3a1* の発現量が高値を示していることが明らかになった。また、*Aldh3a1* の mRNA およびそのタンパク質の発現リズムは、ALDH 活性の概日リズムとほぼ同位相を示していた (Fig. 1C, D)。以上の結果より、マ

ウスに移植した 4T1 腫瘍中における高い ALDH 活性を示す細胞数の概日リズムは、転写レベルで制御されていることが示唆された。

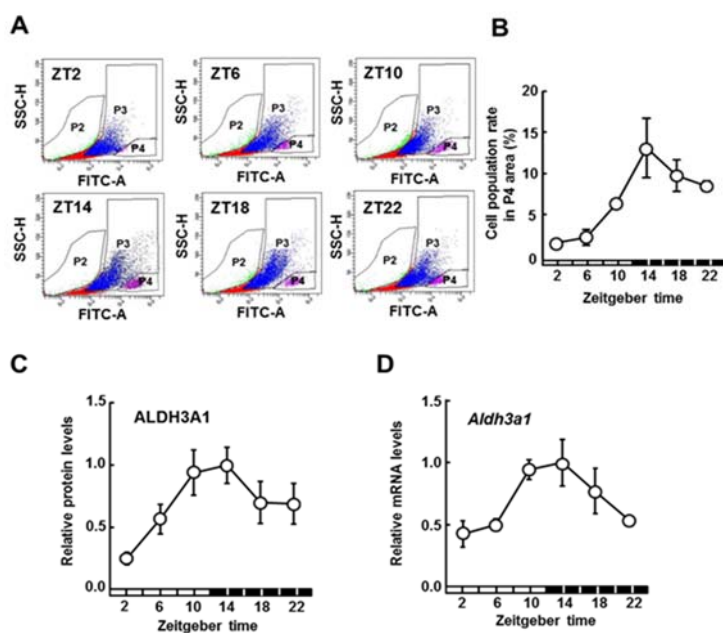


Fig. 1 マウス乳がん細胞 4T1 腫瘍中における ALDH 活性の概日リズム (A) 4T1 細胞を移植したマウスより 6 時点で腫瘍を採取し、組織を分散後、ALDEFLOUR Assay 法およびフローサイトメトリー法により、腫瘍細胞集団を解析した。P3 ゲート内の細胞を低い ALDH 活性を示す細胞、P4 ゲート内の細胞を高い ALDH 活性を示す細胞とした。(B) 4T1 腫瘍中の 6 時点における腫瘍中の高い ALDH 活性を示す細胞の割合の変動の解析結果を示している (mean ± SE, N=4)。P4 ゲート内の細胞の割合には 6 時点において有意な概日リズムが認められた ($P < 0.01$; one-way ANOVA)。(C, D) 4T1 移植マウス腫瘍を 6 時点で採取し、ALDH3A1 タンパク質発現量をウエスタンブロット法により測定し(C)、*Aldh3a1* mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した(D) (mean ± SE, N=3~6)。ALDH3A1 タンパク質および mRNA 発現量には有意な概日リズムが認められた ($P < 0.05$ for ALDH3A1 protein; $P < 0.01$ for *Aldh3a1* mRNA; one-way ANOVA)。

マウス乳がん細胞 4T1 移植腫瘍を対象にした高い ALDH 活性を示す細胞数の概日リズム制御機構

マウス *Aldh3a1* 遺伝子の 5' 上流約 -538bp ~ -532bp を対象に転写制御機構を解析した結果、Wnt/ β -CATENIN 経路によって、*Aldh3a1* 遺伝子の転写活性が制御されていることを明らかにした (Fig. 2)。また、腫瘍中では、低い ALDH 活性を示す細胞から分泌される Wnt10A の概日リズムが、高い ALDH 活性を示す細胞の ALDH3A1 発現の概日リズムに影響を及ぼすことを明らかにした (Fig. 3A, B)。以上の結果より、低い ALDH 活性を示す細胞からの Wnt10A による周期的な刺激によって腫瘍中での高い ALDH 活性を示す細胞数の概日リズムが引き起こされていることが示唆された。

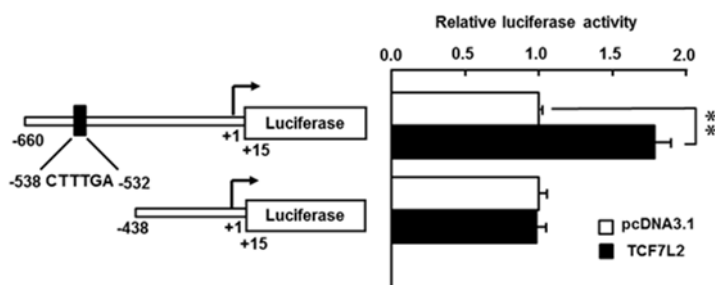


Fig. 2 マウス *Aldh3a1* 遺伝子の転写制御解析 マウスゲノム DNA を鋳型として、マウス *Aldh3a1* 遺伝子の塩基配列情報を基に設計したプライマーを用いて、PCR 反応を行い、5' 上流域 -660bp ~ +15bp の配列を含む DNA 断片および -438bp ~ +15bp の配列を含む DNA 断片を増幅し、マウス *Aldh3a1* 遺伝子ルシフェラーゼレポーターベクター (*Aldh3a1::Luc* (-660) および *Aldh3a1::Luc* (-438)) を作製し、ルシフェラーゼ活性を測定した (mean ± SE, N=3)。4T1 細胞に *Aldh3a1::Luc* (-660) と TCF7L2 の発現ベクターとを共トランスフェクトした細胞において有意に転写活性が上昇した (** $P < 0.01$; pcDNA3.1 ベクタートランスフェクト群との比較)。

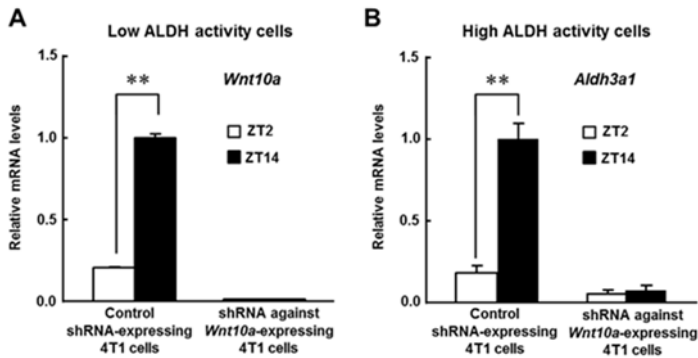


Fig. 3 4T1 腫瘍中の *Aldh3a1* 遺伝子発現に及ぼす *Wnt10a* ノックダウンの影響 (A, B) *Wnt10a* 遺伝子をノックダウンした 4T1 細胞によって形成された腫瘍内での低い ALDH 活性を示す細胞群および高い活性を示す細胞群における *Wnt10a* および *Aldh3a1* の mRNA 量を ZT2 および ZT14 の 2 時点で測定した (mean ± SE, N=5~6)。コントロール shRNA を発現する 4T1 細胞によって形成された腫瘍中の低い ALDH 活性を示す細胞群における *Wnt10a* の mRNA 量に有意な時刻差が認められ、コントロール shRNA を発現する 4T1 細胞によって形成された腫瘍中の高い ALDH 活性を示す細胞群における *Aldh3a1* の mRNA 量に有意な時刻差が認められた ($P < 0.01$ for *Wnt10a*; $P < 0.01$ for *Aldh3a1*; one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test)。

4T1 細胞移植マウスを対象とした腫瘍増殖に及ぼす ALDH 活性阻害剤の投薬時刻の影響

高い ALDH 活性を示す細胞数に概日リズムが認められた。しかしながら、これらの概日リズムが、がん細胞の増殖に及ぼす影響は不明である。そこで、腫瘍中の高い ALDH 活性を示す細胞数の概日リズムを指標に、腫瘍増殖に及ぼす ALDH 活性阻害剤である 4-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) の投薬時刻の影響を検討した。その結果、高い ALDH 活性を示す細胞数の割合が増大する暗期前半に薬物を投与した群において、腫瘍増殖抑制効果が増強されることが明らかになった。以上の結果より、高い ALDH 活性を示す細胞数が増加する時刻に ALDH 活性阻害剤を投与することで腫瘍増殖が抑制されることが示唆され、ALDH 活性の概日リズムはがん細胞の増殖に影響を及ぼしていることが示唆された (Fig. 4)。

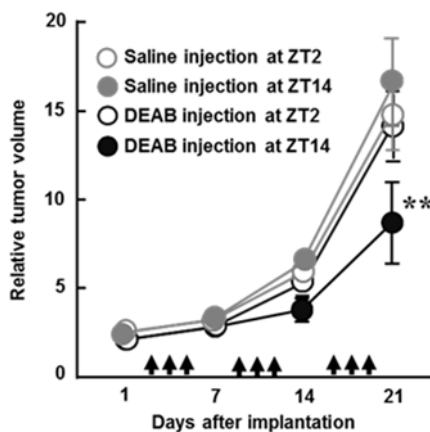


Fig. 4 4T1 腫瘍移植マウスを対象とした腫瘍増殖に及ぼす ALDH 酵素活性阻害剤 4-diethylaminobenzaldehyde (DEAB) の投与時刻の影響 ALDH 活性阻害剤である DEAB を *Aldh3a1* 遺伝子の発現が低値 (ZT2) または高値 (ZT14) を示す 2 時点に週 3 回投与し、抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した (mean ± SE, N=5)。 *Aldh3a1* 遺伝子の発現が高値を示す ZT14 投与群において有意な抗腫瘍効果の増強が認められた ($P < 0.01$; two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test)。

【総括】

本研究では、マウスに移植した 4T1 腫瘍中で高い ALDH 活性を示す細胞数に概日リズムが存在することを明らかにした。これらの概日リズムを指標にした ALDH 活性阻害剤の投薬時刻が腫瘍増殖能および転移性能に影響を及ぼすことが示唆された。本研究で得られた知見は、ALDH 活性の概日リズムを指標とするがん幹細胞を標的にした難治性乳がんの新規治療法開発に繋がる可能性が考えられる。

【参考文献】

- 1) Vandana GA et al. *Curr Breast Cancer Rep* 6: 154–158, 2014.
- 2) Reya T et al. *Nature* 414: 105-111, 2001.