

Ⅲ. ヒキガエル由来生薬成分による血中循環腫瘍細胞の根絶を目指した新規癌治療法の開発

学術研究部薬学・和漢系 助教 藤井 拓人
学術研究部医学系 講師 奥村 知之

【研究背景】

血中循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell: CTC) は、腫瘍組織から離脱して血液中へと浸潤し、全身を循環する癌細胞であり、癌の再発や転移の源であると考えられている。さらに CTC は複数の癌細胞で塊 (クラスター) を形成することで、自己複製能と腫瘍組織を構成するさまざまな系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ癌幹細胞の性質を獲得し、薬物療法や放射線治療に抵抗性を示す。従って、CTC の消失 (根絶) は、癌治療成績の劇的な向上に結びつくと期待されるが、CTC の生物学的特性については不明な点が多く、CTC を標的とした効果的な治療法は開発されていない。

本研究では、(1) 転移 (浮遊) 癌細胞および CTC におけるナトリウムポンプ (Na^+, K^+ -ATPase) の新規病態生理機能を解明すること、(2) 新規 CTC バイオアッセイモデルを構築すること、(3) ヒキガエル毒腺分泌物由来の生薬である蟾酥 (センソ) から単離・精製した種々の有効成分を用いて、 Na^+, K^+ -ATPase を標的とした新規抗がんメカニズムの解明および CTC 抑制に有力な候補生薬成分の探索を行うことを目的としている。強心配糖体による CTC 抑制メカニズムを分子レベルで明らかにすることで、 Na^+, K^+ -ATPase を標的とした新規の CTC 制御機構の解明につなげる。さらに、ヒト臨床サンプルを用いた研究を行い、強心配糖体の治療効果や本研究で見出した CTC 制御機構の有用性を検証することで、CTC 根絶を目指した新規治療法開発の研究基盤を構築する。

前年度の研究において、藤井らのグループでは、 Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 3$ -isoform ($\alpha 3\text{NaK}$) が様々な癌細胞に異常に発現していること、接着状態では細胞質内の小胞に存在する $\alpha 3\text{NaK}$ が剥離により原形質膜に移行することで剥離 (転移) 癌細胞の生存に関与することを明らかにした (Fujii, Okumura et al., *iScience*, 2021)。従って、 $\alpha 3\text{NaK}$ は CTC 抑制の標的候補分子である可能性が示唆された。また、ヒキガエル由来の 8 種類の強心配糖体がヒト大腸癌細胞の増殖能に及ぼす効果を検討し、bufalin および gamabufotalin が高い増殖抑制効果を示すことを見出した。

奥村らのグループでは、健常人ボランティアから抹消静脈血を採取し、ヒト食道癌 KYSE 細胞を混和したサンプルから密度勾配遠心により KYSE 細胞を生細胞として回収する方法を確立した。また、抹消血液中の単核球層から CTC およびその細胞フラクションを判別する画像解析システムの構築につながる成果を得た。

【本年度の成果の概略】

1. 細胞内ナトリウムポンプを標的とした新規血中循環腫瘍細胞抑制機構の解明（富山大学 学術研究部薬学・和漢系 薬物生理学：藤井 拓人）

前年度に行ったマイクロアレイ解析において、強心配糖体を肝癌由来 HepG2 細胞に処理することで、癌細胞のグルコース取込みに関与するグルコース輸送体 GLUT1 が顕著に減少することを見出した。そこで本年度は、強心配糖体による GLUT1 発現抑制機構の分子メカニズムについて検討を行い、細胞内 $\alpha 3\text{NaK}$ に強心配糖体が作用することで癌細胞の GLUT1 のエンドサイトーシスを誘導し、グルコース取り込みおよび解糖系を阻害し増殖抑制を引き起こすという新しい抗癌メカニズムを見出した (Fujii et al., J. Cell. Physiol. リバイス中)。また、ヒキガエル毒素由来の強心配糖体による Na^+, K^+ -ATPase を標的とした抗癌機構について検討を行い、bufalin および gamabufotalin が低濃度で癌細胞の膜マイクロドメインに存在する Na^+, K^+ -ATPase $\alpha 1$ -isoform ($\alpha 1\text{NaK}$) に作用することで抗癌シグナルの起点となる容積感受性アニオンチャネルの活性化を引き起こすことを見出した。

2. ヒト癌細胞を用い、白血球凝集および密度勾配遠心を利用したマウス血中循環腫瘍細胞バイオアッセイモデルの確立（富山大学 学術研究部医学系 消化器・腫瘍・総合外科：奥村 知之）

食道癌、胃癌および膵癌細胞を用いて CTC における悪性形質制御機構の解明と新規治療開発への応用を目的として、ヒト癌細胞を用いたマウス CTC バイオアッセイモデルの作成方法について検討を行った。まず、健常人血液に KYSE を混和したサンプルにおいて、密度勾配遠心法および CD45 depletion 法を組合せた CTC 捕捉法を確立し、細胞表面マーカーに対する蛍光染色を用いた画像取得と AI による解析に向けた撮影条件の最適化を行った。また、ヒト食道癌、胃癌および膵癌細胞株を皮下および胃壁内に移植したヌードマウスにおいて、採取した血液 1ml から CTC を 1 個～20 個捕捉することに成功した。

総括

これまでの研究で、藤井らにより癌細胞における Na^+, K^+ -ATPase の新規病態生理機能および強心配糖体による Na^+, K^+ -ATPase を標的とした新規癌抑制機構が明らかになり、奥村らにより新規のマウス CTC バイオアッセイモデルが構築された。次年度では、両グループの技術を結集し、CTC バイオアッセイモデルにおける Na^+, K^+ -ATPase の病態生理機能およびヒキガエル毒素由来強心配糖体による CTC 抑制メカニズムの解明にむけた研究を実施する。また奥村らが開発した CTC 捕捉法を応用し、癌患者の血液に含まれる微量の CTC 単離法を開発し、患者由来 CTC に対するヒキガエル毒素由来の強心配糖体の効果の検証を行う。さらに CTC 抑制メカニズムの解明を基盤として、新規 CTC 治療法の開発につなげる。