



Title	MCTsに着目した効果的な乳がん治療戦略の構築に関する研究
Author(s)	灘井, 崇宜
Citation	北海道大学. 博士(臨床薬学) 甲第14850号
Issue Date	2022-03-24
DOI	10.14943/doctoral.k14850
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88763
Type	theses (doctoral)
File Information	Takanobu_Nadai.pdf



[Instructions for use](#)

博士学位論文

MCTs に着目した効果的な乳がん治療戦略の
構築に関する研究

灘井 崇宜

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床薬剤学研究室

2022年3月

目次

略語表	5
序論	7
第 1 章 MCT 阻害剤と tamoxifen の併用時における tamoxifen の殺細胞効果..	10
第 1 節 緒言	10
第 2 節 実験材料および実験方法	12
第 1 項 試薬	12
第 2 項 使用細胞	12
第 3 項 RNA 抽出.....	12
第 4 項 逆転写反応	13
第 5 項 RT-PCR.....	13
第 6 項 タンパク質発現量評価	15
第 7 項 [¹⁴ C] L-lactate 輸送実験.....	16
第 8 項 細胞生存率評価	17
第 9 項 統計解析	18
第 3 節 実験結果	19
第 1 項 ER 陽性乳がん細胞に発現する ERs および MCTs の発現評価	19
第 2 項 ER 陽性乳がん細胞における乳酸輸送に関与する MCTs アイソフォームの推定	21
第 3 項 MCT 阻害剤が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響.....	22
第 4 項 フィブラート系薬物が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響.....	23
第 4 節 考察	24
第 5 節 まとめ	27
第 2 章 Tamoxifen による殺細胞効果が低下するメカニズムの解明.....	28

第1節	緒言	28
第2節	実験材料および実験方法	29
第1項	試薬	29
第2項	使用細胞	29
第3項	タンパク質発現量評価	29
第4項	細胞生存率評価	29
第5項	細胞内乳酸蓄積量の評価	30
第6項	細胞内 pH の測定	30
第7項	HIF-1 α knockdown	31
第8項	統計解析	31
第3節	実験結果	32
第1項	ER 陽性乳がん細胞における HIF-1 α タンパク質発現量の評価	32
第2項	MCT 阻害剤が HIF-1 α タンパク質発現量および細胞内乳酸蓄積量に与える影響	33
第3項	Bindarit が細胞内 pH に与える影響	35
第4項	Bindarit が MCT4 タンパク質発現に与える影響	36
第5項	HIF-1 α knockdown 時における 4-OHT の殺細胞効果	37
第6項	低酸素誘導時における 4-OHT の殺細胞効果	38
第4節	考察	40
第5節	まとめ	43
第3章	低グルコース条件下における MCT 阻害剤と tamoxifen の併用効果	44
第1節	緒言	44
第2節	実験材料および実験方法	45
第1項	試薬	45
第2項	使用細胞	45

第 3 項	タンパク質発現量評価	45
第 4 項	RNA 抽出.....	45
第 5 項	逆転写反応	45
第 6 項	Real-time PCR.....	45
第 7 項	細胞生存率評価	47
第 8 項	細胞内 ATP 量の測定	47
第 9 項	統計解析	48
第 3 節	実験結果	49
第 1 項	培養液中のグルコース濃度が HIF-1 α タンパク質発現量に与える影響	49
第 2 項	低グルコース条件下における MCTs の発現評価	50
第 3 項	グルコース濃度の違いが細胞内 ATP 量に与える影響	51
第 4 項	低グルコース条件下における MCT 阻害剤と 4-OHT の併用時の細胞生存率	52
第 5 項	低グルコース条件下における 5-OP と 4-OHT 併用時の細胞形態	53
第 6 項	低グルコース条件下における 4-OHT および 5-OP 併用時の細胞内 ATP 量の比較	54
第 7 項	低グルコース条件下における 4-OHT と 5-OP の併用が酸化ストレス関連遺伝子に与える影響	55
第 4 節	考察	58
第 5 節	まとめ	62
総括	63
参考文献	65
謝辞	75

略語表

2-ME	2-Mercaptoethanol
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
5-OP	5-Oxoproline
ATP	Adenosine triphosphate
BPB	Bromophenol blue
cDNA	Complementary DNA
CHC	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
CYP	Cytochrome P450
DDS	Drug delivery system
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERs	Estrogen receptors
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HBSS	Hank's balanced salt saline
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HRP	Horseradish peroxidase
HIF-1 α	Hypoxia inducible factor-1 α
IC ₅₀	The concentration of drug that exhibited 50% cell viability
Ki	Inhibitory constant
LDH	Lactate dehydrogenase

MCTs	Monocarboxylate transporters
mtNOS	Mitochondrial nitric oxide synthase
MTT	3-(4,5-Di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
mRNA	Messenger RNA
NAC	N-acetylcysteine
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
RIPA	Radioimmunoprecipitation
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Reverse transcription
S.E.	Standard error
SDS	Sodium dodecyl sulfate
siRNA	Small interfering RNA
SOD	Superoxide dismutase
Treg	Regulatory T cell

序論

世界の新規がん患者予測において、乳がんは最も高い割合を示しており、全体の11.7%を占めている¹⁾。また、地域別の分類では、世界の約40%をアジアが占めており、我が国においても女性の新規がん罹患部位のトップとなっている²⁾。がんは我が国における死因の第1位であり、2018年には、日本人が一生のうちのがんと診断される確率は男性が65.0%、女性が50.2%と報告され、日本人の2人に1人が、がんを発症するとされている³⁾。加えて、乳がん患者死亡数は年々増加していることから、新たな治療標的の探索は重要である²⁾。乳がんは大きく、luminal A, luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -positive, triple negative の4つのサブタイプに分類され、各サブタイプに応じた治療が行われる⁴⁾。乳がん全体の約70%をluminal Aおよびluminal Bが占めており、これらはestrogen receptors (ERs) が陽性であることから、乳がんとエストロゲンの間に深い関係があると考えられている⁵⁾。TamoxifenはER陽性乳がんに対して手術前後に汎用される代表的な抗エストロゲン薬のうちの1つである⁶⁾。生体内で、cytochrome P450 (CYP) 3A4およびCYP2D6による代謝を受け、活性代謝物である4-hydroxytamoxifen (4-OHT) ならびにendoxifenとなることが報告されている⁷⁾。4-OHTやendoxifenはtamoxifenと比較して30-100倍の高い抗エストロゲン効果に加え、酸化ストレスを生じさせることも知られている^{8,9)}。一方で、tamoxifenの5年以上の長期的な服用により耐性を示すことから、その機序ならびに耐性化の問題に対する治療戦略の確立が求められている⁶⁾。

Monocarboxylate transporters (MCTs) は14種類のアイソフォームより構成されるトランスポーターであり、主にMCT1-4は乳酸などのモノカルボン酸をpH依存的に輸送することが明らかにされている¹⁰⁾。MCT1は全身に広く発現し、細胞膜に加えて、ミトコンドリアにも局在することが報告されている¹¹⁾。また、乳酸に

対する親和性が 3.5-10 mM とされていることから、生体内では主に乳酸取り込みに寄与すると考えられている。一方、MCT4 は乳酸に対する親和性が 22-28 mM と MCT1 に比べ、低親和性のトランスポーターであることから、生体内において乳酸濃度の高い条件下で機能し、主に乳酸の排出に寄与することが示唆されている¹²⁾。グルコースは生体のエネルギー源である adenosine triphosphate (ATP) の産生に最も重要な物質である。一般的に、細胞内に取り込まれたグルコースは細胞質において解糖系により代謝され、ATP とピルビン酸が産生される。産生されたピルビン酸は、好氣的条件下においてミトコンドリアの TCA 回路および電子伝達系を介して ATP の産生に関与する。反対に、嫌氣的条件下では lactate dehydrogenase (LDH) により、乳酸に代謝される。ヒト血漿中の乳酸濃度は安静時の好氣的な条件下では 0.5-2.0 mM とされている一方で、嫌氣的な条件下では、約 20 mM まで上昇するとされている¹³⁾。正常組織では、電子伝達系を介した酸化的リン酸化が効率よく ATP を産生する。対照的に、栄養や酸素が十分に供給されない腫瘍組織では、ATP の産生に電子伝達系よりも解糖系が亢進しており、乳酸産生量が増大するとされている (Warburg 効果)¹⁴⁾。近年、がん細胞内で産生された乳酸が細胞外に排出された後、再び細胞内に取り込まれ、電子伝達系に再利用されるエネルギー獲得経路 (Reverse Warburg 効果) が提唱された¹⁵⁾。これまでに、腎がんや膀胱がん、グリオーマなどの様々ながんの腫瘍組織において MCT1 および MCT4 の高発現が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。以上より、乳酸はがんの生育に重要な役割を担っていると考えられており、特に Warburg 効果および Reverse Warburg 効果への関連が示唆されている MCT1、MCT4 を介した乳酸輸送の阻害は、がん治療戦略として注目されている^{19,20)}。これらの背景から、MCT の阻害を目的とした新規抗がん薬の開発が盛んに行われている²¹⁾。

近年の臨床研究において、乳がん組織における MCT1 および MCT4 の高い発

現が明らかとなり、予後不良に相関することが報告された^{22,23)}。しかしながら、その役割については検討の余地が残されている。

本研究では、tamoxifen と MCT 阻害剤の併用による乳がん治療効率の向上を目指して種々検討を行った。

第1章 MCT 阻害剤と tamoxifen の併用時における tamoxifen の殺細胞効果

第1節 緒言

乳酸は Warburg 効果および Reverse Warburg 効果に関連することから、がん細胞のエネルギー獲得において重要な物質であると考えられている。また血管内皮細胞内外における乳酸の増大は、腫瘍の血管新生を促進することが報告されている²⁴⁾。したがって、乳酸輸送に寄与する MCTs の阻害はがんに対する有望な治療戦略として注目されている。

これまでに、MCTs を阻害する化合物として、フロレチンやケルセチン、 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC) などが報告されているが、これらの MCT 阻害剤は親和性が低く、MCTs アイソフォーム非選択的である²⁵⁾。近年、MCT 阻害剤の開発が進み、MCT1 を標的とした阻害剤が複数報告されている^{26,27)}。特に、BAY-8002 や 7ACC2、AR-C155858 は他の MCTs アイソフォームよりも MCT1 に対して高い選択性を有しており、inhibitory constant (K_i) 値が数 nM の強力な阻害剤として注目されている。また、AR-C155858 をもとに開発された AZD3965 は実用化に向けた臨床試験が行われている (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01791595)。MCT4 を阻害する化合物として、ジクロフェナクやスタチン系薬物が知られているが、その選択性は低いものであった^{28,29)}。さらに、MCT4 に高い選択性を有する基質について探索されてはいるものの、その同定には至っていない。

当研究室では、これまでに bindarit あるいはフィブラート系薬物が MCT4 選択的な阻害剤であることを見出した³⁰⁾。また、5-oxoproline (5-OP) が MCT1 選択的な基質であることも明らかにしている³¹⁾。しかしながら、これらの MCT を阻害する化合物が、がん細胞に与える影響については不明な点が多い。

そこで本章では tamoxifen と 5-OP あるいは bindarit を MCT 阻害剤として併

用することで、tamoxifen による殺細胞効果に与える影響を評価することとした。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 試薬

4-OHT は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)より購入した。5-OP および fenofibric acid は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。Bindarit は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA) より購入した。その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用、分子生物学用のものを用いた。

第2項 使用細胞

ヒト ER 陽性乳がん細胞として MCF-7 細胞、T47D 細胞を使用した。10% fetal bovine serum (FBS; Cytiva, Tokyo, Japan) を含む high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)を培養液として使用し、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養した。

第3項 RNA 抽出

RNA の抽出には ISOGENII (ニッポンジーン, Tokyo, Japan) を使用した。6 well プレート (Corning, Corning, NY, USA) に MCF-7 細胞を 2.0×10^6 cells/well または T47D 細胞を 5.0×10^6 cells/well で播種し、72 時間後に ISOGENII 1 mL/well を加え、回収した。ISOGENII 1 mL に対して 0.4 倍量となるように nuclease free water を加え、15 秒間激しく混合した。その後室温で 5 分静置し、遠心分離 (12,000×g、15 分、4°C) を行った。この上清 1 mL に対してイソプロパノールを等量加え、転倒混和した。室温で 10 分静置した後、再び遠心分離 (12,000×g、10 分、4°C) した。上清を吸引除去し、70% エタノール 500 μL を加え、遠心分離 (10,000×g、3 分、4°C) を行う工程を 2 度行った。上清を吸引除去し、nuclease free water で RNA を溶解し、NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA)により RNA 濃度を測定した。

第 4 項 逆転写反応

逆転写反応は ReverTra Ace (東洋紡, Osaka, Japan) を用いて行った。Table 1 に示す反応液を調製し、30°Cにて 10 分、42°Cで 60 分、最後に 99°Cで 5 分の条件で反応させた。

Table 1 Component of reaction solution for reverse transcription

Component	Volume
5×RT buffer	4 μ L
dNTP Mix (10 mM each)	2 μ L
Random primer (150 ng/ μ L)	1 μ L
ReverTra Ace	1 μ L
RNA (2 μ g)	Variable
Nuclease free water	Variable
Total volume	20 μ L

第 5 項 RT-PCR

RT-PCR は KAPA Taq Extra PCR kit (日本ジェネティクス, Tokyo, Japan) により行った。Table 2 の組成に従って反応液を調製し、Scheme 1 に示した条件で反応を行った。Table 3 に示した塩基配列およびプロダクトサイズのプライマーを使用し、反応には T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用した。TAE buffer (40 mM Tris、40 mM 酢酸、1 mM EDTA) 中に沈めた 1% アガロースゲル (ニッポンジーン, Tokyo, Japan) に PCR 産物と 6×Loading Buffer (BioLabs, Tokyo, Japan) の混合物をアプライし、MARINE23ST (富士フィルム和

光純薬株式会社, Osaka, Japan) を用いて電気泳動を行った。泳動後のゲルを臭化エチジウム溶液 (ナカライテスク, Tokyo, Japan) で 10 分染色し、LAS-100 (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いてバンドを観察した。

Table 2 Component of reaction solution for RT-PCR

Component	Volume
5×KAPA Taq Extra Buffer	2 μL
dNTP Mix (10 mM each)	0.6 μL
25 mM MgCl ₂	0.2 μL
Primer mixture (5 μM each)	0.4 μL
KAPA Taq (5 U/μL)	0.1 μL
cDNA (1 μg/10 μL)	1 μL
Nuclease free water	5.7 μL
Total volume	10 μL

Scheme 1 Procedure for RT-PCR

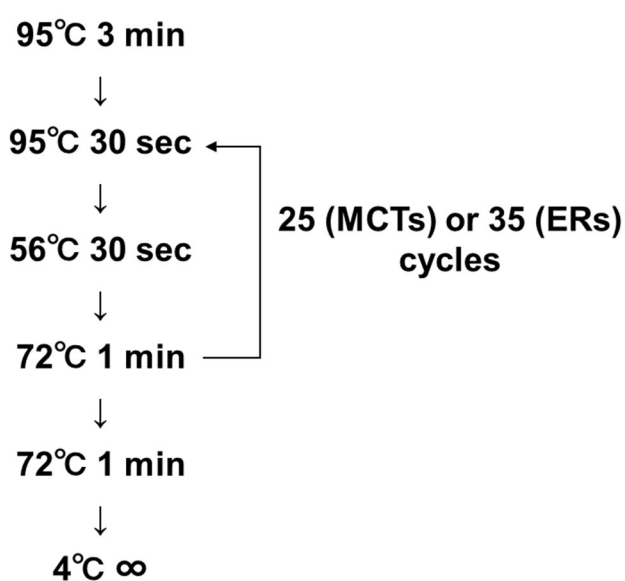


Table 3 Primer sequences for RT-PCR

Product name		Sequence	Product size
GADPH	forward	GACAAGCTTCCCGTTC	106
	reverse	CAATGACCCCTTCATT	
β -actin	forward	TGGCACCCAGCACAATGAA	186
	reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	
ER α	forward	GGTTCAAAGAGGGATGCTCA	650
	reverse	CACAAAGCCGGAATCTTCT	
ER β	forward	TACTGCATCAGATCCAAGGG	540
	reverse	ATCAATGGTGCCTGGTTGG	
MCT1	forward	CCAGCTCTGACCATGATTGG	101
	reverse	GGCGCCAGAGTACAGAGGAAC	
MCT4	forward	GTTGGGTTTGGCACTCAACTCC	112
	reverse	CAGGAAGACAGGGCTACCTGCTG	

第 6 項 タンパク質発現量評価

6 well プレートに MCF-7 細胞を 2.0×10^6 cells/well または T47D 細胞を 5.0×10^6 cells/well で播種した。細胞播種から 72 時間後、メディウムを吸引除去し、冷 phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) により 1 回洗浄した。その後、各 well に 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を溶解させた Radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を加え、氷上で 5 分間静置した。その後、セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、冷やしながら 15 分間超音波により破碎した。遠心分離 (14,000×g、10 分、4°C) した後、上清を回収したものを試料とした。タンパク質濃度は Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた BCA protein assay により測定した。その後、タンパク質量に応じて 2×sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファー (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、10% 2-mercaptoethanol (2-ME)、20% glycerol、0.004% bromophenol blue (BPB)) と等量で混合し、4°C 条件下において一晩静置した。翌日、このサンプルを 10% SDS-polyacrylamide gel

electrophoresis (PAGE)で分離し、転写 (電圧 15V、90 分) した。転写後、1% スキムミルク含有 PBS/T (0.05% Tween 20 を含む PBS) を用いてブロッキング (室温、1 時間) を行った。その後、0.5% スキムミルク PBS/T を用いて Table 4 の通りに抗体溶液を作製し、4°C条件下において一晩振とうした。翌日、PBS/T で 10 分間の洗浄を 3 回繰り返す、horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体を加え、室温で 1 時間振とうした。なお、2 次抗体には goat anti-mouse IgG₁ 抗体 (southern biotech, Birmingham, USA) または mouse anti-rabbit IgG 抗体 (sc-2357; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を 0.5% スキムミルク PBS/T を用いて 4,000 倍に希釈して使用した。振とう後、再び PBS/T を用いて 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した。その後、蛍光検出用試薬 ECL または ECL prime を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 システム (Cytiva, Tokyo, Japan) を用いてバンドを可視化した。可視化したバンドは ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) を用いて解析を行った。

Table 4 Antibody

標的タンパク	抗体 (メーカー)	希釈倍率
MCT1	sc-365501 (Santa Cruz Biotechnology)	1:250
MCT4	22787-1-AP (ProteinTech Group)	1:1000
β-actin	MAB1501 (Millipore)	1:1000

第 7 項 [¹⁴C] L-lactate 輸送実験

24 well プレートに MCF-7 細胞を 5×10^4 cells/well または T47D 細胞を 1.6×10^5 cells/well となるように播種し、培養 2~3 日後にアッセイを行った。培養液を除去し、pH 7.4 に調整した Hank's balanced salt saline (HBSS) buffer (137 mM NaCl, 25 mM glucose, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 4.2 mM

NaHCO₃, 1.2 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 10 mM HEPES (pH 7.4) or MES (pH 6.0)) 500 μL で2回洗浄した。pH 7.4 HBSS buffer を除去した後、阻害剤を含む HBSS buffer 500 μL を加え10分間インキュベートを行った。インキュベート後、HBSS buffer を除去し、阻害剤を含む [¹⁴C]-lactate 溶液 (pH 6.0) を加え、5分間インキュベートした。その後、 [¹⁴C]-lactate 溶液を除去し、氷冷した pH 7.4 HBSS buffer 1 mL で2回洗浄した。洗浄後、細胞溶解液 (1% SDS, 0.2 N NaOH) 500 μL を加えて細胞を溶解した。このうち、10 μL をタンパク定量に使用した。残りの細胞溶解液はシンチレーションバイアルに入れ、各バイアルに Ultima Gold (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 3 mL を加え、LS6500 Liquid Scintillation Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, U.S.A) で各サンプルの放射活性を測定し、細胞内取り込み量を算出した。

第8項 細胞生存率評価

細胞生存率は 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を用いて MTT assay により評価した。96 well プレートに MCF-7 細胞を 4.0×10^3 cells/well または T47D 細胞を 2.5×10^4 cells/well となるように播種し、24時間培養した。その後、メディウムを吸引除去し、各試薬を溶解させた薬液を加え、48時間培養した。なお、薬液中に含まれる dimethyl sulfoxide (DMSO) 濃度は0.2%以下とした。培養後、MTT 試薬 (同人化学研究所, Kumamoto, Japan) を PBS に0.5% となるように溶解した MTT 溶液を各 well の 1/10 量となるように添加した。1時間インキュベート後、薬液を吸引除去し、各 well に DMSO 200 μL を加え細胞を溶解させた。細胞の溶解を確認した後、主波長 590 nm における吸光度を Infinite 200 PRO multimode reader (Tecan, Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。50% 細胞増殖阻止濃度 (IC₅₀; the concentration of drug that exhibited 50% cell viability) は SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc., San Jose, CA,

U.S.A.) を用いて算出した。

第9項 統計解析

統計的有意差は、unpaired Student's t test または Dunnett's test のうち適したものを使用し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

第3節 実験結果

第1項 ER陽性乳がん細胞に発現するERsおよびMCTsの発現評価

まず初めに、使用したMCF-7細胞およびT47D細胞におけるERsの発現をRT-PCRにより評価した。その結果、両細胞においてER α およびER β の発現を確認した (Fig. 1)。また、T47D細胞では、MCF-7細胞と比較して、ER α 、ER β の高い発現が認められた。なお、triple negative乳がん細胞であるMDA-MB-231細胞では、いずれの発現も確認されなかった。次に、使用した両細胞において発現するMCTsをRT-PCRならびにwestern blotにより評価した。その結果、両細胞において、MCT1、MCT4の発現が確認された。また、MCF-7細胞ではMCT4が、T47D細胞においてはMCT1の発現が高いことが示唆された (Figs. 2a,2b)。

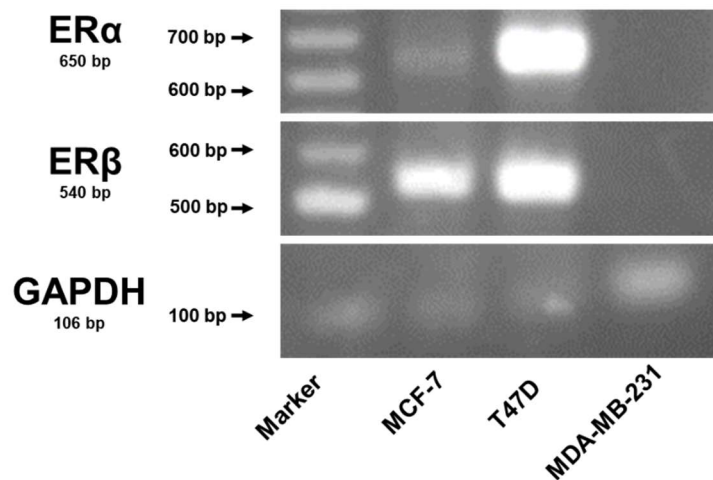


Fig. 1 Gene expression of ER α and ER β in breast cancer cell lines by RT-PCR

Gene expression of ER α (650 bp) and ER β (540 bp) was assessed by RT-PCR.

GAPDH (106 bp) was used as a housekeeping gene.

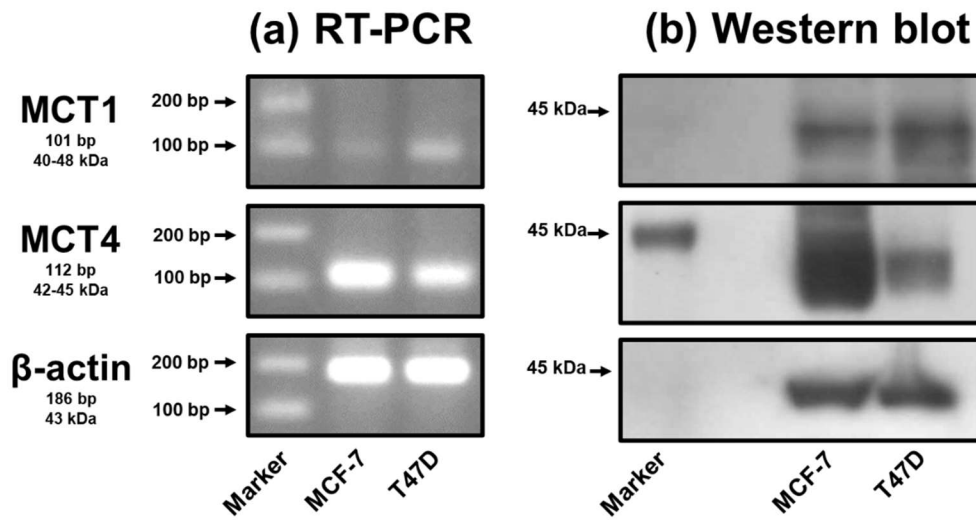


Fig. 2 Messenger RNA (a) and protein (b) expression of MCT1 and MCT4 in ER-positive breast cancer cell lines

(a) Gene expression of MCT1 (101 bp) and MCT4 (112 bp) was assessed by RT-PCR. β -actin (186 bp) was used as a housekeeping gene. (b) Western blotting of MCF-7 and T47D cells for measuring MCT1 (40–48 kDa), MCT4 (42–45 kDa) and β -actin (43 kDa) protein expression.

第2項 ER陽性乳がん細胞における乳酸輸送に関するMCTsアイソフォームの推定

前項で発現が確認されたMCT1、MCT4のうち、乳酸輸送において中心的な役割を担っているアイソフォームを推定するため、放射性同位体で標識した $[^{14}\text{C}]\text{-L-lactate}$ を用いて乳酸輸送に対する阻害実験を行った。その結果、MCT非選択的阻害剤CHC 5 mMならびにMCT4選択的阻害剤bindaritは、両細胞の乳酸輸送を約50%阻害した。また、CHC 0.1 mM条件下では、MCF-7細胞において約20%阻害した一方で、T47D細胞では有意な阻害効果を示さなかった。さらに、MCT1選択的阻害剤5-OPは、両細胞における乳酸輸送を約20%阻害した (Table 5)。

Table 5 The inhibitory effects of various MCT inhibitors on the uptake of L-lactate by ER-positive breast cancer cells

Cells	Treatment	% of Control
MCF-7	CHC 5 mM	45.3 ± 2.2 *
	CHC 0.1 mM	73.2 ± 6.1 *
	5-OP 10 mM	76.5 ± 3.9 *
	Bindarit 100 μM	45.0 ± 0.8 *
T47D	CHC 5 mM	50.8 ± 1.8 *
	CHC 0.1 mM	108.7 ± 5.3
	5-OP 10 mM	87.5 ± 2.4 *
	Bindarit 100 μM	51.6 ± 1.1 *

Effect of MCT inhibitors on the uptake of $[^{14}\text{C}]\text{-L-lactate}$ in ER-positive breast cancer cells. All uptake studies were performed at 37°C, pH 6.0, for 5 min after preincubation in the absence or presence of each MCT inhibitors at 37°C, pH 7.4, for 10 min. * $p < 0.01$ compared with control using Dunnett's test. Each value represents the mean ± standard error (S.E.) of three independent experiments.

第3項 MCT 阻害剤が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響

MCT 阻害剤が tamoxifen の殺細胞効果へ与える影響を明らかにするため、tamoxifen の活性代謝物である 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) と併用した際の細胞生存率を評価した。検討に先立ち、4-OHT 単独曝露における 4-OHT の IC_{50} を評価したところ、MCF-7 細胞では $12.4 \pm 1.4 \mu\text{M}$ 、T47D 細胞では $15.1 \pm 1.0 \mu\text{M}$ と算出された。続いて、阻害実験と同様の濃度における 5-OP、bindarit の併用が 4-OHT の殺細胞効果に与える影響について評価した。5-OP との併用時には 4-OHT の IC_{50} は、それぞれ $12.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 、 $14.3 \pm 1.0 \mu\text{M}$ となり、4-OHT の殺細胞効果に影響を与えなかった。一方、bindarit との併用における 4-OHT の IC_{50} は MCF-7 細胞で $18.2 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、T47D 細胞において $21.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$ と算出され、4-OHT の IC_{50} の有意な増大が認められた (Fig. 3)。

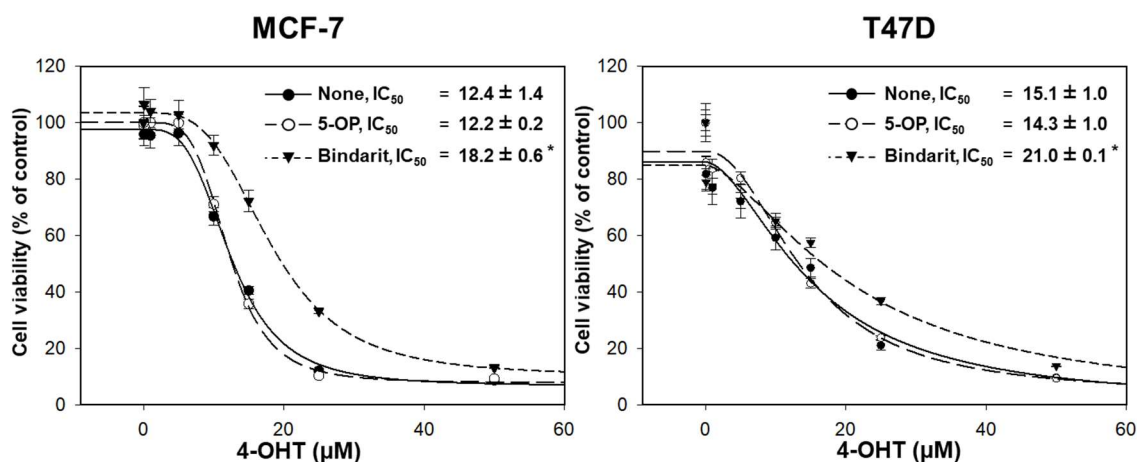


Fig. 3 Effect of 4-OHT combined with MCT inhibitors on ER-positive breast cancer cell viability

The sigmoid curve and IC_{50} values (μM) of 4-OHT cell growth inhibition were determined using the MTT assay. * $p < 0.01$, compared to the control using Dunnett's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第4項 フィブレート系薬物が4-OHTの殺細胞効果へ与える影響

Bindaritと4-OHTの併用による4-OHTの殺細胞効果の減弱がMCT4の阻害によるものであることを検証するため、他のMCT4を阻害する薬物を用いて、さらなる検討を行うこととした。当研究室では、いくつかのフィブレート系薬物がMCT1に比べ、MCT4に選択性を有する阻害剤であることを報告している³⁰⁾。そこで、fenofibric acid(フェノフィブレートの活性代謝物)を用いて、MCF-7細胞における乳酸輸送に対する阻害を評価したところ、乳酸輸送を有意に阻害することが示された(Fig. 4a)。さらに4-OHTとの併用における殺細胞効果を評価したところ、fenofibric acidとの併用によりIC₅₀は有意に増大した(Fig. 4b)。

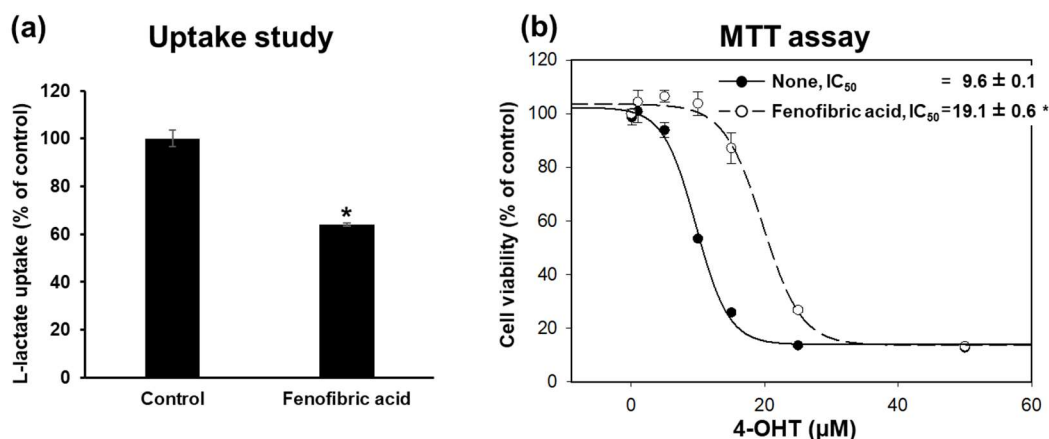


Fig. 4 Effect of fenofibric acid on the uptake of L-lactate (a) and 4-OHT-induced cytotoxicity (b) in MCF-7 cells

(a) Effect of fenofibric acid (250 μM) on the uptake of [¹⁴C]-L-lactate in MCF-7 cells. Uptake studies were performed at 37°C, pH 6.0, for 5 min after preincubation in the absence or presence of fenofibric acid at 37°C, pH 7.4, for 10 min. (b) The sigmoid curve and IC₅₀ values (μM) of 4-OHT cell growth inhibition were determined using the MTT assay. * p < 0.01, compared to the control using unpaired Student's t-test. Data are presented as the mean ± S.E. of three independent experiments.

第4節 考察

RT-PCRの結果より、実験に使用したMCF-7細胞およびT47D細胞において、ER α 、ER β の発現が認められた。さらに、triple negative 乳がん細胞であるMDA-MB-231細胞において、ER α 、ER β の発現は確認されなかった。また、MCT1およびMCT4の発現をRT-PCR、western blotにより評価したところ、MCF-7細胞ならびにT47D細胞において、両トランスポータの発現が確認された。特に、MCF-7細胞ではMCT4が、T47D細胞ではMCT1が高発現することが示唆された。これらの結果は*in vitro*実験系における既報、さらに乳がん腫瘍組織におけるMCTs発現の報告と同様の傾向を示した^{22,32)}。両細胞においてERsならびにMCTsの発現が確認されたことから、これらの細胞において放射標識した乳酸を用いて乳酸輸送に対する阻害効果を評価することとした。その結果、MCT1選択的阻害剤5-OP、MCT4選択的阻害剤bindaritならびにMCT非選択的阻害剤CHCのいずれの阻害剤も、[¹⁴C]-乳酸輸送を阻害した。CHCはMCT1に対するKi値が0.17 mM、MCT4に対するKi値が1.0 mMであることから、低濃度ではMCT1を阻害し、高濃度ではMCT1およびMCT4を阻害することが知られている³³⁾。MCF-7細胞において、CHC 0.1 mMは5-OP 10 mMと同様に約20%の阻害強度を示した。一方、CHC 5 mMは乳酸輸送を約60%阻害し、その阻害強度はbindarit 100 μ Mと同程度であった。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験系において、bindarit 100 μ MはMCT1にほとんど影響を与えず、MCT4を選択的に阻害することが明らかとされている³⁰⁾。したがって、本条件では主にMCT4を阻害していると考えられることから、ER陽性乳がん細胞における乳酸輸送はMCT4が中心的な役割を担っていることが示唆された。

続いて各ER陽性乳がん細胞における、4-OHT単独曝露による殺細胞効果を評価したところ、4-OHTのIC₅₀はMCF-7細胞では12.4 \pm 1.4 μ M、T47D細胞で

は $15.1 \pm 1.0 \mu\text{M}$ と算出された。Tamoxifen は 5 年間 20 mg/日 で服用することが一般的であることから、腫瘍組織に 4-OHT などの活性代謝物が $5 \mu\text{M}$ 以上の濃度で蓄積することが報告されている³⁴⁾。本検討において、算出された IC_{50} は臨床におけるがん治療において、有効と考えられる腫瘍内濃度を反映していることが示唆された。次に、5-OP または bindarit と 4-OHT を併用し、各細胞の生存率に及ぼす影響を評価したところ、5-OP の併用において有意な差は認めなかった一方で、bindarit の併用は 4-OHT の IC_{50} を増大させた。そこで、bindarit 併用時における 4-OHT 殺細胞効果の減弱が MCT4 の阻害によるものであることを検証するため、MCT1 と比較して MCT4 の阻害効果を有することが知られている fenofibric acid を用いて、さらなる検討を行った³⁰⁾。その結果、fenofibric acid は乳酸輸送を阻害し、4-OHT との併用時において、有意に IC_{50} を増大させた。以上より、MCT4 を介した乳酸輸送の阻害が 4-OHT の殺細胞効果を減弱させる可能性が示された。

今回の結果から、MCT4 の阻害が tamoxifen の殺細胞効果を減弱させる可能性が示唆された。これらの結果はフィブレート系薬物においても確認されたことから、MCT4 を阻害する他の薬物においても tamoxifen の殺細胞効果が減弱する可能性が推察される。近年、MCF-7 細胞において、MCT4 を阻害するスタチン系薬物であるシンバスタチンと 4-OHT の併用により、本結果と同様に 4-OHT の殺細胞効果が減弱することが報告された³⁵⁾。本論文において、シンバスタチンは 4-OHT の取り込みに影響を与えないことが示唆されている。本検討では 4-OHT の取り込みについて検証できていないことから、今後の検討が必要である。また、Tamoxifen などの抗ホルモン薬は副作用として、脂質代謝異常を引き起こすことが報告されており、tamoxifen による nonalcoholic steatohepatitis (NASH) が生じた際に、tamoxifen とフィブレートを併用して治療を継続した症例が報告されている^{36,37)}。今後、乳がんモデルラットを用いた *in*

vivo の系や tamoxifen とこれらの MCT4 を阻害する医薬品が tamoxifen の抗腫瘍効果に対してどのような効果を与えるのか詳細な検討が望まれる。

第5節 まとめ

本章では、乳がん細胞における MCTs 発現を評価するとともに乳酸輸送に中心的な役割を担う MCT アイソフォームを推定した。その結果、ER 陽性乳がん細胞では MCT1 および MCT4 が発現しており、特に、MCT4 が乳酸輸送において中心的な役割を担う可能性を示した。そこで、MCT 阻害剤の併用時における 4-OHT の殺細胞効果を評価したところ、MCT4 阻害剤 bindarit は 4-OHT の殺細胞効果を減弱させた。さらに、MCT4 を選択的に阻害する fenofibric acid と 4-OHT の併用は bindarit と同様の傾向を示した。これらの結果から、MCT4 の阻害は 4-OHT の殺細胞効果を減弱させる可能性を見出した。

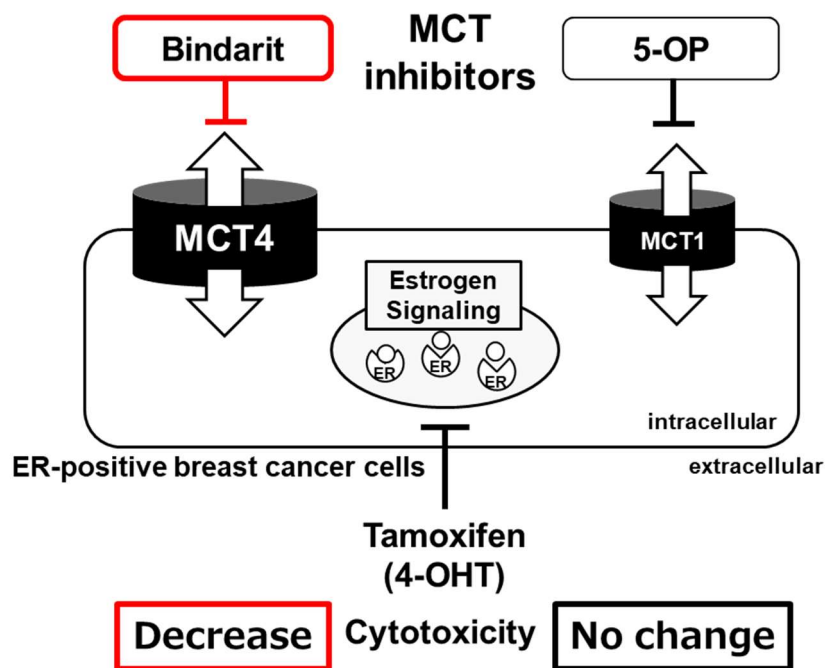


Fig. 5 Summary of section 1

第2章 Tamoxifenによる殺細胞効果が低下するメカニズムの解明

第1節 緒言

前章より、ER陽性乳がん細胞における乳酸輸送に寄与するMCT4を阻害することで、4-OHTの殺細胞効果が減弱することが示された。この原因を明らかにするため、tamoxifen耐性乳がん組織において発現増大が報告されているhypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)に着目した³⁸⁾。HIF-1 α は低酸素状態(嫌気的な条件)においてその発現が誘導される転写因子の1つである。固形腫瘍内の低酸素状態となっている領域ではHIF-1 α の高い発現が認められており、主にがんのエネルギー獲得経路として考えられている解糖系の酵素群を誘導することが報告されている³⁹⁾。さらに、細胞内乳酸量の上昇に伴い発現が増大することに加え、乳酸を排出すると考えられているMCT4の発現を正に制御することから、細胞内の乳酸濃度の調節にも関与すると考えられている^{40,41)}。また、HIF-1 α の発現はER α と逆相関することが報告されていることから、HIF-1 α と乳がん患者の生存との関連にも注目が集まっている^{42,43)}。しかしながら、tamoxifen耐性乳がんとHIF-1 α の関連性を示唆する報告は限定的であり、不明な点も多い。本章では、MCT4の阻害によるHIF-1 α の発現増大が4-OHTの殺細胞効果の減弱の一因となるのではないかと予想し、HIF-1 α が4-OHTの殺細胞効果に与える影響について、siRNAを用いたknockdownおよび低酸素条件下において評価した。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 試薬

第1章 第2節 第1項と同様のものを使用した。

第2項 使用細胞

第1章 第2節 第2項と同様のものを使用した。

なお、低酸素条件は、BIONIX 低酸素培養キット (株式会社スギヤマゲン, Tokyo, Japan) により誘導し、MCF-7 細胞では 1% O₂ 条件下、T47D 細胞では 5% O₂ 条件下で検討を行った。

第3項 タンパク質発現量評価

第1章 第2節 第6項と同様に行った。なお、使用した抗体は Table 6 に示した。

Table 6 Antibody

標的タンパク	抗体 (メーカー)	希釈倍率
MCT4	22787-1-AP (ProteinTech Group)	1:1000
HIF-1 α	sc-10790 (Santa Cruz Biotechnology)	1:200
β -actin	MAB1501 (Millipore)	1:1000

第4項 細胞生存率評価

細胞生存率は第1章 第2節 第8項と同様に行った。

第5項 細胞内乳酸蓄積量の評価

細胞内乳酸蓄積量は比色乳酸アッセイキット (Cell BIOLABS, Inc., San Diego, CA, USA) を用いて測定した。6 well プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように MCF-7 細胞を播種した。24 時間後、メディウムを吸引除去し、各試薬を溶解させた薬液を添加し 48 時間培養した。培養後、assay buffer を用いて細胞を回収し、製品プロトコールに従って細胞内乳酸量を測定した。

第6項 細胞内 pH の測定

細胞内 pH の測定には pH 感受性の蛍光指示薬である BCECF-AM (同人化学研究所, Kumamoto, Japan) を使用した。MCF-7 細胞を 6 well プレートに 2.0×10^5 cells/well となるように播種した。24 時間後、メディウムを吸引除去し、薬液を加え、さらに 48 時間培養した。培養後、冷 PBS により 1 回洗浄し、再度冷 PBS を 1 mL 加え、セルスクレーパーにより細胞を回収した。遠心分離 ($10,000 \times g$, 5 min, $4^\circ C$) 後、上清を吸引除去し、HEPES buffer (5 mM glucose, 20 mM HEPES, 5 mM KCl, 153 mM NaCl) を加えて、 1×10^6 cells/mL の細胞懸濁液とした。これを、 $37^\circ C$ で 3 時間インキュベートした後、BCECF-AM を $1 \mu M$ となるように添加し、さらに 10 分間インキュベートした。その後、遠心分離 ($10,000 \times g$, 5 min, $20^\circ C$) したのち、上清を吸引除去し、HEPES buffer 1 mL に懸濁する。これを 2 回繰り返す、細胞浮遊液とした。この細胞浮遊液 100 μL を遠心分離 ($10,000 \times g$, 5 min, $20^\circ C$) し、上清を吸引除去し、サンプルには HEPES buffer を 400 μL 加えた。これを 96 well black plate (Corning, Corning, NY, USA) に 200 μL 移し、蛍光波長 525 nm 励起波長 488 nm または励起波長 439 nm で測定した。

検量線については細胞浮遊液 100 μL を遠心分離 ($10,000 \times g$, 5 min, $20^\circ C$) し、上清を吸引除去し、pH を 6.4, 6.8, 7.2, 7.4, 7.8, 8.0 に調整した Calibration buffer

(10 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM Na-MOPS, 130 mM KCl) を 400 μ L 加えた。これに nigericin を終濃度 10 μ g/mL となるように加え、10 分間インキュベートした。これをサンプルと同様の条件で蛍光を測定した。

第 7 項 HIF-1 α knockdown

siRNA を用いた knockdown は Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen, Waltham, MA, U.S.A.) を用いて行った。細胞への siRNA の導入は製品プロトコールに従い、リバーストランスフェクション法により行った。siRNA の導入 24 時間後にメディウムを吸引除去し、各試薬を含むメディウム中で 48 時間インキュベートし、実験に使用した。HIF-1 α 遺伝子に対する Silencer[®] Validated siRNA (siRNA ID No.42840)、negative control として使用した Silencer[®] negative control siRNA は、Ambion 社 (Austin, TX, U.S.A.) より購入した。

第 8 項 統計解析

統計的有意差は、unpaired Student's t test または Dunnett's test のうち適したものを使用し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

第3節 実験結果

第1項 ER陽性乳がん細胞における HIF-1 α タンパク質発現量の評価

まず始めに MCF-7 細胞および T47D 細胞における HIF-1 α タンパク質発現量の評価を western blot により評価した。その結果、T47D 細胞と比較して、MCF-7 細胞において HIF-1 α タンパク質の高い発現が認められた (Fig. 6)。以降の検討については、特に記載しない限り HIF-1 α 発現が認められた MCF-7 細胞を用いて行った。

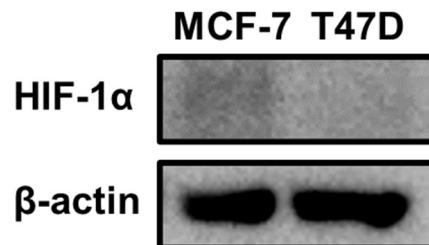


Fig. 6 HIF-1 α protein expression in ER-positive breast cancer cells

HIF-1 α protein levels were analyzed by western blot analysis in ER-positive breast cancer cells.

第 2 項 MCT 阻害剤が HIF-1 α タンパク質発現量および細胞内乳酸蓄積量に与える影響

次に、MCT1 選択的阻害剤 5-OP と MCT4 選択的阻害剤 bindarit が HIF-1 α タンパク質発現量に与える影響を評価した。その結果、bindarit 曝露において有意な HIF-1 α の発現増大が認められた (Fig. 7)。さらに、MCT 阻害剤曝露時の細胞内乳酸蓄積量を評価したところ、bindarit は顕著に細胞内乳酸蓄積量を増加させた (Fig. 8)。一方、5-OP 曝露は HIF-1 α 発現量ならびに乳酸蓄積量に影響を与えなかった。

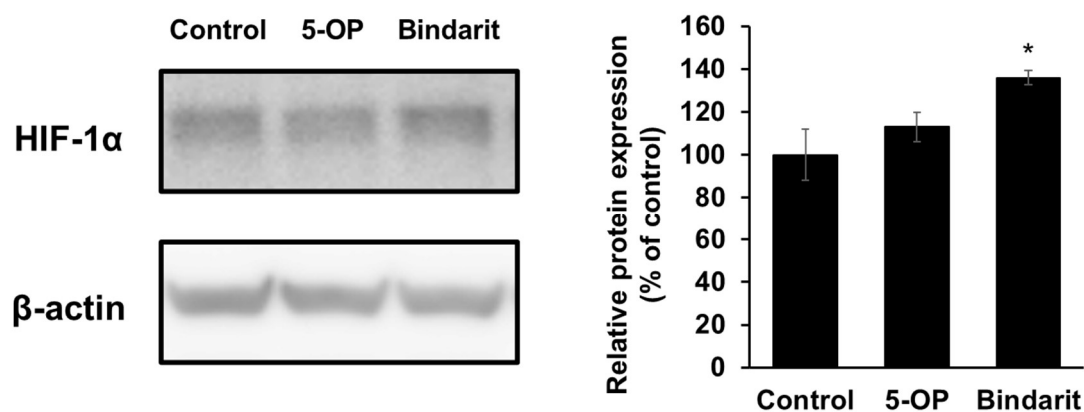


Fig. 7 Effect of bindarit and 5-OP on HIF-1 α protein levels in MCF-7 cells

HIF-1 α protein expression levels were analyzed by western blot analysis in MCF-7 cells. * $p < 0.05$ compared with control versus each group using Dunnett's test. Each data point represents the mean \pm S.E. of three independent experiments.

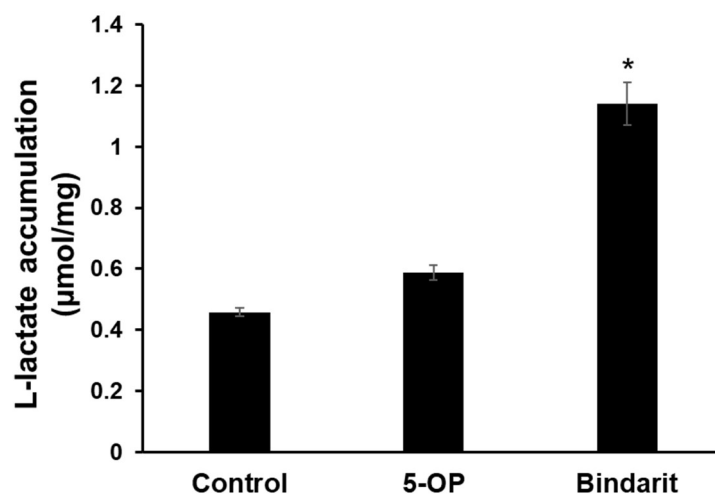


Fig. 8 Effect of bindarit and 5-OP on L-lactate accumulation in MCF-7 cells

L-lactate accumulation was measured using a colorimetric lactate assay kit according to the manufacturer's instructions. The levels of L-lactate were corrected for the protein content. * $p < 0.01$, compared to the control using Dunnett's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第3項 Bindarit が細胞内 pH に与える影響

MCT4 は H^+ と乳酸を共輸送するトランスポーターである⁴⁴⁾。そこで前項において認められた細胞内乳酸蓄積量の増加が、MCF-7 細胞内の pH に与える影響について評価した。その結果、bindarit 曝露により細胞内 pH が低下する傾向が認められた (Fig. 9)。

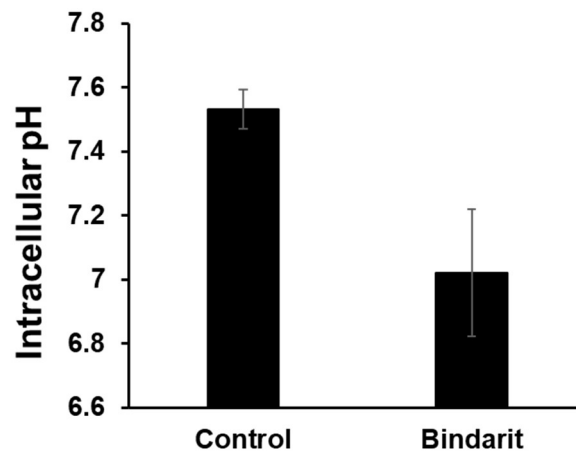


Fig. 9 Effect of bindarit on intracellular pH in MCF-7 cells

Intracellular pH was measured by BCECF-AM. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第4項 Bindarit が MCT4 タンパク質発現に与える影響

HIF-1 α が MCT4 を正に制御することから、bindarit 曝露による HIF-1 α タンパク質発現量の増大が MCT4 のタンパク質発現に与える影響を評価した。その結果、bindarit 曝露は、MCT4 の発現を有意に増大させることが示された (Fig. 10)。

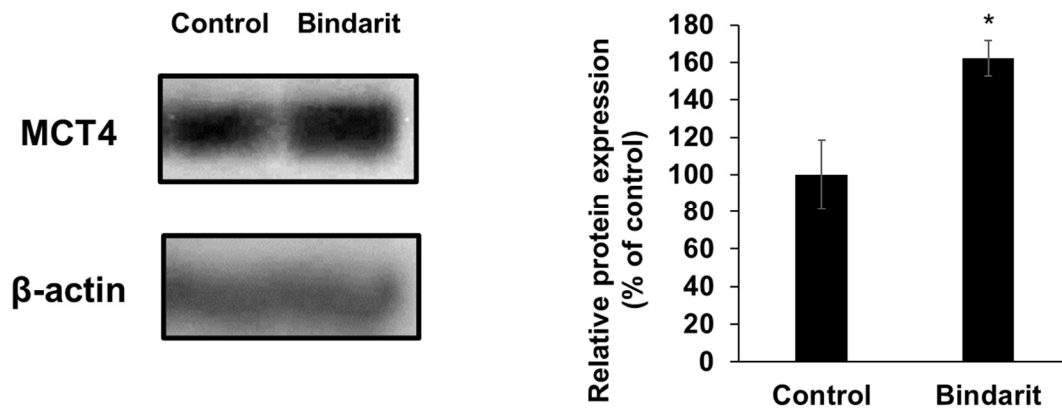


Fig. 10 Effect of bindarit on MCT4 protein expression in MCF-7 cells

MCT4 protein expression levels were analyzed by western blot analysis in MCF-7 cells. * $p < 0.05$ compared to the control using unpaired Student's t-test.

Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第5項 HIF-1 α knockdown 時における 4-OHT の殺細胞効果

次に HIF-1 α のタンパク質発現の変化が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響を検証するため、まず HIF-1 α の knockdown を行った。Negative control において、hypoxia mimic である cobalt は HIF-1 α タンパク質発現量を増大させた。一方、HIF-1 α siRNA 処理において、control および cobalt 曝露における HIF-1 α タンパク質発現は顕著に抑制された (Fig. 11a)。そこで、本条件下における 4-OHT の殺細胞効果を評価したところ、4-OHT の IC₅₀ は有意に低下した (Fig. 11b)。

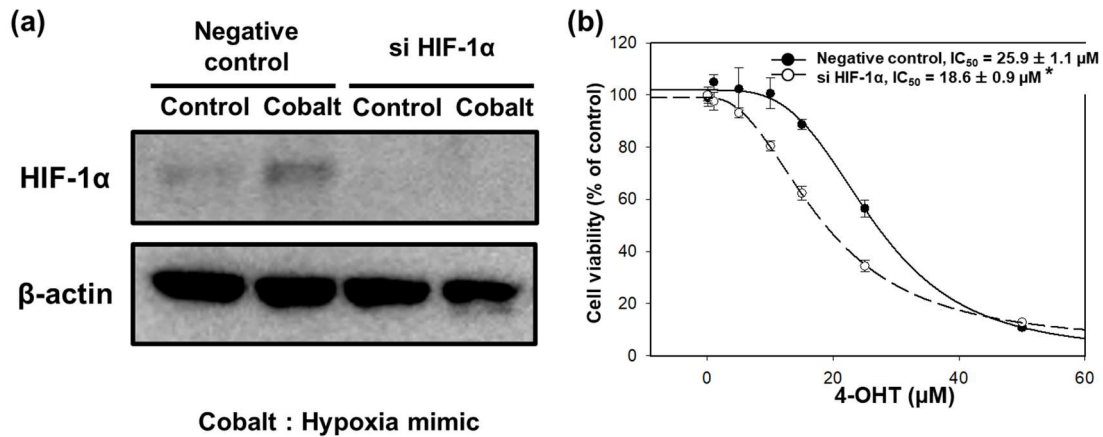


Fig. 11 Effects of HIF-1 α siRNA on HIF-1 α expression (a) and cell sensitivity to 4-OHT (b) in MCF-7 cells

(a) Expression of HIF-1 α protein levels after siRNA transfection was analyzed by western blot analysis in MCF-7 cells. (b) The sigmoid curve and IC₅₀ values (μ M) of 4-OHT cell growth inhibition by MTT assay in MCF-7 cells. * $p < 0.01$ compared with control by unpaired Student's t-test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第6項 低酸素誘導時における4-OHTの殺細胞効果

前項において、HIF-1 α knockdownが4-OHTの殺細胞効果を増強させたことから、次に低酸素条件下におけるHIF-1 α の誘導が4-OHTの殺細胞効果へ及ぼす影響を評価した。MCF-7細胞において、低酸素条件下におけるHIF-1 α 発現量をwestern blotにより評価したところ、HIF-1 α タンパク質は有意に増大した (Fig. 12a)。また、第2章 第3節 第1項でHIF-1 α の低い発現が認められたT47D細胞においても同様にHIF-1 α の発現増大が認められた (Fig. 12b)。そこで、低酸素条件下における4-OHTの殺細胞効果を評価したところ、両細胞で有意なIC₅₀の増大が認められた (Figs. 12c, 12d)。

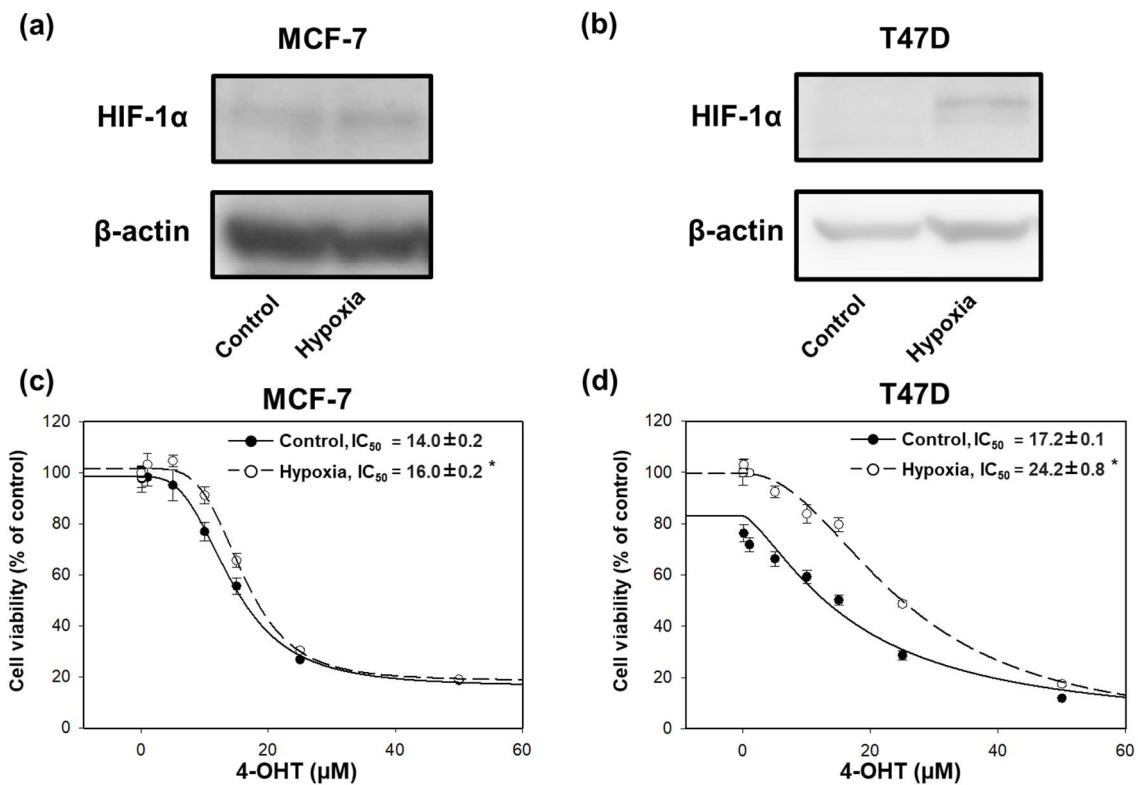


Fig. 12 Effect of hypoxia on HIF-1 α protein expression (a, b) and cell viability of ER-positive breast cancer cells treated with 4-OHT (c, d)

ER-positive breast cancer cells were exposed to hypoxic conditions at 1% O₂ in MCF-7 cells (a) or 5% O₂ in T47D cells (b) for 72 h, and HIF-1 α protein levels were measured by western blotting. The sigmoid curve and IC₅₀ values (μ M) of 4-OHT cell growth inhibition under hypoxic conditions (1% O₂ in MCF-7 cells or 5% O₂ in T47D cells) for 48 h were determined by the MTT assay. * $p < 0.01$, compared to the control using unpaired Student's t-test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第4節 考察

本章では、前章で認められた MCT4 の阻害が 4-OHT の殺細胞効果を減弱するメカニズムを明らかにするため、tamoxifen の耐性化に関わり、かつ MCT4 の発現を調節する HIF-1 α に着目して、検証を行った。

まず始めに、HIF-1 α の発現量を western blot により評価したところ、T47D 細胞と比較して MCF-7 細胞では高い発現が確認された。この結果は第1章 第3節 第1項 RT-PCR による ER α 発現の結果と逆相関を示し、既報と合致していた⁴⁵⁾。次に MCT 阻害剤を曝露した際の HIF-1 α タンパク質発現量を評価したところ、MCT4 阻害剤 bindarit 曝露において有意に増大した。その際の細胞内乳酸蓄積量は顕著に増加すること、さらに細胞内 pH は減少する傾向が認められた。MCT4 は低親和性の乳酸輸送担体であり、乳酸をプロトンとともに細胞外へ排出する役割が示唆されている⁴⁴⁾。したがって、本検討において、bindarit が細胞外への乳酸およびプロトンの排出を阻害することで、細胞内の乳酸蓄積量が増大したのではないかと考えられる。Hunt らは、細胞内の乳酸量が増加することで HIF-1 α の発現増大が生じることを報告しており⁴¹⁾、本検討においても、細胞内の乳酸量が増加することにより、HIF-1 α タンパク質発現量が増大したことが推察される。一方、本検討において、乳酸蓄積量が増大しているにも関わらず、顕著な細胞死は確認されなかった。In vivo の検討において、正常組織では細胞内 pH は 7.3-7.4 である一方、腫瘍組織では細胞内 pH は 6.9-7.2 と正常組織よりも幅広い pH に適応できることが示されている⁴⁶⁾。さらに、細胞内乳酸量の増大は正常細胞においてアポトーシスを誘導する一方で、腫瘍細胞は、アポトーシスが生じにくいことも報告されている⁴⁷⁾。以上より、乳がん細胞を用いた今回の検討では、細胞内乳酸量の蓄積が細胞生存率に大きく影響を与えないことが推察された。また、bindarit 曝露時の MCT4 タンパク質発現量を評価したところ、有意な発現量の増大が確認された。この原因として、細胞内の乳酸の蓄積を回避す

るために HIF-1 α の upregulation を介して、乳酸を排出する MCT4 の発現量を増大させていることが考察された。

続いて、bindarit による HIF-1 α タンパク質発現量の増大が 4-OHT の殺細胞効果に与える影響を明らかにするため、HIF-1 α knockdown 条件下および低酸素条件下における 4-OHT の殺細胞効果を評価した。その結果、HIF-1 α knockdown による IC₅₀ の低下および低酸素条件下において IC₅₀ の増大が確認されたことから、4-OHT による殺細胞効果は HIF-1 α タンパク質発現量に依存することが示唆された。これらの結果は、tamoxifen 耐性乳がん患者において HIF-1 α タンパク質発現量が増大する報告を支持するものであると考えられる³⁸⁾。近年のメタアナリシスによる報告から、乳がん組織における HIF-1 α の発現量の増大が乳がん患者の無病生存期間と全生存期間の短縮と関連していることが明らかとされている⁴³⁾。また、胃がん細胞株である SGC7901 細胞を用いた検討では、HIF-1 α タンパク質発現量の増大に伴い、シスプラチンや 5-FU、ビンクリスチン、アドリアマイシンに耐性を獲得することが示唆されている⁴⁸⁾。これらの報告を踏まえると本検討における、tamoxifen の効果減弱の機序として MCT4 の阻害による HIF-1 α のタンパク質発現量の増大が強く示唆される。近年の臨床研究では多くのがん細胞において、HIF-1 α の高い発現が認められており、HIF-1 α の阻害を目的とした阻害剤の探索が進められている⁴⁹⁾。最近、HIF-1 α の発現増大に起因した tamoxifen 耐性乳がん細胞株において、バイカレインが HIF-1 α の発現および転写を抑制することにより、4-OHT によるミトコンドリア ROS を増大させ、4-OHT に再感作させることが報告された⁵⁰⁾。また、グルコースの取り込みを阻害する 2-deoxyglucose や解糖を阻害する dichloroacetate が乳がん細胞の増殖を抑制するとともに、HIF-1 α 発現を抑制し、細胞を抗がん薬に感作させることが示唆されている⁵¹⁻⁵³⁾。以上より、HIF-1 α の阻害剤を併用することで、4-OHT の殺細胞効果が上昇する可能性が示された。

近年、がん微小環境が、細胞死耐性や薬剤耐性の獲得を介して、がんの悪性化に寄与すると考えられており、がん細胞により産生される乳酸および乳酸輸送に関わる MCTs はその形成に関わることが示唆されている⁵⁴⁾。これまで、制御性 T 細胞 (Treg) は主に自己免疫疾患の抑制に関与するとされていたが、近年がん微小環境下における Treg が、エフェクター T 細胞の作用を低下させることにより、免疫系からの攻撃を回避させることが明らかにされた。また、最近の Watson らの報告では、Treg が乳酸をエネルギーとして活性化できることが明らかとなった⁵⁵⁾。Treg を含め免疫細胞の多くに、MCT1 の発現が認められていることから、MCT1 の阻害により、Treg 活性化を抑制できることが推察される⁵⁶⁾。しかしながら、MCT1 はがん細胞以外にも恒常的な発現が認められていることから、MCT1 阻害剤の使用により、他の組織においてもその影響が生じることが予測される。したがって、Treg やがん細胞などの生体内に悪影響を及ぼすターゲットを選択的に阻害するような drug delivery system (DDS) およびターゲティングが求められる。本検討では、MCT4 の阻害は HIF-1 α のタンパク質発現量を増大させることで、4-OHT の殺細胞効果を低下させる一方で、MCT1 の阻害は HIF-1 α の発現量ならびに 4-OHT の殺細胞効果に影響を与えなかった。これらの結果から MCT1 を標的としたがん治療戦略の構築が有望であると考えられる。

第5節 まとめ

本章では、MCT4 阻害剤 bindarit と 4-OHT の併用により、4-OHT の殺細胞効果が低下するメカニズムについて、tamoxifen 耐性乳がん組織において高発現し、かつ MCT4 の発現調節に関連することが報告されている HIF-1 α に着目して検討を行った。その結果、bindarit は細胞外への乳酸の排出を抑制し、細胞内乳酸蓄積量の増大を介して、HIF-1 α タンパク質を増大させることが示された。また、HIF-1 α タンパク質発現量の変化が 4-OHT の殺細胞効果に与える影響を評価したところ、4-OHT の殺細胞効果は HIF-1 α knockdown 条件下において増強され、低酸素条件下において減弱した。以上より、MCT4 阻害剤 bindarit は HIF-1 α タンパク質発現量の増大を介して、4-OHT の殺細胞効果を低下させる可能性が示された⁵⁷⁾。

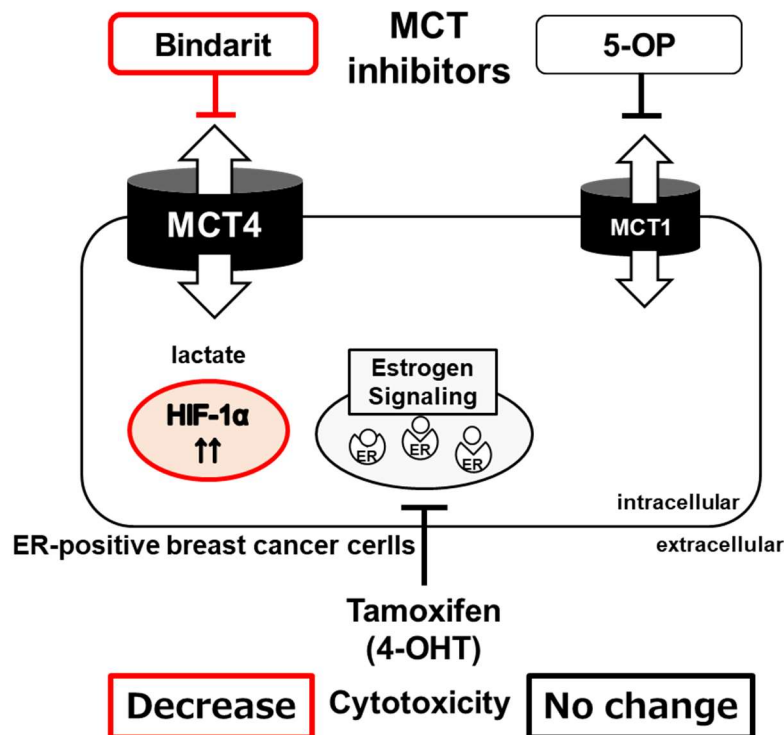


Fig. 13 Scheme of section 2

第3章 低グルコース条件下における MCT 阻害剤と tamoxifen の併用効果

第1節 緒言

前章において、MCT4 の阻害により、産生された乳酸が細胞内に蓄積することで、HIF-1 α タンパク質発現量が増大し、4-OHT の殺細胞効果を減弱させる可能性を示した。膵臓がん由来細胞である BxPC-3 細胞を用いた先行研究より、培養液中のグルコース濃度に依存して HIF-1 α の発現は増大することから、細胞外のグルコース濃度が低下すると、HIF-1 α 発現の低下につながるものが考えられる⁵⁸⁾。また、HIF-1 α はその発現の増大に伴い、ミトコンドリア機能を抑制して解糖系を促進することが知られている⁵⁹⁾。さらに近年、結腸がん由来細胞である HT-29 細胞における検討において、培地中のグルコース濃度が低下することにより、酸化的リン酸化の割合が増大することが報告された⁶⁰⁾。前章までは、解糖系に依存して増殖するがん細胞の生育に適した高グルコース (25 mM) 条件下で検討を行ってきた。一方、生体内ではグルコース濃度が約 5 mM 前後であることから、生体内の条件を反映した低グルコース (5.5 mM) 条件での検討を行うことで、HIF-1 α の発現の低下と酸化的リン酸化の割合を高めた条件下で検討ができると考えた⁶¹⁾。

以上のことから、細胞内のエネルギー獲得経路の変化により、がん細胞の生育に対する MCTs 阻害の効果が変わるのではないかと仮説を立て、本章では低グルコース条件下における MCT 阻害剤および 4-OHT の併用効果について種々検討を行った。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 試薬

第1章 第2節 第1項と同様のものを使用した。

第2項 使用細胞

第1章 第2節 第2項と同様のものを使用した。なお、実験には MCF-7 細胞を使用した。低グルコース条件下の検討では、1 継代前に low glucose DMEM (和光純薬, Osaka, Japan) に変更して培養し、実験に用いた。

第3項 タンパク質発現量評価

第1章 第2節 第6項と同様に行った。

第4項 RNA 抽出

第1章 第2節 第3項と同様に行った。

第5項 逆転写反応

第1章 第2節 第4項と同様に行った。

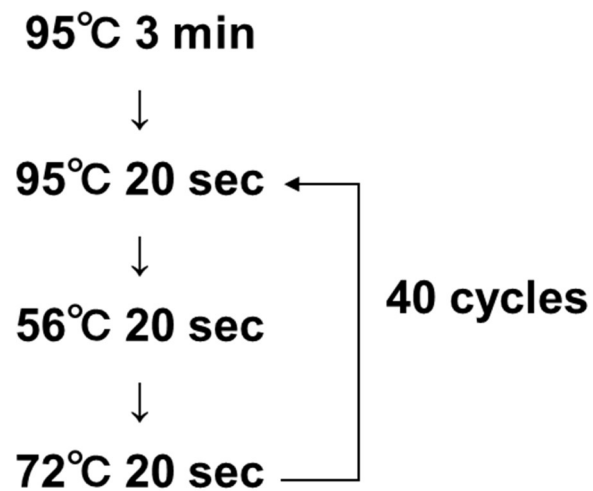
第6項 Real-time PCR

Real-time PCR は、KAPA SYBR Fast qPCR kit (日本ジェネティクス, Tokyo, Japan) を用いて行った。反応液を Table 7 のように調製し、Scheme 2 に示した条件で反応を行った。反応および検出には LightCycler[®]480 System II (Roche, Basel, Switzerland) を使用した。

Table 7 Component of reaction solution for real-time PCR

Component	Volume
2×KAPA SYBR	2.5 μ L
Template DNA	1 μ L
Primer mixture (10 μ M each)	0.2 μ L
Nuclease free water	1.3 μ L
Total volume	5 μ L

Scheme 2 Procedure for real-time PCR



なお、使用したプライマーの配列を Table 8 に示した。

Table 8 Primer sequences for real-time PCR

Product name		Sequence	Product size
GADPH	forward	GACAAGCTTCCCGTTC	106
	reverse	CAATGACCCCTTCATT	
MCT1	forward	CCAGCTCTGACCATGATTGG	101
	reverse	GGCGCCAGAGTACAGAGGAAC	
MCT4	forward	GTTGGGTTTGGCACTCAACTTCC	112
	reverse	CAGGAAGACAGGGCTACCTGCTG	
c-MYC	forward	CGAGGAGAATGTCAAGAGGCGAAC	174
	reverse	GCTTGGACGGACAGGATGTATGC	
SOD1	forward	TGGCCGATGTGTCTATTGAAG	143
	reverse	TCCAGCGTTTCCTGTCTTTG	
SOD2	forward	GGTTGGCTTGGTTTCAATAAGG	121
	reverse	CGTGCTCCCACACATCAATC	
SOD3	forward	GATCTGGCAGGAGGTCATG	159
	reverse	AAGAAGGCGTCGAGCTTG	
Nrf2	forward	AATGAGGTTTCTTCGGCTACG	139
	reverse	CGTCTAAATCAACAGGGGCTAC	

第7項 細胞生存率評価

細胞生存率は第1章 第2節 第8項と同様に行った。

第8項 細胞内 ATP 量の測定

細胞内 ATP 量は『細胞の』ATP 測定試薬™ Ver.2 (東洋ビーネット, Tokyo, Japan) により測定した。96 well プレートに MCF-7 細胞を 4.0×10^3 cells/well で播種し、24 時間培養した。その後、メディウムを吸引除去し、薬液を加え、さらに 48 時間培養した。培養後、メディウムを吸引除去し、ATP 測定試薬とメディウムを等量で混合し、100 μ l/well 加えた。これを 22°C で 10 分間インキュベートし、発光を測定した。なお、薬液中に含まれる DMSO 濃度は 0.2% 以下とした。

第9項 統計解析

統計的有意差は、unpaired Student's t test、Dunnett's test または Tukey-kramer's test のうち適したものを使用し、 $p < 0.05$ を統計的に有意であるとした。

第3節 実験結果

第1項 培養液中のグルコース濃度が HIF-1 α タンパク質発現量に与える影響

培養液中のグルコース濃度が HIF-1 α タンパク質発現量に及ぼす影響を western blot により評価した。その結果、低グルコース条件下において、有意な HIF-1 α のタンパク質発現量の低下が認められた (Fig. 14)。

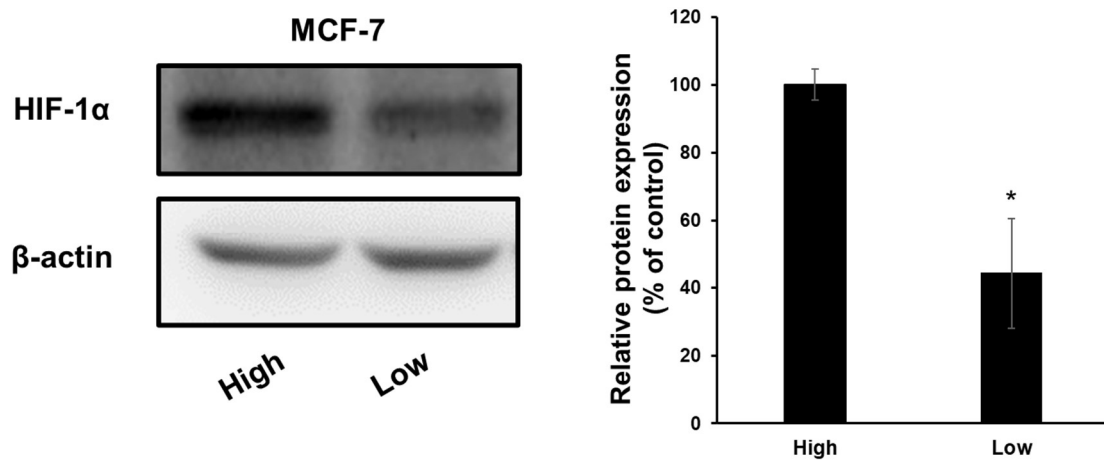


Fig. 14 Effect of glucose condition in the culture medium on the expression level of HIF-1 α protein in MCF-7 cells

HIF-1 α protein expression levels were analyzed by western blot analysis in MCF-7 cells. * $p < 0.05$, compared to the control using unpaired Student's t-test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第2項 低グルコース条件下における MCTs の発現評価

次に、培養液中のグルコース濃度の違いが MCTs の発現に与える影響について real-time PCR により評価した。その結果、高グルコース条件と比較して、低グルコースにすることで、有意な MCT1 mRNA 量の増大、および MCT4 mRNA 量の低下が生じた (Figs. 15a, 15b)。また、MCT1 の発現調節に関与することが報告されている c-MYC の mRNA 量を評価したところ、低グルコース条件下において、有意に発現が増大した (Fig. 15c)。

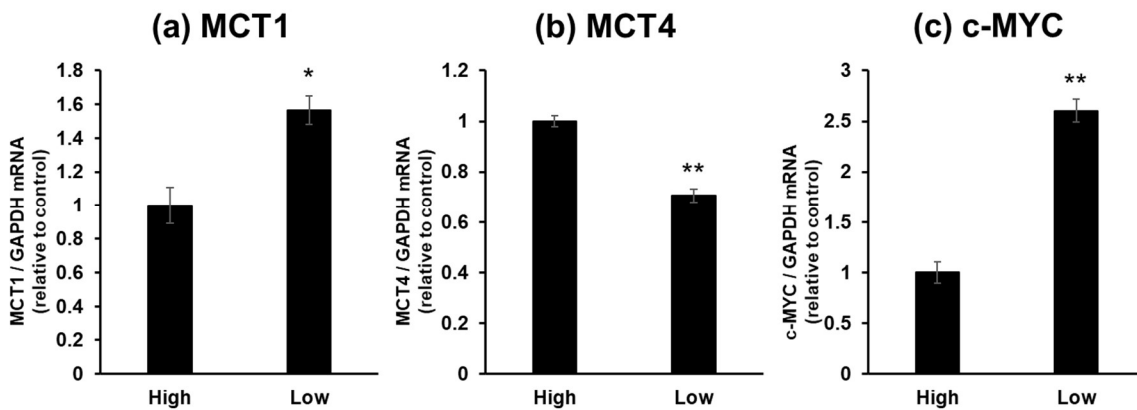


Fig. 15 Effect of glucose condition in the culture medium on MCT1 (a), MCT4 (b) and c-MYC (c) mRNA levels in MCF-7 cells

Gene expression level were analyzed by real-time PCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the control using unpaired Student's t-test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第3項 グルコース濃度の違いが細胞内 ATP 量に与える影響

続いて、培地中のグルコース濃度の違いが細胞のエネルギー産生に及ぼす影響を明らかにすべく、細胞内 ATP 量を測定した。その結果、高グルコース条件と比較して、低グルコース条件においても細胞内 ATP 量に変化は認められなかった (Fig. 16)。

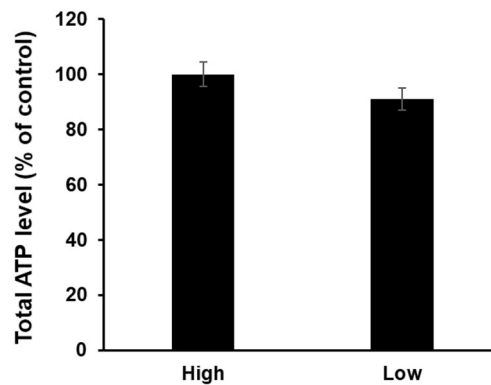


Fig. 16 Effect of glucose condition in culture medium on intracellular ATP levels in MCF-7 cells

Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第4項 低グルコース条件下における MCT 阻害剤と 4-OHT の併用時の細胞生存率

次に、低グルコース条件下において、MCT 阻害剤が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響を評価した。MCT 阻害剤については、高グルコース条件下と同様に 5-OP 10 mM、bindarit 100 μ M で検討した。Bindarit は高グルコース条件下での検討と同様に IC₅₀ を増大させた。一方、5-OP は 4-OHT の IC₅₀ を有意に低下させた (Fig. 17)。

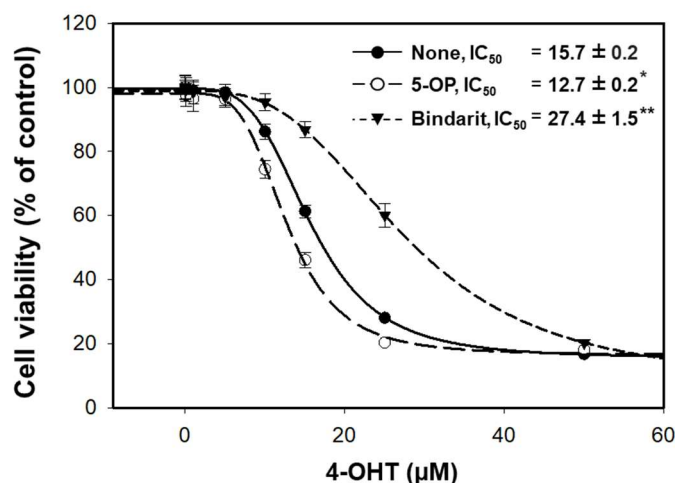


Fig. 17 Effect of 4-OHT combined with MCT inhibitors on MCF-7 cell viability in low glucose condition

The sigmoid curve and IC₅₀ values (μ M) of 4-OHT cell growth inhibition were determined using the MTT assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the control using Dunnett's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第5項 低グルコース条件下における 5-OP と 4-OHT 併用時の細胞形態

前項の結果を受けて、5-OP 10 mM と 4-OHT 10 μ M の併用時における細胞形態を観察した。Control と比較して、5-OP 単独曝露では大きな影響を与えず、4-OHT の単独曝露は細胞へ障害を与えることが示された。さらに 4-OHT と 5-OP の併用は 4-OHT による細胞障害を増強することが認められた (Fig. 18)。

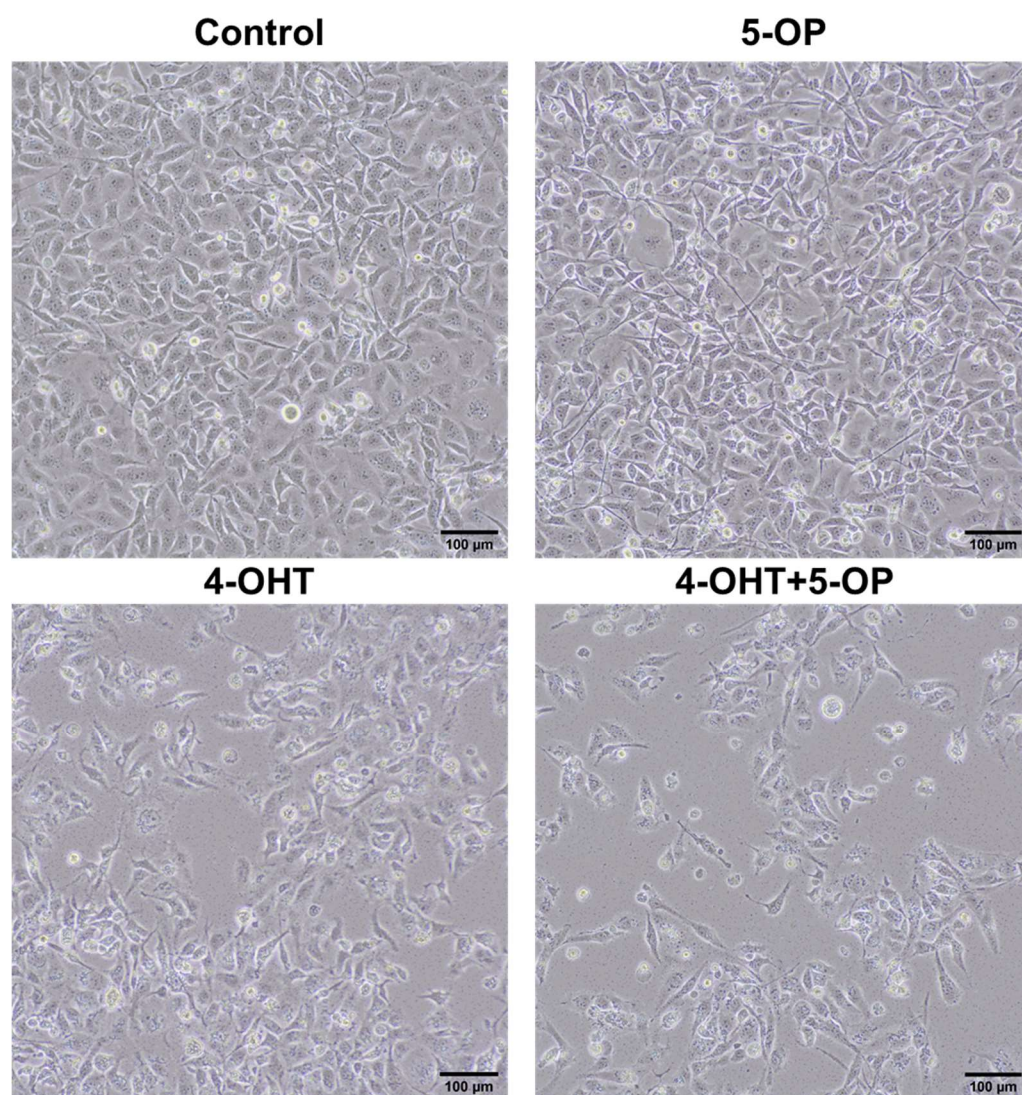


Fig. 18 Confocal microscopy of cell morphology during exposure to 4-OHT and 5-OP in low glucose conditions in MCF-7 cells

第 6 項 低グルコース条件下における 4-OHT および 5-OP 併用時の細胞内 ATP 量の比較

Tamoxifen は細胞内 ATP 量を低下させることが報告されている⁶²⁾。そこで、低グルコース条件下における 4-OHT と 5-OP の併用が細胞内 ATP 量に影響を与えるのではないかと考え、検討を行った。Control と 5-OP 単独曝露群を比較したところ、5-OP 単独曝露は細胞内 ATP 量に変化を与えなかった。一方、4-OHT 5 μM および 10 μM は細胞内 ATP 量を有意に低下させるとともに、5-OP を併用することで ATP 量の低下が増強された (Fig. 19)。

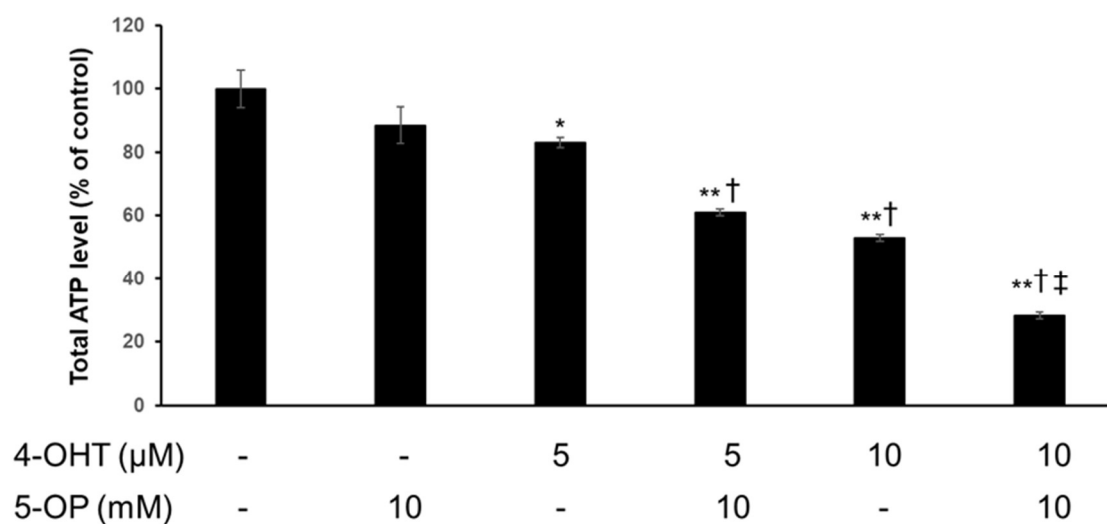


Fig. 19 Effects of combined 4-OHT and 5-OP on intracellular ATP content in low glucose conditions in MCF-7 cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the control group; † $p < 0.01$, compared to the 4-OHT 5 μM group; ‡ $p < 0.01$, compared to the 4-OHT 10 μM using Tukey-Kramer's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第7項 低グルコース条件下における 4-OHT と 5-OP の併用が酸化ストレス関連遺伝子に与える影響

Tamoxifen は細胞に対して酸化ストレスを与えることが知られている⁹⁾。そこで、前項の低グルコース条件下における 4-OHT と 5-OP の併用が細胞内 ATP 量を低下させる機序に酸化ストレスの増大が関与するとの予測を立て、酸化ストレス関連遺伝子に及ぼす影響について検討を行った。まず酸化ストレスの増大に伴いその発現が増加することが報告されている superoxide dismutase (SOD) 1-3 の mRNA 量を評価したところ、SOD1 および SOD3 の変動は認められなかった (Figs. 20a, 20c) 一方で、SOD2 mRNA 量は 4-OHT 単独曝露により有意に上昇し、さらに 5-OP の併用によって増大した (Fig. 20b)。そこで、SOD2 の転写調節に関与する Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の発現を同様に評価したところ、SOD2 と同様に 5-OP の併用により発現が増大することが示された⁶³⁾ (Fig. 20d)。

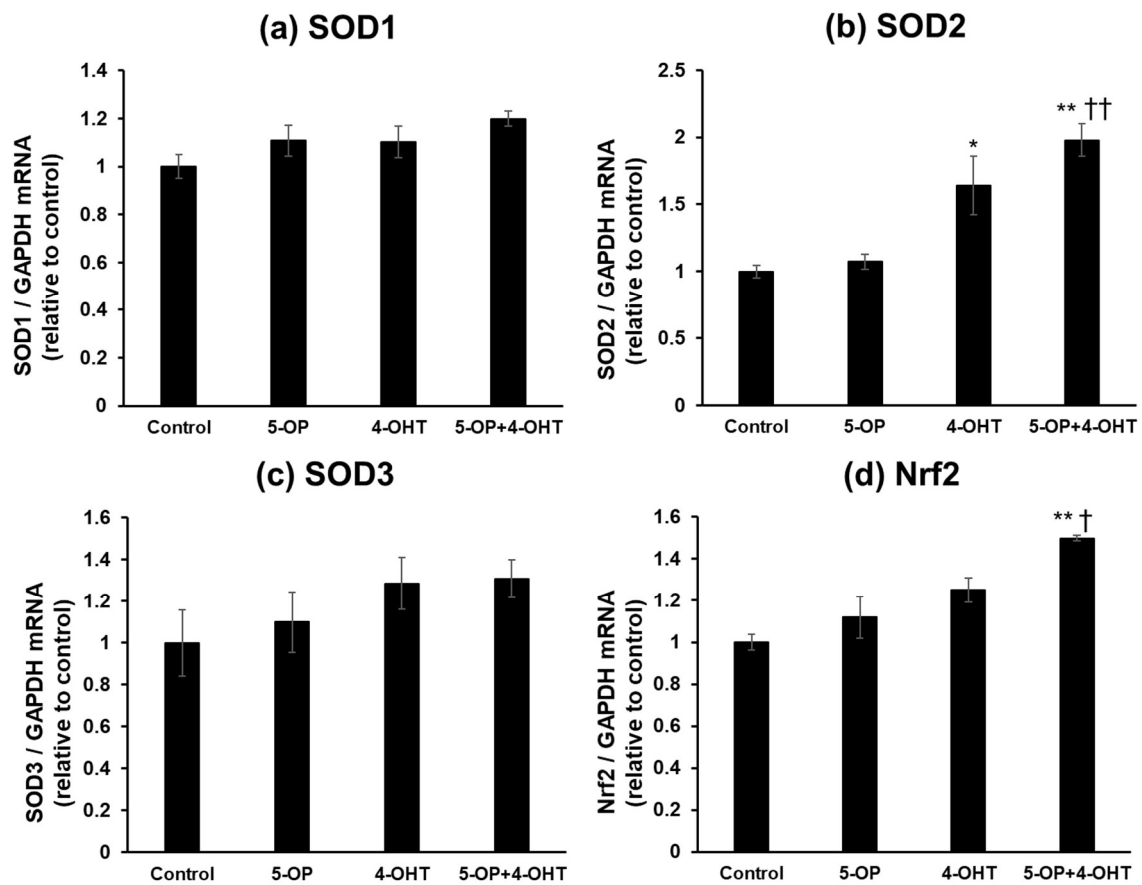


Fig. 20 Effect of combined 4-OHT with 5-OP on SOD1 (a), SOD2 (b), SOD3 (c), and Nrf2 (d) mRNA levels in low glucose condition in MCF-7 cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the control group; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$

compared to the 5-OP group using Tukey-Kramer's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

また、先の検討で、4-OHT の殺細胞効果を減弱させた bindarit が SOD2 および Nrf2 に与える影響について評価した。その結果、4-OHT 曝露により SOD2 の発現の増大が認められた一方、4-OHT と bindarit の併用は SOD2 の発現に影響を与えなかった (Fig. 21a)。また、Nrf2 mRNA 量も同様に 4-OHT と bindarit の併用では増大しなかった (Fig. 21b)。

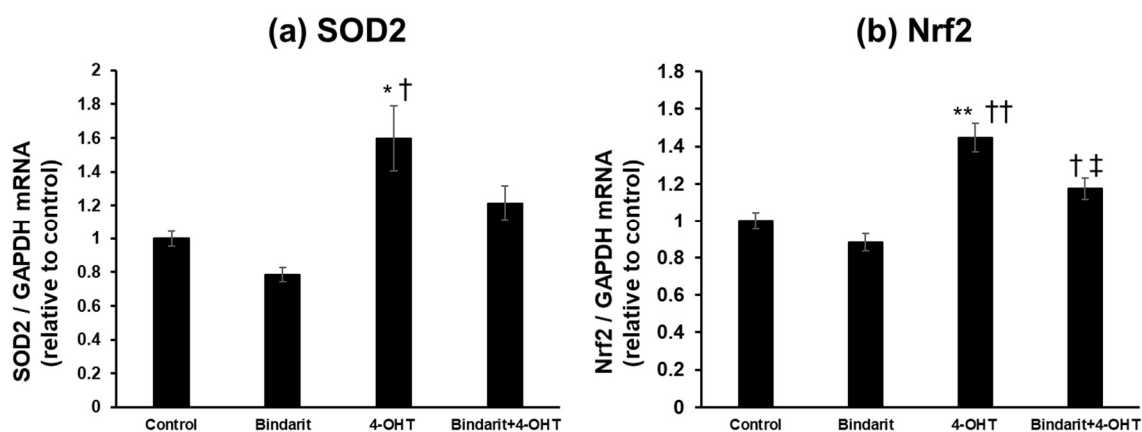


Fig. 21 Effect of combined 4-OHT with bindarit on SOD2 (a), and Nrf2 (b) mRNA levels in low glucose condition in MCF-7 cells

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared to the control group; † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$

compared to the bindarit group; ‡ $p < 0.05$ compared to the 4-OHT group using Tukey-

Kramer's test. Data are presented as the mean \pm S.E. of three independent experiments.

第4節 考察

前章までの検討から、HIF-1 α タンパク質発現量の増大が4-OHTの殺細胞効果を減弱させる可能性を示した。HIF-1 α は培地中のグルコース濃度に伴い発現が増大することから、前章までの培地よりグルコース濃度を約1/5とした低グルコース培地にすることで、HIF-1 α の発現を低下させることを試みた。さらに、本条件下において、MCT阻害剤と4-OHTを併用することで、4-OHTの殺細胞効果が向上するのではないかと仮説を立て、検討を行った。

グルコース濃度の違いがHIF-1 α のタンパク質発現量に与える影響について評価したところ、低グルコース条件下において、有意な発現の低下が示された。また、本条件下において、MCT1、MCT4のmRNA量を評価したところ、顕著なMCT1の増大とMCT4の低下が確認された。さらにMCT1の発現を調節されているc-MYCの発現を評価したところ、低グルコース条件下において有意に増大した⁶⁴⁾。MCT1は低グルコース条件下において発現が増大することが知られており、本検討においても同様の傾向を示した⁶⁵⁾。また、c-MYCはグルコース濃度の低下に伴い発現が増大することに加え、c-MYC発現量の増大が酸素消費量、ミトコンドリア質量および機能の増加に寄与することが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸⁾。さらに、MCF-7細胞を用いた検討において、培地中のグルコース濃度の低下により、解糖系の割合が低下することが示されている⁶⁹⁾。以上より本条件下では、解糖系の低下ならびに酸化的リン酸化の上昇による代謝シフトが生じ、乳酸をエネルギー源とする酸化的リン酸化優位な細胞に対してMCT1の阻害が生存率に影響を与えうることを示唆された。

本条件下においてMCT阻害剤と4-OHTを併用したところ、MCT4阻害剤bindaritは高グルコース条件下での検討と同様に、4-OHTの殺細胞効果を減弱させた。これは前項におけるMCT4の阻害を介した細胞内乳酸蓄積量の増大によるHIF-1 α タンパク質発現量の増大に起因するものだと考察される。一方、MCT1

選択的阻害剤 5-OP は高グルコース条件時とは異なり、4-OHT の殺細胞効果を増強させた。そこで、低グルコース条件下において、5-OP の併用により、4-OHT の殺細胞効果が向上するメカニズムについて検討を行うこととした。検討に先立ち、細胞形態の観察を行ったところ、5-OP 単独曝露による細胞への大きな影響は観察されなかった。また、4-OHT 曝露は細胞に対して細胞障害を引き起こし、5-OP の併用により、その効果が増強されることが確認された。Tamoxifen は濃度依存的に細胞内 ATP 量を低下させることが報告されている⁶²⁾。また、MCT1 阻害剤 AZD3965 は単独曝露では影響を与えない一方で、酸化リン酸化を抑制するメトホルミンの併用により顕著に細胞死を引き起こすことが報告されている⁷⁰⁾。4-OHT は酸化リン酸化の阻害効果も有することから、本検討において使用した MCT1 阻害剤 5-OP も 4-OHT との併用により 4-OHT の効果を増強することが考えられる。そこで、細胞内 ATP 量に着目して評価したところ、5-OP 単独曝露は細胞内 ATP 量に有意な変化を与えなかった。また、4-OHT 単独曝露は細胞内 ATP 量を有意に低下させ、その効果は濃度依存的に増大することが示された。さらに、4-OHT と 5-OP の併用は 5 μM および 10 μM のいずれの濃度においても 4-OHT 単独曝露と比較して細胞内 ATP 量を顕著に低下させたことから、5-OP は 4-OHT の細胞内 ATP 量の低下効果を増強する可能性が示された。AZD3965 は MCT1 を阻害することで、解糖系活性の阻害と細胞生存維持に必要なミトコンドリアのピルビン酸代謝の再活性化につながることを報告されていることから、5-OP 単独曝露では ATP 量に影響を与えないことが考えられた⁷⁰⁾。また、4-OHT はラット肝ミトコンドリアに対して、ミトコンドリア膜電位の脱分極を誘導することで酸化リン酸化効率を減少させることが示唆されている⁷¹⁾。以上より、本検討においても MCT1 阻害剤を用いた既報と同様に、4-OHT と 5-OP の併用により MCT1 および酸化リン酸化を阻害することで、併用効果が生じる可能性が示された。

Tamoxifen は ERs 拮抗作用に加え、細胞に対して酸化ストレスを与えることが報告されている⁹⁾。そこで、5-OP が tamoxifen による酸化ストレスを増強しているのではないかと推察し、酸化ストレス関連遺伝子について real-time PCR により評価した。その結果、ミトコンドリア酸化ストレスを反映する SOD2 の発現は 4-OHT 単独曝露により有意に増大し、5-OP の併用により mRNA 量が増大する傾向が示された。さらに、SOD2 の発現を調節するとされている Nrf2 の発現を評価したところ、SOD2 と同様に 5-OP の併用により、発現が増大する傾向が確認された⁶³⁾。なお、細胞質に局在する SOD1 および細胞膜表面に局在する SOD3 の mRNA 発現量に変化は認められなかった。Reactive oxygen species (ROS) は主にミトコンドリアにおいて産生されることに加え、ROS の蓄積が細胞に障害を与えることが報告されている⁷²⁾。また、tamoxifen はミトコンドリアのカルシウムイオン濃度と mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS) を調節することにより、ミトコンドリア酸化ストレスを増大させ、細胞障害を誘導することが示唆されている⁹⁾。したがって、tamoxifen が細胞に作用することにより、ミトコンドリアにおいて ROS の蓄積が生じ、細胞が障害されることで細胞内 ATP 量が低下することが考えられる。また、ミトコンドリアにおいて乳酸はピルビン酸に代謝され電子伝達系において、重要な NAD⁺/NADH の産生に関わることからエネルギー産生に関わることが知られている。ミトコンドリアにおける乳酸輸送についても MCTs が関与すると考えられており、MCF-7 細胞のミトコンドリアには MCT1 の発現が報告されている^{73,74)}。また、HIF-1 α 発現量の増大はミトコンドリア ROS を抑制することが報告されていることから、高グルコース条件と比較して HIF-1 α の発現が低下した本条件は、酸化ストレスの影響を受けやすいと思われる⁷⁵⁾。以上より、5-OP は MCT1 を阻害することにより、エネルギー産生を抑制し、ミトコンドリア ROS を増大させることで、4-OHT の殺細胞効果を高めることが推察された。また、4-OHT の殺細胞効果を減弱させた bindarit を用いて

さらなる検討を行ったところ、4-OHT と bindarit の併用は、SOD2 および Nrf2 mRNA の発現を増大させなかった。MCF-7 細胞を用いた検討において、tamoxifen による殺細胞効果は抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) の併用により、低下することが報告されている⁶²⁾。前章より、bindarit は HIF-1 α の発現量を増大させることが示唆されていることから、HIF-1 α の発現増大に伴い 4-OHT によるミトコンドリア ROS の増大を抑制することにより、4-OHT の殺細胞効果を減弱させる可能性が示された。

結論として、低グルコース条件下において、5-OP は 4-OHT によるミトコンドリア酸化ストレスを増大させ、殺細胞効果を増強することが示唆された。この結果は AZD3965 を用いた既報と同様の傾向を示したことから、MCT1 阻害剤と 4-OHT の併用が、乳がん治療において有用である可能性が示された。今後は、他の MCT1 阻害剤とミトコンドリアを標的とした抗がん薬の組み合わせによる新規がん治療戦略の確立が望まれる。

第5節 まとめ

HIF-1 α の発現量は培地中のグルコース濃度の増加に伴い増大することが知られている。本章では、生体内のグルコース濃度に近い低グルコース条件下における HIF-1 α の発現量の低下が、MCT 阻害剤と 4-OHT の併用効果に与える影響について検討した。その結果、MCT4 阻害剤 bindarit は高グルコース条件下と同様に 4-OHT の殺細胞効果を減弱させた。一方、MCT1 阻害剤として使用した 5-OP は 4-OHT の殺細胞効果を増強することが明らかとなった。また、酸化ストレス関連遺伝子について評価したところ SOD2 および Nrf2 の発現を増大させる傾向が確認された。これらの結果から、5-OP は 4-OHT によるミトコンドリア酸化ストレスの増大を介して、4-OHT の殺細胞効果を増強することが明らかとなった。

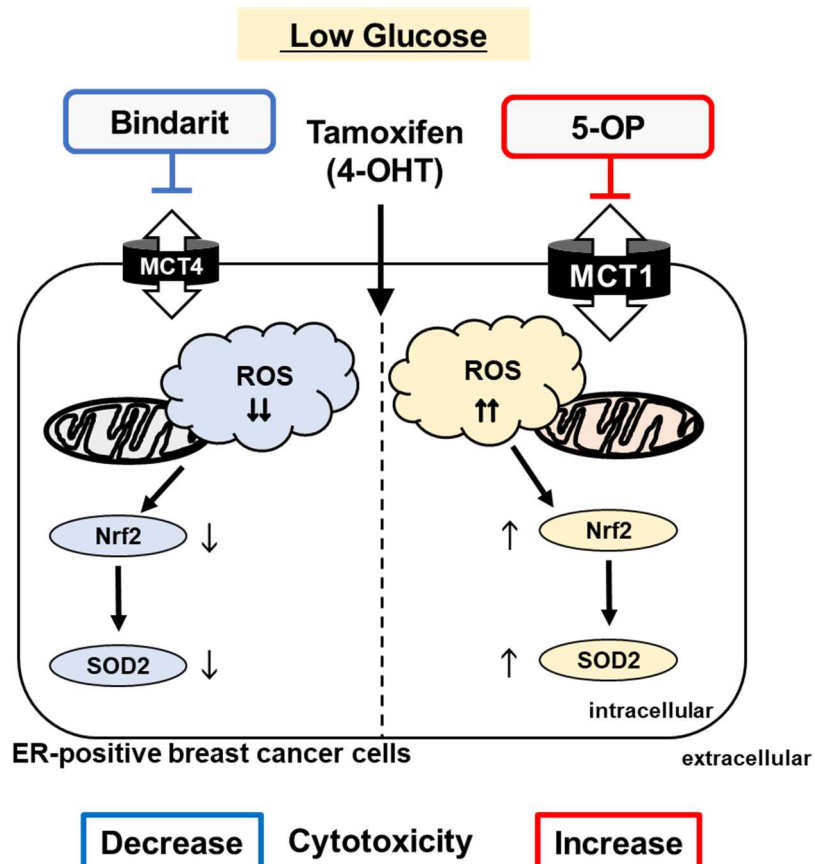


Fig. 22 Scheme of section 3

総括

我が国における乳がん患者数および患者死亡数は年々増加していることから、新規乳がん治療の効率の最適化ならびに新規治療標的の探索が求められている。MCTs はがん細胞に特徴的な Warburg 効果および Reverse Warburg 効果に関連することから治療標的として注目されている。本研究では、ER 陽性乳がんに対して汎用される tamoxifen と MCT 阻害剤の併用効果に着目し、MCT 阻害剤が tamoxifen の殺細胞効果に与える影響について検討した。

第 1 章では、ER 陽性乳がん細胞において MCT1 および MCT4 が発現しており、特に MCT4 が乳酸輸送において中心的な役割を担っていることが示唆された。また、MCT4 選択的阻害剤 bindarit および fenofibric acid は 4-OHT の殺細胞効果を減弱させた。これらの結果から、MCT4 の阻害が 4-OHT の殺細胞効果を減弱させる可能性を見出した。

第 2 章では、bindarit の単独曝露により、HIF-1 α のタンパク質発現量が増大することが見出された。また、その機序として MCT4 の阻害による細胞内乳酸量の増大が関与することが示唆された。さらに、4-OHT の殺細胞効果は HIF-1 α knockdown により増強し、低酸素条件下において減弱した。したがって、MCT4 阻害による tamoxifen の殺細胞効果の減弱は MCT4 阻害剤の曝露による HIF-1 α 発現量の増大に起因することが示唆された⁵⁷⁾。

第 3 章では、前章において HIF-1 α の発現が 4-OHT の殺細胞効果に影響を与えることを踏まえ、HIF-1 α のタンパク質発現量を低下させた低グルコース条件下における MCT 阻害剤と 4-OHT の併用効果を評価した。その結果、MCT4 阻害剤は前章と同様に 4-OHT の殺細胞効果を減弱させた。一方、MCT1 阻害剤の併用は 4-OHT の殺細胞効果を増強することを見出した。またこれらの機序の一つとしてミトコンドリアに対する酸化ストレスの増大が寄与している可能性が示された。

これまでのがん細胞に対する MCT 阻害剤を用いた検討では、他の抗がん薬との併用効果を評価した報告はほとんど行われていない。本研究では 4-OHT の殺細胞効果の増強には MCT4 ではなく、MCT1 に選択性を高めた阻害剤が有効であることを初めて見出した。HIF-1 α はがん細胞の生育に重要な役割を果たしていることが報告されていることから、本研究は乳がんのみならず、他のがん細胞種においてもその応用が期待され、今後の MCT 阻害剤を用いた研究の一助となることが期待される。

参考文献

- 1) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*, **71**, 209–249 (2021).
- 2) Fan L, Goss PE, Strasser-Weippl K. Current Status and Future Projections of Breast Cancer in Asia. *Breast Care*, **10**, 372–378 (2015).
- 3) 国立がん研究センターがん情報サービス.
- 4) Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.*, **27**, 95–120 (2018).
- 5) Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 10869–10874 (2001).
- 6) Ali S, Coombes RC. Endocrine-responsive breast cancer and strategies for combating resistance. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 101–112 (2002).
- 7) Maximov PY, McDaniel RE, Fernandes DJ, Bhatta P, Korostyshevskiy VR, Curpan RF, Jordan VC. Pharmacological Relevance of Endoxifen in a Laboratory Simulation of Breast Cancer in Postmenopausal Patients. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, **106**, 10 (2014).
- 8) Brauch H, Mürdter TE, Eichelbaum M, Schwab M. Pharmacogenomics of Tamoxifen Therapy. *Clin. Chem.*, **55**, 1770–1782 (2009).
- 9) Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, Ghafourifar P. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis

- via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res.*, **67**, 1282–1290 (2007).
- 10) Jones R, Morris M. Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **100**, 454–463 (2016).
 - 11) Halestrap AP. The SLC16 gene family-Structure, role and regulation in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, **34**, 337–349 (2013).
 - 12) Fox JEM, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.*, **529**, 285–293 (2000).
 - 13) Ferguson BS, Rogatzki MJ, Goodwin ML, Kane DA, Rightmire Z, Gladden LB. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **118**, 691–728 (2018).
 - 14) Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *J. Cancer Res.*, **9**, 148–163 (1925).
 - 15) Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R, Flomenberg N, Witkiewicz AK, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, **8**, 3984–4001 (2009).
 - 16) Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, Cordeiro M, Bebiano G, Costa P, Palmeirim I, Reis RM, Baltazar F. Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: Expression and exploitation as therapeutic targets. *Neuro. Oncol.*, **15**, 172–188 (2013).
 - 17) Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. Expression of lactate/H⁺ symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell

- renal cell carcinoma: Immunohistochemical and the Cancer Genome Atlas data analyses. *Hum. Pathol.*, **46**, 104–112 (2015).
- 18) Zhang G, Zhang Y, Dong D, Wang F, Ma X, Guan F, Sun L. MCT1 regulates aggressive and metabolic phenotypes in bladder cancer. *J. Cancer*, **9**, 2492–2501 (2018).
 - 19) Doherty JR, Cleveland JL. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.*, **123**, 3685–3692 (2013).
 - 20) Benny S, Mishra R, Manojkumar MK, Aneesh TP. From Warburg effect to Reverse Warburg effect; the new horizons of anti-cancer therapy. *Med. Hypotheses*, **144**, 110216 (2020).
 - 21) Puri S, Juvale K. Monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors as potential therapeutics for treating solid tumours: A review with structure-activity relationship insights. *Eur. J. Med. Chem.*, **199**, 112393 (2020).
 - 22) Li Z, Wu Q, Sun S, Wu J, Li J, Zhang Y, Wang C, Yuan J, Sun S. Monocarboxylate transporters in breast cancer and adipose tissue are novel biomarkers and potential therapeutic targets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **501**, 962–967 (2018).
 - 23) Johnson JM, Cotzia P, Fratamico R, Mikkilineni L, Chen J, Colombo D, Mollae M, Whitaker-Menezes D, Domingo-Vidal M, Lin Z, Zhan T, Tuluc M, Palazzo J, Birbe RC, Martinez-Outschoorn UE. MCT1 in Invasive Ductal Carcinoma: Monocarboxylate Metabolism and Aggressive Breast Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.*, **5**, 27 (2017).
 - 24) Végran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF- κ B/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.*, **71**, 2550–2560 (2011).

- 25) Wang N, Jiang X, Zhang S, Zhu A, Yuan Y, Xu H, Lei J, Yan C. Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates. *Cell*, **184**, 370-383.e13 (2021).
- 26) Quanz M, Bender E, Kopitz C, Grünewald S, Schlicker A, Schwede W, Eheim A, Toschi L, Neuhaus R, Richter C, Toedling J, Merz C, Lesche R, Kamburov A, Siebeneicher H, Bauser M, Hägebarth A. Preclinical Efficacy of the Novel Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitor BAY-8002 and Associated Markers of Resistance. *Mol. Cancer Ther.*, **17**, 2285–2296 (2018).
- 27) Guile SD, Bantick JR, Cheshire DR, Cooper ME, Davis AM, Donald DK, Evans R, Eyssade C, Ferguson DD, Hill S, Hutchinson R, Ingall AH, Kingston LP, Martin I, Martin BP, Mohammed RT, Murray C, Perry MWD, Reynolds RH, Thorne PV, Wilkinson DJ, Withnall J. Potent blockers of the monocarboxylate transporter MCT1: Novel immunomodulatory compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2260–2265 (2006).
- 28) Sasaki S, Futagi Y, Ideno M, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Iseki K. Effect of diclofenac on SLC16A3/MCT4 by the Caco-2 cell line. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **31**, 218–223 (2016).
- 29) Kobayashi M, Otsuka Y, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Inhibitory effects of statins on human monocarboxylate transporter 4. *Int. J. Pharm.*, **317**, 19–25 (2006).
- 30) Futagi Y, Kobayashi M, Narumi K, Furugen A, Iseki K. Identification of a selective inhibitor of human monocarboxylate transporter 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **495**, 427–432 (2018).
- 31) Sasaki S, Futagi Y, Kobayashi M, Ogura J, Iseki K. Functional characterization of 5-oxoproline transport via SLC16A1/MCT1. *J. Biol. Chem.*, **290**, 2303–2311 (2015).

- 32) Benyahia Z, Blackman MCNM, Hamelin L, Zampieri LX, Capeloa T, Bedin ML, Vazeille T, Schakman O, Sonveaux P. In vitro and in vivo characterization of mct1 inhibitor azd3965 confirms preclinical safety compatible with breast cancer treatment. *Cancers (Basel)*, **13**, 1–25 (2021).
- 33) Fox JEM, Meredith D, Halestrap AP. Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.*, **529**, 285–293 (2000).
- 34) Ueland PM, Solheim E, Ueland PM. Distribution of Tamoxifen and Its Metabolites in Rat and Human Tissues during Steady-State Treatment. *Cancer Res.*, **51**, 4837–4844 (1991).
- 35) Ibrahim AB, Zaki HF, Wadie W, Omran MM, Shouman SA. Simvastatin evokes an unpredicted antagonism for tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Manag. Res.*, **11**, 10011–10028 (2019).
- 36) Taroeno-Hariadi KW, Putra YR, Choridah L, Widodo I, Hardianti MS, Aryandono T. Fatty Liver in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer and Its Impact on Patient's Survival. *J. Breast Cancer*, **24**, 417 (2021).
- 37) Saibara T, Onishi S, Ogawa Y, Yoshida S, Enzan H. Bezafibrate for tamoxifen-induced non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet*, **353**, 1802 (1999).
- 38) Jögi A, Ehinger A, Hartman L, Alkner S. Expression of HIF-1 α is related to a poor prognosis and tamoxifen resistance in contralateral breast cancer. *PLoS One*, **14**, e0226150 (2019).
- 39) Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.*, **70**, 1469–1480 (2006).
- 40) Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent

- mechanism. *J. Biol. Chem.*, **281**, 9030–9037 (2006).
- 41) Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ, Roy S, Sen CK. Aerobically Derived Lactate Stimulates Revascularization and Tissue Repair via Redox Mechanisms. *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 1115–1124 (2007).
 - 42) Kulkoyluoglu-Cotul E, Arca A, Madak-Erdogan Z. Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.*, **30**, 25–38 (2019).
 - 43) Shamis SAK, McMillan DC, Edwards J. The relationship between hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and patient survival in breast cancer: Systematic review and meta-analysis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **159**, 103231 (2021).
 - 44) Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.*, **350 Pt 1**, 219–227 (2000).
 - 45) Wolff M, Kosyna FK, Dunst J, Jelkmann W, Depping R. Impact of hypoxia inducible factors on estrogen receptor expression in breast cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **613**, 23–30 (2017).
 - 46) Martin GR, Jain RK. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy. *Cancer Res.*, **54**, 5670–5674 (1994).
 - 47) Filippi I, Saltarella I, Aldinucci C, Carraro F, Ria R, Vacca A, Naldini A. Different Adaptive Responses to Hypoxia in Normal and Multiple Myeloma Endothelial Cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, **46**, 203–212 (2018).
 - 48) Zhang H, Sun L, Xiao X, Xie R, Liu C, Wang Y, Wei Y, Zhang H, Liu L. Krüppel-like factor 8 contributes to hypoxia-induced MDR in gastric cancer cells. *Cancer Sci.*, **105**, 1109–1115 (2014).

- 49) Shirai Y, Chow CCT, Kambe G, Suwa T, Kobayashi M, Takahashi I, Harada H, Nam JM. An overview of the recent development of anticancer agents targeting the hif-1 transcription factor. *Cancers (Basel)*., **13**, 1–21 (2021).
- 50) Chen Y, Zhang J, Zhang M, Song Y, Zhang Y, Fan S, Ren S, Fu L, Zhang N, Hui H, Shen X. Baicalein resensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells by reducing aerobic glycolysis and reversing mitochondrial dysfunction via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α . *Clin. Transl. Med.*, **11**, e577 (2021).
- 51) Sutendra G, Dromparis P, Kinnaird A, Stenson TH, Haromy A, Parker JMR, McMurtry MS, Michelakis ED. Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1 α signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene*, **32**, 1638–1650 (2013).
- 52) Gang BP, Dilda PJ, Hogg PJ, Blackburn AC. Targeting of two aspects of metabolism in breast cancer treatment. *Cancer Biol. Ther.*, **15**, 1533–1541 (2014).
- 53) Tagg SLC, Foster PA, Leese MP, Potter BVL, Reed MJ, Purohit A, Newman SP. 2-Methoxyoestradiol-3,17-O,O-bis-sulphamate and 2-deoxy-D-glucose in combination: a potential treatment for breast and prostate cancer. *Br. J. Cancer*, **99**, 1842–1848 (2008).
- 54) Romero-Garcia S, Moreno-Altamirano MMB, Prado-Garcia H, Sánchez-García FJ. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, Effects on Immune Cells and Therapeutic Relevance. *Front. Immunol.*, **7**, 52 (2016).
- 55) Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, Menk A V., Rittenhouse NL, DePeaux K, Whetstone RD, Vignali DAA, Hand TW, Poholek AC, Morrison BM, Rothstein JD, Wendell SG, Delgoffe GM. Metabolic support of tumour-infiltrating regulatory T cells by

- lactic acid. *Nature*, **591**, 645–651 (2021).
- 56) Merezhinskaya N, Ogunwuyi SA, Mullick FG, Fishbein WN. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *J. Histochem. Cytochem.*, **52**, 1483–1493 (2004).
- 57) Nadai T, Narumi K, Furugen A, Saito Y, Iseki K, Kobayashi M. Pharmacological Inhibition of MCT4 Reduces 4-Hydroxytamoxifen Sensitivity by Increasing HIF-1 α Protein Expression in ER-Positive MCF-7 Breast Cancer Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **44**, 1247–1253 (2021).
- 58) Li W, Liu H, Qian W, Cheng L, Yan B, Han L, Xu Q, Ma Q, Ma J. Hyperglycemia aggravates microenvironment hypoxia and promotes the metastatic ability of pancreatic cancer. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **16**, 479–487 (2018).
- 59) Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 238 (2019).
- 60) Bekebrede AF, Deuren T van, Gerrits WJJ, Keijer J, Boer VCJ de. Butyrate Alters Pyruvate Flux and Induces Lipid Accumulation in Cultured Colonocytes. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10937 (2021).
- 61) Shibata H, Ichikawa T, Nakao K, Miyaaki H, Takeshita S, Akiyama M, Fujimoto M, Miura S, Kanda S, Yamasaki H, Eguchi K. A high glucose condition sensitizes human hepatocytes to hydrogen peroxide-induced cell death. *Mol. Med. Rep.*, **1**, 379–385 (2008).
- 62) Li W, Shi X, Xu Y, Wan J, Wei S, Zhu R. Tamoxifen promotes apoptosis and inhibits invasion in estrogen-positive breast cancer MCF-7 cells. *Mol. Med. Rep.*,

- 16**, 478–484 (2017).
- 63) Kasai S, Shimizu S, Tatara Y, Mimura J, Itoh K. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. *Biomolecules*, **10**, 320 (2020).
- 64) Gan L, Xiu R, Ren P, Yue M, Su H, Guo G, Xiao D, Yu J, Jiang H, Liu H, Hu G, Qing G. Metabolic targeting of oncogene MYC by selective activation of the proton-coupled monocarboxylate family of transporters. *Oncogene*, **35**, 3037–3048 (2016).
- 65) De Saedeleer CJ, Porporato PE, Copetti T, Pérez-Escuredo J, Payen VL, Brisson L, Feron O, Sonveaux P. Glucose deprivation increases monocarboxylate transporter 1 (MCT1) expression and MCT1-dependent tumor cell migration. *Oncogene*, **33**, 4060–4068 (2014).
- 66) Briata P, Laurino C, Gherzi R. c-myc Gene expression in human cells is controlled by glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 1123–1129 (1989).
- 67) Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim J, Yustein JT, Lee LA, Dang C V. Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 6225–6234 (2005).
- 68) Tambay V, Raymond V-A, Bilodeau M. MYC Rules: Leading Glutamine Metabolism toward a Distinct Cancer Cell Phenotype. *Cancers (Basel)*, **13**, 4484 (2021).
- 69) Moradi F, Moffatt C, Stuart JA. The Effect of Oxygen and Micronutrient Composition of Cell Growth Media on Cancer Cell Bioenergetics and Mitochondrial Networks. *Biomolecules*, **11**, 1177 (2021).
- 70) Belouèche-Babari M, Wantuch S, Casals Galobart T, Koniordou M, Parkes HG,

- Arunan V, Chung Y-L, Eykyn TR, Smith PD, Leach MO. MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res.*, **77**, 5913–5924 (2017).
- 71) Cardoso CMP, Moreno AJM, Almeida LM, Custódio JBA. Comparison of the changes in adenine nucleotides of rat liver mitochondria induced by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen. *Toxicol. Vitr.*, **17**, 663–670 (2003).
- 72) Milliken AS, Kulkarni CA, Brookes PS. Acid enhancement of ROS generation by complex-I reverse electron transport is balanced by acid inhibition of complex-II: Relevance for tissue reperfusion injury. *Redox Biol.*, **37**, 101733 (2020).
- 73) Glancy B, Kane DA, Kavazis AN, Goodwin ML, Willis WT, Gladden LB. Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease. *J. Physiol.*, **599**, 863–888 (2021).
- 74) Hussien R, Brooks GA. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol Genomics*, **43**, 255–264 (2011).
- 75) Kung-Chun Chiu D, Pui-Wah Tse A, Law C-T, Ming-Jing Xu I, Lee D, Chen M, Kit-Ho Lai R, Wai-Hin Yuen V, Wing-Sum Cheu J, Wai-Hung Ho D, Wong C-M, Zhang H, Oi-Lin Ng I, Chak-Lui Wong C. Hypoxia regulates the mitochondrial activity of hepatocellular carcinoma cells through HIF/HEY1/PINK1 pathway. *Cell Death Dis.*, **10**, 934 (2019).

謝辞

本研究は日本薬学会長井記念薬学研究奨励金による支援を受け実施されました。

本研究を遂行するに際し、ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林正紀 教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の副査としてご審査ならびにご指導賜りました北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室/北海道大学病院薬剤部 菅原満 教授、北海道医療大学薬剤学研究室 井関健 教授ならびに北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海克哉 講師に厚くお礼申し上げます。

研究についてのご指導・ご協力を頂いた北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 古堅彩子 助教に深く感謝致します。

愛知学院大学在学時に進学に向けた基礎をご指導頂いた愛知学院大学製剤学研究室 山本浩充 教授、小川法子 准教授に厚く御礼申し上げます。

研究ができる環境の維持など本研究を遂行するにあたり多くの面でご助力いただきました北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室のすべての方々に心から感謝致します。また、ご多忙な中、多くの面でご支援頂いた旭川十仁薬局代表取締役社長 野田敏宏 博士を始めスタッフの皆様へ心より御礼申し上げます。

最後に心身両面で支えて下さった家族、友人ら大切な方々に深く感謝の意を示します。

2022年3月

灘井崇宜