



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	灘井, 崇宜
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第14850号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85662">https://hdl.handle.net/2115/85662</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Takanobu_Nadai_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(臨床薬学) 氏名 灘井崇宣

## 学位論文題名

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

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いる。がんは我が国における死因の第1位であり、2018年には一生のうちに日本人の2人に1人が、がんを発症すると報告された。また、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。乳がん患者の約70%に *estrogen receptors (ERs)* の高発現が認められており、手術前後に ER拮抗薬 *tamoxifen* を中心とした薬物療法が第一選択として行われる。しかし、5年以上の長期的な服用により約30%の患者において *tamoxifen* に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。

*Monocarboxylate transporters (MCTs)* は14種類のアイソフォームから構成されるトランスポーターであり、MCT1-4はがん細胞の生存において重要とされている乳酸を輸送する。近年の臨床研究において、乳がん患者の腫瘍組織におけるMCT1およびMCT4の高い発現が明らかとなり、予後不良因子であることが報告された。しかし、MCT1あるいはMCT4のいずれのアイソフォームが、がんの生育において重要な役割を担っているかは検討の余地が残されている。

当研究室では、これまでにMCT1選択的阻害剤 *5-oxoprolone (5-OP)* およびMCT4選択的阻害剤 *bindarit* を見出ししているが、これらのMCT阻害剤が、がん細胞に対して与える影響については検討されていない。本研究では、ER陽性乳がんが発現するMCTsに着目し、MCT阻害剤と *tamoxifen* の併用による効果的な乳がん治療効率の向上を目指して種々検討を行った。

### 1. MCT阻害剤と *tamoxifen* の併用時における *tamoxifen* の殺細胞効果

本章では、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。まず使用したER陽性乳がん細胞株におけるMCTs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MCT1、MCT4の発現が確認された。次に、乳酸輸送において中心的な役割を担うMCT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乳酸を用いて阻害実験を行った。両細胞において、MCT1選択的阻害剤5-OPは乳酸輸送を約20%低下させ、MCT4選択的阻害剤 *bindarit* は乳酸輸送を約50%低下させた。また、低濃度でMCT1を、高濃度でMCT1とMCT4を阻害する *α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC)* においても同様の傾向が確認されたことから、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う可能性が示された。続いて、*tamoxifen* の活性代謝物である *4-hydroxytamoxifen (4-OHT)* とMCT阻害剤を併用した際の殺細胞効果について評価したところ、5-OPは4-OHTのIC<sub>50</sub>に影響を与えなかった一方で、*bindarit* は4-OHTのIC<sub>50</sub>を約1.5倍増大させた。さらに、MCT4を選択的に阻害する *fenofibric acid* を用いて検討を行ったところ、4-OHTのIC<sub>50</sub>は有意に増大した。以上より、MCT4の阻害は4-OHTの殺細胞効果を減弱させる可能性が示された。

### 2. *Tamoxifen* による殺細胞効果が低下するメカニズムの解明

前章から、ER陽性乳がん細胞におけるMCT4の阻害により *tamoxifen* の殺細胞効果が低下することが示された。これまでにERsと *hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α)* の発現は逆相関することが報告されており、HIF-1αと乳がんの間に深い関係があることが示唆されている。また、乳がん組織におけるHIF-1αの過剰発現は予後不良につながる事が知られている。そこで本章では、MCT4の阻害によるHIF-1αの発現増大が4-OHTの殺細胞効果の減弱の一因となると予想し、HIF-

1 $\alpha$  が 4-OHT の殺細胞効果に与える影響について検討を行った。MCT 阻害剤を MCF-7 細胞に曝露した際の HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現量を評価したところ、bindarit は発現を有意に増大した。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。一方、5-OP は HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現量および乳酸蓄積量に影響を与えなかった。次に HIF-1 $\alpha$  の発現が 4-OHT の殺細胞効果に与える影響を評価すべく HIF-1 $\alpha$  を knockdown したところ、4-OHT の殺細胞効果は増大した。一方で、低酸素条件下での HIF-1 $\alpha$  の誘導は 4-OHT による殺細胞効果を減弱させることを見出した。以上より、MCT4 阻害剤 bindarit は HIF-1 $\alpha$  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ことが示唆された。

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

前章において、HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現量の増大は 4-OHT による殺細胞効果を低下させる可能性が示された。HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現量は培養液中のグルコース濃度に依存して増大することから、培地中のグルコース濃度の低下により HIF-1 $\alpha$  発現が減少することが予想される。そこで本章では、前章より培地中のグルコース濃度を 1/5 とした低グルコース条件下における 4-OHT と MCT 阻害剤の併用効果に着目し、MCT 阻害剤が 4-OHT の殺細胞効果へ与える影響を評価した。グルコース濃度の違いが HIF-1 $\alpha$  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 HIF-1 $\alpha$  発現の有意な低下が認められた。その際の MCTs の mRNA 量を real-time PCR により評価したところ、MCT1 の上昇および MCT4 の低下が確認された。本条件下において、MCT 阻害剤と 4-OHT の併用効果を評価したところ、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で、5-OP は 4-OHT による殺細胞効果を上昇させた。さらに、5-OP と 4-OHT の併用は 4-OHT による細胞障害を増強した。Tamoxifen は抗 ERs 作用に加え、酸化ストレスを与えることが報告されている。そこで、5-OP の併用により酸化ストレスが増大することで 4-OHT の殺細胞効果が増強するのではないかと予測し、酸化ストレス関連遺伝子について評価した。その結果、4-OHT と 5-OP の併用はミトコンドリアの酸化ストレスを反映する superoxide dismutase (SOD) 2 の mRNA 量を増大させた。さらに SOD2 の発現を制御する転写因子 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) においても同様の傾向が認められた。一方で、4-OHT と bindarit の併用は SOD2 および Nrf2 の発現に影響を与えなかった。これらの結果より、MCT1 阻害剤 5-OP は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示唆された。

### 総括

本研究から、ER 陽性乳がん細胞において主に MCT4 が乳酸輸送に寄与する可能性が示された。しかしながら、MCT4 阻害剤は HIF-1 $\alpha$  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ことが示唆された。さらに、低グルコース条件下において MCT1 阻害剤が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を見出した。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可能性を初めて見出した。HIF-1 $\alpha$  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、本研究の成果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。