

### 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

#### 【研究概要】

癌は日本における死亡原因の第一位であり、薬物療法、手術、放射線治療など集学的治療の進歩により治療成績は向上しているが、完全に癌細胞を排除することは極めて困難であり、再発および転移が課題として残されている。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。

最近、ナトリウムポンプ ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) の特異的阻害剤である植物 (ジギタリス) 由来生薬成分である強心配糖体の digoxin や ouabain が、CTC のクラスター形成を阻害することが報告された (Gkountela et al., *Cell*, 2019)。また、疫学調査においても、強心配糖体を服用する癌患者において、癌の悪性度および再発率が低下することが報告されている (Menger et al. *Sci. Transl. Med.*, 2012)。しかし、ウアバインは日本において承認されておらず、ジゴキシンも血中有効治療域が狭く、上記の論文において使用されている濃度はこの治療域を超えており、CTC 阻害薬としてすぐに臨床応用できる可能性は低い。さらに、強心配糖体による抗癌作用の分子メカニズムの全容は解明されておらず、新たな治療法の確立にはナトリウムポンプを起点とした強心配糖体の癌細胞抑制メカニズムの全容解明も重要な課題である。

本研究では、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、CTC 抑制に有力な候補生薬成分の探索を行う。蟾酥は、古くは「がまの油」としても知られており、強心、鎮痛、解毒薬として用いられる生薬で、心臓疾患、小児の五疳、歯牙出血、悪腫、喉痺などに応用され、富山県の代表的な伝統薬である六神丸にも多く配合されている。その有効成分には、植物由来の強心配糖体とは構造が異なる 10 種類以上もの強心配糖体が含まれている。それら強心配糖体の中には、digoxin や ouabain よりも強力な抗癌作用を有する bufalin およびその類縁体が含まれており、より低濃度で強力に CTC 抑制効果 (クラスター化および生存率の抑制) を示す生薬成分が発見されることが期待できる。また、これら強心配糖体による CTC

抑制メカニズムを分子レベルで明らかにすることで、ナトリウムポンプ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。

## 【本年度の成果の概略】

### 1. ヒキガエル由来生薬成分による血中循環腫瘍細胞の抑制機構の解明（富山大学 学術研究部薬学・和漢系 薬物生理学：藤井 拓人）

これまでに、様々な癌細胞において、高発現している  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase（論文発表前のため  $\text{nNaK}$  とする）が細胞内に異常に発現していることを見出している。癌の転移過程において、CTC の発生の根源は原発巣からの癌細胞の剥離である。本年度は、癌細胞の剥離に伴うナトリウムポンプの発現と機能の変化に着目した検討を行い、接着状態では細胞質内に存在する  $\text{nNaK}$  が剥離により原形質膜に移行し、癌細胞のナトリウムポンプ機能が亢進することを見出した。siRNA を用いた  $\text{nNaK}$  ノックダウン実験において、 $\text{nNaK}$  の原形質膜移行が、剥離癌細胞の生存に関与していることが示唆された。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、通常培養時では bufalin および gamabufotalin が高い増殖抑制効果を示すことを見出した。

### 2. ヒト癌細胞を用い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）

これまでに p75NTR や CD44 の発現に基づいて食道癌および胃癌における腫瘍幹細胞を同定分離し分子機構解析を進めるとともに、EpCAM と p75NTR や CD44 を組み合わせることで CTC を検出することでより臨床病理学的特性を反映した CTC を検出できることを報告してきた。本年度は、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。

今後、奥村らが構築した CTC 新規実験モデルにおいて、強心配糖体の CTC 抑制機構における  $\text{nNaK}$  およびこれまでに藤井らが見出している膜マイクロドメインに存在する非ポンプ型の  $\alpha 1\text{NaK}$  の生理機能を明らかにすることで、ナトリウムポンプが関与する新規 CTC 制御機構および新規 CTC 治療法開発の研究基盤の構築を目指す。