
原 著

リノール酸の 5-fluorouracil 抗腫瘍効果に与える影響

奈良県立医科大学分子病理学講座

田 邊 絵里子, 北 吉 美沙穂, 羅 奕, 國 安 弘 基

EFFECT OF LINOLEIC ACID ON ANTI-TUMORAL EFFECT OF 5-FLUOROURACIL

ERIKO TANABE, MISAHO KITAYOSHI, YI LUO and HIROKI KUNIYASU

Department of Molecular Pathology, Nara Medical University School of Medicine

Received February 27, 2015

Abstract : Linoleic acid (LA) has been reported to have potential in selecting non-proliferative cancer stem cells. We studied the effects of linoleic acid on the anti-tumor effect of 5-fluorouracil (5-FU). Examining the 5-FU sensitivity in mouse lung cancer cell line LL2, and mouse colorectal cancer cell lines CT26 and CMT93, CMT93 showed low sensitivity. The increased growth inhibitory effects in CT26, CMT93, and LL2 were 2.5-, 1.4-, and 2.6-times, respectively, on concurrent treatment with LA at an apoptosis-inducing concentration and 5-FU at a concentration of IC50. On examining aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity based on changes in the cancer stem cells in this case, it was found to have increased 1.7- to 3.2-fold in response to concurrent treatment with 5-FU and LA in the 3 cell lines. Further, the expression of nucleostemin, a stem cell marker, showed almost no change between simultaneous treatment with 5-FU and LA, and treatment with LA alone. When used in conjunction, LA appears to be enhancing the 5-FU sensitivity of cancer cells; however, it may increase the survival of cancer stem cells. These results suggest that the content of the diet during chemotherapy is critical in optimizing the host's condition.

Key words : linoleic acid, cancer stem cell, anti-cancer therapy

I. はじめに

リノール酸は、18 個の炭素を含む ω -6 系の長鎖不飽和脂肪酸であり、COX-2 などにより代謝され、アラキドン酸を経てプロスタグランジン (PG) になる¹⁾。とくに PGE2 はリノール酸から直接生成されるが、慢性炎症を惹起し発癌の要因として重視される。一方、リノール酸は癌細胞にアポトーシスを誘導し、残存す

る癌細胞を静止期に留める²⁾。この残存細胞が癌幹細胞の性質を示すことから、リノール酸は癌幹細胞に作用を有することが考えられる。リノール酸は、通常の食事に多く含まれる必須脂肪酸であり最も多く摂取される脂肪酸のひとつである。がん患者が化学療法を受ける際に食品中のリノール酸が化学療法に影響する可能性を検討するため、多くの固形癌の治療に用いられている 5-フルオロウラシル (5-FU) の抗腫瘍効果に

もたらすリノール酸の影響について、培養細胞を用いて検討を行った。

II. 材料と方法

細胞培養：10%FBS（ウシ胎児血清, fetal bovine serum, FBS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA）および2% Penicillin-Streptomycin Solution 含有 D-MEM で 37℃、5% CO₂ 下で培養した CT26（マウス大腸癌細胞株, Dr. Fidler [MD Anderson Cancer Center] から供与）および CMT93（マウス大腸癌細胞株）、LL2（マウス肺癌細胞株、いずれも DS Pharmabiomedical, Osaka, Japan）の3種類の細胞株を使用した。

試薬：リノール酸および 5-FU は Sigma から購入し、それぞれ 100% エタノール、Phosphate buffered saline (PBS, Sigma) で希釈し使用した。また、テトラゾリウム化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (MTS) 試薬 (CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent, Promega Biosciences, Inc. San Louis Obispo, CA, USA)、ALDEFLUOR Kit (Veritas, Tokyo, Japan) を購入し使用した。

MTS assay：リノール酸・5-FU 同時処理の実験では、24-well プレートに、通常培地にて CT26 細胞・LL2 細胞 (2×10^4 cells/well)、および CMT93 細胞 (3×10^4 cells/well) を播き、24 時間後にリノール酸および 5-FU を加えた。24 時間後に 20% MTS 試薬を加

え、1 時間後 492nm で吸光度を計測した。

リノール酸前処理の実験では、25cm シャーレに通常培地により CT26、LL2、CMT93 の各細胞を 24 時間培養し、リノール酸 (50 μ g/mL) を 24 時間処理した。その後、24-well プレートに各細胞 (7×10^4 cells/mL) を播き、6 時間後に 5-FU 処理した。24 時間後に 20% MTS 試薬を加え、1 時間後 492nm で吸光度を計測した。

Western blot 法：文献に従い²⁾、CT26 細胞は lysate buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 1mM EGTA, 2% SDS, 10 μ g/mL leupeptin, 50 μ g/mL PMSF) にて 10 分沸騰水により加熱後遠心した。上清 (30 μ g) を 12.5% SDS-PAGE にて電気泳動し、ニトロセルロース膜に電氣的に転写した。ニトロセルロース膜は、抗 Lin28 抗体 (Proteintech Inc., Chicago, IL, USA)、抗 nanog 抗体 (Biorbyt, San Francisco, CA, USA)、および、抗 c-Myc 抗体 (Santa-Cruz Biotechnology Inc., Santa-Cruz, CA, USA) によりタンパク発現を検出した。検出には ECL (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を用いた。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)：Trizol (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) を用い細胞より RNA を単離し、残存 DNA を除去するため DNase 処理を行った。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Rockville, MD, USA) を用いて、RNA 量 (2 μ g) から cDNA を合成し、得られた cDNA は Table 1. に記した primer set を用いて各遺伝子を増幅した。PCR 産物 (5 μ L) はエチジウムブロマイド

	Upper primer	Lower primer
CD133	5'- GGAAAAGTTGCTCTGCGAAC -3'	5'- TCTCAAGCTGAAAAGCAGCA -3'
NS	5'- ATGTGGGGAAAAGCAGTGTC -3'	5'- TGGGGGAGTTACAAGGTGAG -3'
GAPDH	5'- TGTGTCCGTCGTGGATCTGA -3'	5'- TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG -3'

Table 1. The primer sequences used for RT-PCR analysis.

ド入りアガロースゲルで電気泳動し発現を確認した。ハウスキープ遺伝子である glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を loading control として用いた。

Aldehyde dehydrogenase assay: 測定には ALDEFUOR キットを用いた。96-well プレートに通常培地により各細胞 (5000 cells/well) を播き、24 時間後にリノール酸および 5-FU を加えた。24 時間後に培地を除去し、Assay Buffer・Activated Buffer 混合液を加え 40 分処理した。Negative control として aldehyde dehydrogenase inhibitor である diethylaminobenzaldehyde (DEAB) を加えた混合液を用いた。その後、325 nm で培地の蛍光強度を計測した。

統計処理: InStat3.0 ソフトウェア (Graphpad.com, La Jolla, CA, USA) により two-tailed Mann-Whitney U 検定を行い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判定した。

Ⅲ. 結 果

本研究は、リノール酸が 5-FU の抗腫瘍効果に与える影響を明らかにする目的で、リノール酸の 5-FU 感受性および癌幹細胞への影響を検索した。

(1) リノール酸の 5-FU 細胞増殖抑制効果への影響

CT26 細胞において、リノール酸濃度を変えて処理したが、5-FU 単独処理した場合とリノール酸・5-FU を同時処理した場合を比較すると、いずれの濃度においてもリノール酸により増殖抑制が増大した (Fig. 1A)。LL2 細胞および CMT93 細胞でも、リノール酸・5-FU の同時処理により 5-FU の増殖抑制は増大していた (Fig. 1B-C)。

次に、癌細胞をリノール酸により前処理したのち、残存する細胞の数を揃えて播き直し 5-FU 処理した時の 5-FU 増殖抑制効果への影響を検討した。すると、同時処理の時とは異なり、いずれの細胞においても 5-FU 単独処理とリノール酸前処理後 5-FU 処理の細胞増殖を比較しても有意な差異は見られず、Fig. 1 で認められた増殖抑制の増大は認められなかった (Fig. 2A-C)。このリノール酸前処置とリノール酸同時処理

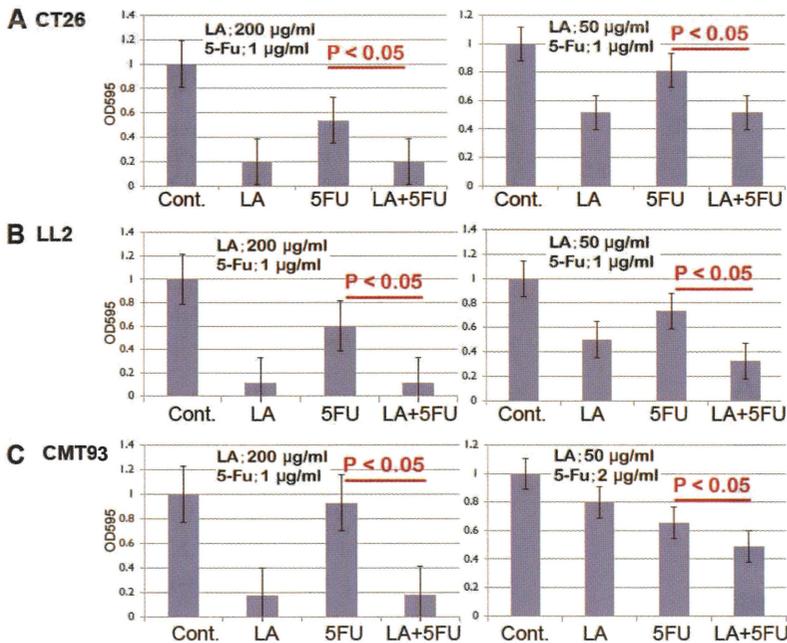


Fig. 1. Effect of linoleic acid on 5-FU cytotoxicity. CT26 (A), LL2 (B) and CMT93 (C) cells were treated with linoleic acid (LA) (200 µg/mL or 50 µg/mL) and 5-FU (1 µg/mL or 2 µg/mL) for 24 hrs. Error bars, SD.

との差が癌幹細胞への作用にあると考え癌幹細胞マーカーを検討した。

(2) リノール酸の癌幹細胞性への影響

ヒト胚性幹細胞 (embryonic stem [ES] cells) のマーカーである Lin28 および Nanog の発現は、無処理の CT26 細胞では確認されなかったが、リノール酸処理した CT26 細胞では両遺伝子の発現が見られた (Fig.

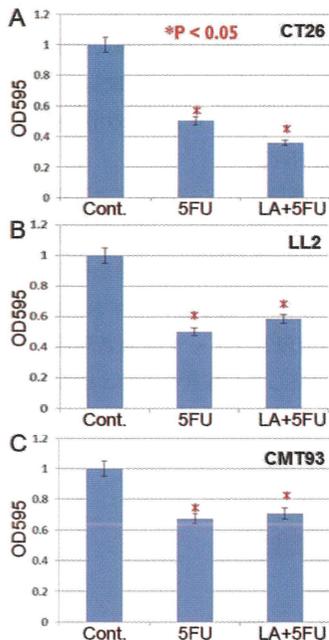


Fig.2. Effect of linoleic acid pretreatment on 5-FU cytotoxicity in cancer cells.

CT26 (A), LL2 (B) and CMT93 (C) cells were pretreated with linoleic acid (LA) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 hrs. After that, the cells were treated with 5-FU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hrs (* $P < 0.05$). Error bars, SD.

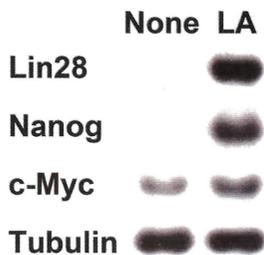


Fig.3. Effect of linoleic acid on expression of ES-associated genes in CT26 cells.

None; untreated cells. LA; cells treated with linoleic acid (LA).

3)。また、細胞の増殖性と未分化性に関与する c-Myc の遺伝子発現は、無処理の場合と比較してリノール酸処理により軽度発現が増加したのみであった。

さらに、一般的に癌幹細胞のマーカーとされる CD133 および nucleostemin (NS) の発現を 3 種の細胞株を用いて検討した (Fig. 4)。5-FU 単独処理では CD133 発現は変化しないが、リノール酸処理では、著明な発現亢進が認められた。一方、リノール酸と

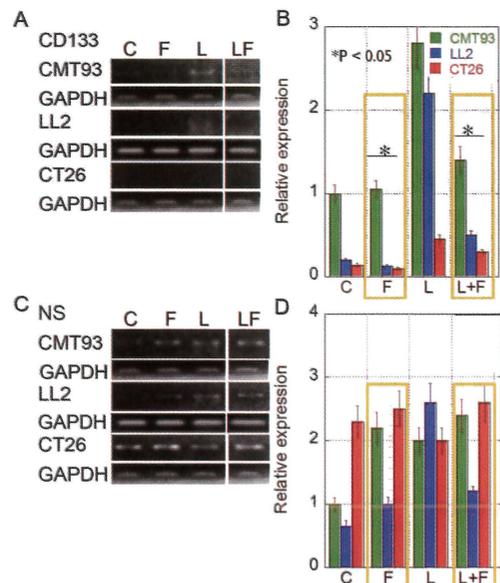


Fig.4. Effect of linoleic acid on expression of CD133 and nucleostemin in 5-FU-treated cancer cells.

(A, C) The expression of CD133 and nucleostemin (NS) are a cancer stem cell marker when treated with linoleic acid (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 5-FU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (B,D) Gene expressions quantified based on the representative results. C: untreated cells, F: cells treated with 5-FU, LA: cells treated with linoleic acid. LF or L+F: cells treated with linoleic acid and 5-FU.* $P < 0.05$. Error bars, SD.

5-FU の同時処理では、5-FU はリノール酸の CD133 発現促進効果を抑制するものの、なお 5-FU 単独よりも CD133 発現レベルは高かった (Fig. 4A,B)。

次に、NS 発現を検討すると、リノール酸単独処理とリノール酸・5-FU 同時処理では、LL2 細胞のみで NS 発現が減少し、他の 2 株では発現レベルにほとんど変化が認められなかった (Fig. 4C,D)。

さらに、リノール酸と 5-FU 処理における癌幹細胞性の変化を検討するために、癌細胞での ALDH 活性へのリノール酸と 5-FU の影響を調べた (Fig. 5A-C)。

CT26 細胞において、ALDH 活性にはいずれの処理でもほとんど変化が見られなかったものの、DEAB 処理 negative control の値は無処理や 5-FU 単独処理と比較してリノール酸単独処理とリノール酸・5-FU 同時処理で低下していた (Fig. 5A)。LL2 細胞において、DEAB 処理 negative control の値に有意な差異は見られなかったものの、ALDH 活性はリノール酸単独処理とリノール酸・5-FU 同時処理で増大していた (Fig. 5B)。CMT93 細胞においては、5-FU 単独処理と比較してリノール酸・5-FU 同時処理の場合で ALDH 活性と DEAB 処理 negative control の値がともに低下していた (Fig. 5C)。

ALDH 活性を細胞数と negative control により標準化すると、いずれの細胞でもリノール酸・5-FU 同時処理では 5-FU 単独処理よりも ALDH 活性がやや高い傾向が見られた (Fig. 5D)。3 株の平均をとり比較すると、リノール酸・5-FU 同時処理では 5-FU 単独処理よりも ALDH 活性が有意に高く認められた (Fig. 5E)。

IV. 考 察

リノール酸と 5-FU の同時処理では、CT26、LL2、CMT93 細胞のいずれにおいても 5-FU の増殖抑制作用が増大しており、リノール酸は 5-FU の抗癌作用を亢進させていると考えられる。これは、リノール酸短期処理により細胞死が誘導された以前の結果に相応する²⁾。

これに対し、リノール酸と 5-FU 同時処理した場合に比して、リノール酸を処理した 6 時間後に 5-FU を処理した場合は 5-FU 単独処理とリノール酸 + 5-FU 処理での細胞増殖率に有意な差は見られなかった。このリノール酸同時処理とリノール酸前処理との差はリノール酸前処理により生存した細胞を用いることで生じている。リノール酸は癌幹細胞に作用することが示唆されており²⁾、5-FU の抗腫瘍効果への作用も癌幹細胞へのリノール酸の作用によると考えられた。

ヒト ES 細胞のマーカーである Lin28 および Nanog^{3,4)} において、無処理の CT26 細胞では発現していなかったものの LA 処理すると発現が認められたことから、リノール酸は癌幹細胞としての性質、癌幹細胞性を高める作用を持っていると考えられた。また、増殖性・未分化性の幹細胞マーカーである c-Myc⁵⁾ に

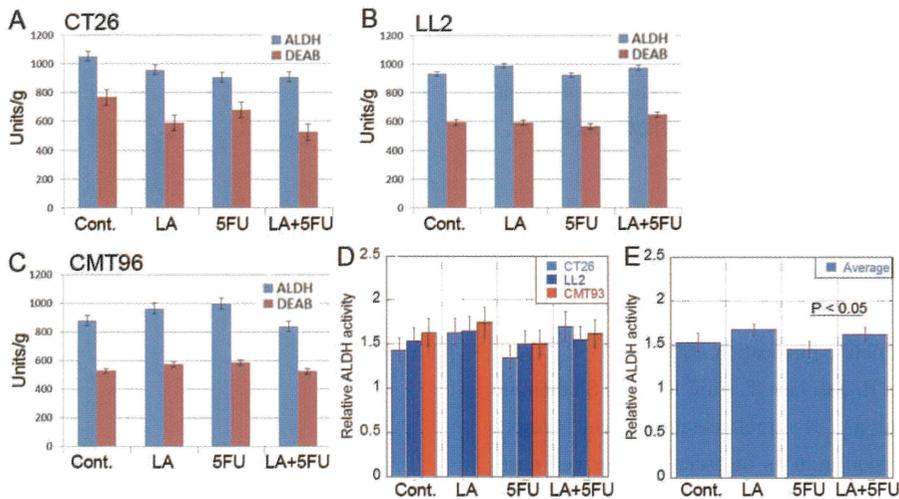


Fig.5. Effect of linoleic acid on ALDH activity in cancer cells. CT26 (A) and LL2 (B) cells were treated with linoleic acid (LA) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 5-FU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). CMT93 (C) cells were treated with linoleic acid (LA) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 5-FU (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (D) From the results indicated in the panels A-C, ALDH activity in the three cells were compensated by DEAB. (E) Mean of results of the three cell lines. Error bars, SD.

において、無処理の場合に比してリノール酸処理しても発現にほとんど変化が見られなかったことから、高増殖性の癌幹細胞ではなく低増殖性の癌幹細胞⁶⁾が増加した、または、選択されたと推察できる。低増殖性の癌幹細胞のマーカであるCD133⁷⁾においても、リノール酸・5-FU同時処理の場合でもその発現が増加したという結果から、リノール酸は5-FU処理時でも癌幹細胞性を促進すると考えられる。

ALDHは幹細胞に高発現していることが知られており⁸⁾、その活性の測定は癌幹細胞を含む種々の幹細胞を様々な組織において同定することが可能である。5-FU単独処理と比較してリノール酸を同時処理することによりALDH活性が亢進したことから、リノール酸が5-FUに対して癌幹細胞性を亢進させることがALDH活性の点からも確認された。

現在、癌幹細胞はがん化学療法に対する抵抗性の原因として重視されている^{9,10)}。食事性因子であるリノール酸が癌幹細胞性を促進することから、リノール酸を多く含む食事を摂取することにより化学療法の効果が抑制される可能性があると考えられる。

V. 結 語

本研究結果より、リノール酸は一見癌細胞の5-FUへの抗癌作用を亢進させるように思われるが、癌幹細胞の観点から検討すると5-FUの作用を阻害して癌幹細胞性を促進する可能性が示唆された。以上から、化学療法時の食事内容に留意する必要性が示唆された。

<参 考 文 献>

- 1) Kuniyasu H. Linoleic acid, In: Encyclopedia of cancer, 2nd edition, (ed) Schwab M Springer-Verlag, online publication, 2008.
- 2) Ohmori H, Sasahira T, Fujii K, Yi L, Shimomoto T, Kuniyasu H. Linoleic-acid-induced growth suppression induces quiescent cancer cell nests in nude mice. *Pathobiology*, 75 (4) :226-32, 2008.
- 3) Bin G, Jiarong Z, Shihao W, et al. Aire promotes the self-renewal of embryonic stem cells through Lin28. *Stem Cells Dev*, 21 (15) :2878-90, 2012.
- 4) Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122 (6) :947-56, 2005.
- 5) Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7 (3) :343-54, 2010.
- 6) Haraguchi N, Inoue H, Tanaka F, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancers. *Hum Cell*, 19 (1) :24-9, 2006.
- 7) Sun Y, Kong W, Falk A, et al. CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One*, e54984 (5) , 2009.
- 8) Meng E, Mitra A, Tripathi K, et al. ALDH1A1 maintains ovarian cancer stem cell-like properties by altered regulation of cell cycle checkpoint and DNA repair network signaling. *PLoS One*, e107142.9 (9) , 2014.
- 9) Leirós GJ, Balañá ME. Metastatic cancer stem cells: new molecular targets for cancer therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 12 (11) :1909-22, 2011.
- 10) Gaur P, Sceusi EL, Samuel S, et al. Identification of cancer stem cells in human gastrointestinal carcinoid and neuroendocrine tumors. *Gastroenterology*, 141 (5) :1728-1737, 2011.