

# エライジン酸の 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

北吉 美沙穂、田邊 絵里子、羅 奕、國安 弘基

## EFFECT OF ELAIDIC ACID ON ANTI-TUMORAL EFFECT OF 5-FLUOROURACIL

MISAHO KITAYOSHI, ERIKO TANABE, YI LUO, HIROKI KUNIYASU

*Department of Molecular Pathology, Nara Medical University School of Medicine*

Received February 27, 2015

**Abstract** : We studied the effects of elaidic acid (EA) has on the anti-tumor effect of 5-fluorouracil (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 cells were 1.0-, 1.2-, and 1.1-times, respectively, on concurrent treatment with EA at an apoptosis-inducing concentration and 5-FU at a concentration of IC50. On examining aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity changes in the cancer stem cells in this case, it was found to have been increased 3.8-fold by simultaneous treatment with 5-FU and EA in CT26 and LL2 cells, but 1.5-fold in CMT93 cells. In addition, considering the expression of nucleostemin as a stem cell marker, in simultaneous treatment with 5-FU and EA, and treatment with EA alone, the expression was increased in CT26 and LL2 cells, whereas the expression level did not change in CMT93 cells. The foregoing suggests that, rather than altering the 5-FU sensitivity of cancer cells, EA might promote the survival of cancer stem cells. The results suggest that the content of the diet during chemotherapy is a relevant issue.

**Key words** : elaidic acid, cancer stem cell, anti-cancer therapy

### I. はじめに

エライジン酸は、18 個の炭素を含み 1 個のトランス型不飽和結合を有する長鎖トランス脂肪酸である。エライジン酸の構造異性体は、シス型不飽和結合を有するオレイン酸である。エライジン酸はオレイン酸の工業的水素化により生成され、融点が室温以上であるため、マーガリンやショートニングなど多くの食品に用いられる<sup>1)</sup>。しかし、トランス脂肪酸は LDL-コレ

ステロールの増加を招き動脈硬化・虚血性心疾患のリスクを高めることが明らかとなっており、アメリカ食品医薬品局により添加制限が設けられている<sup>1)</sup>。一方、トランス脂肪酸の癌に対する影響は 1981 年に癌促進作用が報告されているが<sup>2)</sup>、以後ほとんど詳細な解明はなされていない。このため、エライジン酸を用いて頻用されている抗がん剤である 5-FU の抗腫瘍効果への影響を検討した。

## II. 材料と方法

**細胞培養**：10%（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°C、5% CO<sub>2</sub> 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。

**動物実験**：CT26 細胞をトリプシナイズし PBS にて2回洗浄後ハンクス液に懸濁したものを、同系統の BALB/c 雄性マウス（4週齢）の、皮下（1x10<sup>7</sup> 個）、尾静脈（肺転移、1x10<sup>6</sup> 個）、脾臓（肝転移、1x10<sup>6</sup> 個）、腹腔（腹膜播種、1x10<sup>6</sup> 個）に接種し、それぞれ腫瘍系、肺転移巣数、肝転移巣数、腹膜播種巣体積（短径 x 短径 x 長径 /4[mm<sup>3</sup>]) を検討した。エライジン酸は週1回 10 mg/kgBW 腹腔内投与した。

**試薬**：エライジン酸および5-フルオロウラシル (5-FU) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 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**：エライジン酸・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<sup>4</sup> cells/well)、および、CMT93 細胞 (3 × 10<sup>4</sup> cells/well) を播き、24時間後にエライジン酸および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。

エライジン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、エライジン酸 (20μg/mL) を24時間処理した。その後、24-well プレートに各細胞 (7 × 10<sup>4</sup> cells/well) 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492 nmで吸光度を計測した。

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)**：Trizol reagent (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 (2μg) 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 μL) はエチジウムプロマイド入りアガロースゲルで電気泳動し発現を確認した。ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を loading control として用いた。なお、Thermal reaction は以下の条件で反応させた。95°C × 5min × 1cycle - (95°C × 30sec-Tm 値 × 30sec -72°C × 30sec) × 45cycles、72°C × 10min × 1 cycle、4°C × ∞

**Aldehyde dehydrogenase assay**：測定には ALDEFLUOR 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時間後にエライジン酸および5-FUを加えた。24時間後に培地を除去し、Assay Buffer・Activated reagent

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

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

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、エライジン酸が 5-FU の抗腫瘍効果に与える影響を明らかにする目的で、エライジン酸の 5-FU 感受性および癌幹細胞への影響を検索した。

#### (1) エライジン酸の細胞増殖能・転移能への影響

エライジン酸の腹腔内投与により CT26 大腸癌細胞によるマウス皮下腫瘍の増大が有意に促進された (Fig. 1A)。さらに、腹膜播種、肝転移、肺転移のいずれのマウス転移モデルにおいても、エライジン酸の

腹腔内投与により転移形成は著明に促進された (Fig. 1B, C, D)。このように、エライジン酸は著明な腫瘍増大・転移の促進作用を有することが示された。

#### (2) エライジン酸の 5-FU 細胞増殖抑制効果への影響

CT26 細胞および CMT93 細胞において、エライジン酸濃度を変えて処理し、5-FU 単独処理した場合とエライジン酸・5-FU を同時処理した場合を比較すると、低用量のエライジン酸では 5-FU の細胞毒性が促進されたが、高用量では促進効果は消失していた (Fig. 2A, C)。これに対し、LL2 細胞では、エライジン酸・5-FU の同時処理による 5-FU の増殖抑制効果に変化は認められなかった (Fig. 2B)。

次に、癌細胞におけるエライジン酸を前処理したのち残存する細胞の数を揃えて巻き直し、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、5-FU 単独処理とエライジン酸前処理後 5-FU 処理の細胞増殖を比較しても、CT26 細胞では減少したのに対し、LL2 細胞および CMT93 細胞では 5-FU 単独処理に比較し細胞数は増

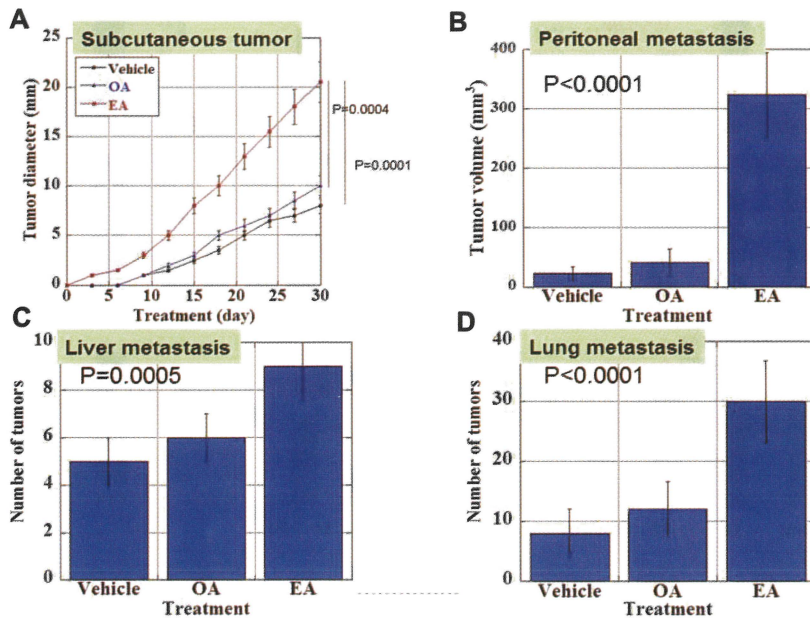


Fig. 1. Effect of elaidic acid on growth and metastasis of CT26 cells. (A) Diameter of subcutaneous tumor of CT26 cells. (B-D) Metastases to the peritoneum (B), liver (C), and lung (D). Mice were administrated intraperitoneally with vehicle (70% ethanol), oleic acid (OA, 10 mg/kg body weight), or elaidic acid (EA, 10 mg/kg body weight). Bar, mean of results of 6 mice. Error bars, SD.

加していた (Fig. 3A-C)。

エライジン酸は 5-FU 増殖抑制効果に関して細胞により差異が見られ、明瞭な一定の量的影響を与えなかったため、癌幹細胞を標的とする質的な影響を知るため、癌幹細胞マーカーを検討した。

(3) エライジン酸の癌幹細胞性への影響

一般的に癌幹細胞マーカーとされる CD133 および nucleostemine (NS) の発現を 3 種類の細胞株を用いて検討した (Fig. 4)。いずれの細胞株においても 5-FU 単独処理とエライジン酸・5-FU 同時処理との間で CD133 発現レベルに差は認められなかった (Fig. 4A,B)。

次に、NS 発現を検討すると、5-FU 単独処理とエライジン酸・5-FU 同時処理を比較すると、CMT93 細胞では有意な発現低下が、と LL2 細胞では有意な発現の増加がみられ、CT26 細胞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)。このよう

に、癌幹細胞マーカーの発現は細胞株によって変化が異なっていた。

さらに、エライジン酸と 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 活性へのエライジン酸と 5-FU の影響を調べた (Fig. 5 A-C)。CT26 細胞と CMT93 細胞では、5-FU 単独処理とエライジン酸・5-FU 同時処理との間で ALDH 活性に変化が認められなかった (Fig. 4A,C)。LL2 細胞では、エライジン酸・5-FU 同時処理で 5-FU 単独処理よりも ALDH 活性に有意な上昇が認められた (Fig. 4B)。

処理後の細胞個々の幹細胞性を検討するため、ALDH 活性を細胞数と DEAB 処理 negative control で標準化すると、CT26 細胞と CMT93 細胞では、エライジン酸・5-FU 同時処理で 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)。これら 3 株の平均をとり比較すると、エライジン酸・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)。

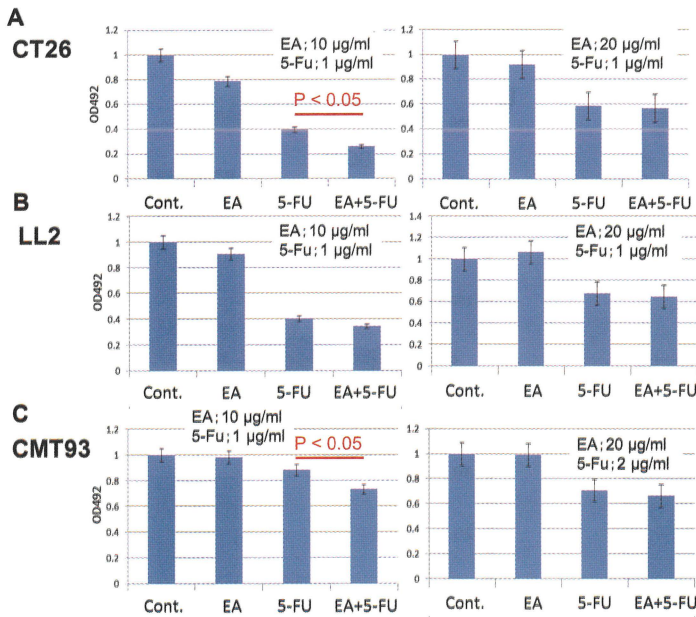


Fig. 2. Effect of elaidic acid on 5-FU cytotoxicity in cancer cells by concurrent treatment of the elaidic acid and 5-FU. CT26 (A), LL2 (B) and CMT93 (C) cells were treated with elaidic acid (EA) (10 µg/mL or 20 µg/mL) and 5-FU (1 µg/mL or 2 µg/mL) for 24 hrs. Error bars, SD.

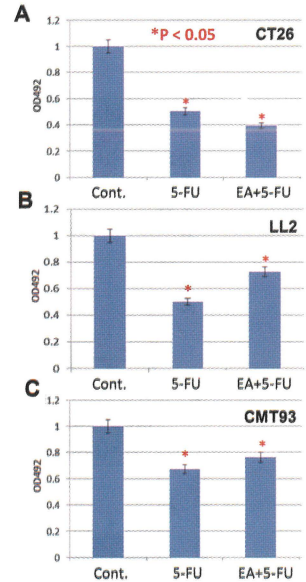


Fig. 3. Effect of elaidic acid pretreatment on 5-FU cytotoxicity in cancer cells. CT26 (A), LL2 (B) and CMT93 (C) cells were pretreated with elaidic acid (EA) (20 µg/mL) for 24 hrs. After that, the cells were treated with 5-FU (1 µg/mL) for 6 hrs (\*P < 0.05). Error bars, SD.

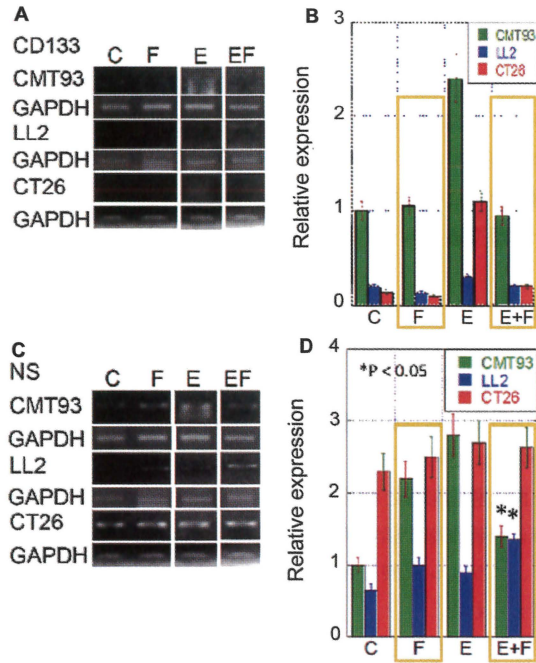


Fig.4. Effect of elaidic acid on CD133 and nucleostemin expression in 5-FU-treated cancer cells.

(A, C) The expression of CD133 and nucleostemin (NS) are a cancer stem cell marker when treated with elaidic acid (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 5-FU (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). (B, D) Graphs showing gene expression quantified based on the representative results. C: untreated cells, F: cells treated with 5-FU, E: cells treated with elaidic acid, EF or E+F: cells treated with elaidic acid and 5-FU. \* $P < 0.05$ . Error bars, SD.

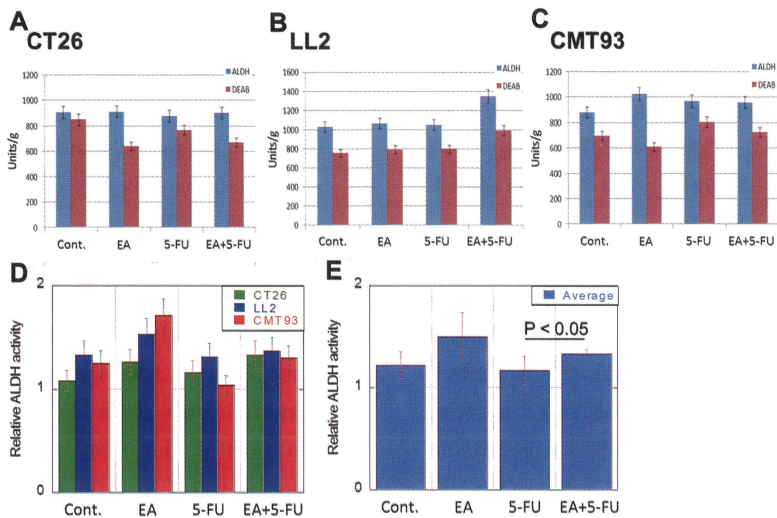


Fig. 5. Effect of elaidic acid on ALDH activity in cancer cells.

CT26 (A), LL2 (B) and CMT93 (C) cells were treated with elaidic acid (EA) and 5-FU. (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.



#### IV. 考 察

トランス脂肪酸は LDL- コレステロールの増加を招き動脈硬化・虚血性心疾患のリスクを高めることが明らかとなっているが<sup>1)</sup>、癌に対する作用に関して詳細は未だに不明な点が多い。本研究ではこの点を明らかにするためオレイン酸のトランス型であるエライジン酸を用いて実験を行った。

マウス転移モデルを用いた検討では、エライジン酸処理により、コントロールと比較して CT26 細胞によるマウス皮下腫瘍の増大、および、腹膜転移、肝転移、肺転移のいずれの転移モデルにおける転移形成も著明に促進させることが明らかになった。このように、トランス脂肪酸であるエライジン酸は腫瘍形成と転移を促進すると考えられた。癌転移に癌幹細胞が強い関連を有することが知られており<sup>3)</sup>、エライジン酸も癌幹細胞への作用を有することが考えられた。

一方、癌幹細胞は化学療法抵抗性にも関与することが知られている<sup>4)</sup>。5-FU の抗腫瘍効果への影響を検討すると、エライジン酸の容量、処理時間、細胞株によって、5-FU の増殖抑制効果の阻害効果は一定ではなかった。また、CD133 および nucleostemin は幹細胞マーカーとして知られるが<sup>5-7)</sup>、エライジン酸処理では、低増殖性幹細胞のマーカーと考えられる CD133 の発現誘導は見られず、高増殖性幹細胞のマーカーと考えられる nucleostemin は細胞株によって異なった反応を示した。このような多様性が見られる背景には、エライジン酸の受容体が同定されておらず、その発現が細胞によって異なる可能性やエライジン酸が細胞膜を構成する脂肪酸としてラフト形成に影響する可能性なども考えられる。

ALDH は幹細胞に高発現していることが知られており<sup>8)</sup>、総合的な幹細胞性のマーカーとして検討を行った。その ALDH 活性は 5-FU 阻害作用や幹細胞マーカー遺伝子発現と同様、一定した変動は認められなかった。このため、処理後の細胞数と negative control により標準化し、個々の細胞の ALDH 活性から細胞単位の幹細胞性を検討したところ、いずれの細胞株でも 5-FU 単独処理と比較して、エライジン酸と 5-FU 同時処理することにより ALDH 活性が亢進する傾向が見られ、3 株の平均では ALDH 活性は有意に亢進していた。この結果から、エライジン酸は 5-FU

処理に対して癌幹細胞性を亢進させ、化学療法に対する抵抗性を増大する可能性が示唆された。食事性因子であるエライジン酸が癌幹細胞性を促進することは、食事内容により化学療法の効果が抑制される可能性が考えられた。

#### V. 結 語

本研究結果より、エライジン酸は癌細胞の 5-FU 感受性に著明な変化は与えないが癌幹細胞の残存を促進することにより、化学療法抵抗性を増す可能性が示唆された。したがって、化学療法時の食事内容に留意することが重要だと考えられる。

#### <参 考 文 献>

- 1) Ganguly R, Pierce GN. Trans fat involvement in cardiovascular disease. *Mol Nutr Food Res*. 56 (7) :1090-6, 2012.
- 2) Awad AB. Trans fatty acids in tumor development and the host survival. *J Natl Cancer Inst*. 67 (1) :189-92, 1981.
- 3) Liao WT, Ye YP, Deng YJ, Bian XW, Ding YQ. Metastatic cancer stem cells: from the concept to therapeutics. *Am J Stem Cells*. 3 (2) :46-62, 2014.
- 4) McCubrey JA, Abrams SL, Fitzgerald TL, et al. Roles of signaling pathways in drug resistance, cancer initiating cells and cancer progression and metastasis. *Adv Biol Regul*. pii: S2212-4926 (14) 00055-4, 2014.
- 5) Ren F, Sheng W-Q, Du X. CD133: A cancer stem cells marker, is used in colorectal cancers. *World J Gastroenterol* 19 (17) :2603-2611, 2013
- 6) Sun Y, Kong W, Falk A, et al.: CD133 (Prominin) negative human neural stem cells are clonogenic and tripotent. *PLoS One*, 4 (5) :e5498, 2009.
- 7) Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, et al.: Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver cancer and other malignancies. *World J Gastroenterol*, 1;10 (9) :1246-9, 2004.
- 8) Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al.

ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell Stem Cell. 1 (5) : 555-567, 2007