

令和元年6月24日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10527

研究課題名(和文) ヒアルロン酸合成阻害剤を用いた進行再発大腸癌に対する新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for advanced and recurrent colorectal cancer using hyaluronic acid synthesis inhibitor

研究代表者

坂本 義之 (Sakamoto, Yoshiyuki)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60361010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：4-methylumbelliferone(MU)は、線維芽細胞においてヒアルロン酸(HA)合成を抑制することが知られていたが、我々はHA合成抑制を介して抗腫瘍効果があることを報告した。この作用機序はこれまでの抗癌剤にはない作用点であり、新たな抗癌剤として有望視される。MUは国内外で利胆剤として長期に使用され、安全性が確立されている。腫瘍内でHAの増加が証明されている大腸癌では、MUによる大きな抗腫瘍効果が期待されるため、臨床応用に向けて研究を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、大腸癌に対する新規抗癌剤並びに新たな分子標的薬の開発はこの10年間ないため、その開発のための基礎的実験に取り組むことを目的とした。その中で4-methylumbelliferone(MU)は、線維芽細胞においてヒアルロン酸(HA)合成を抑制することが知られていたが、それに着目しHA合成抑制を介して抗腫瘍効果があることを報告した。この作用機序はこれまでの抗癌剤にはない作用点であり、新たな抗癌剤として有望視される。

研究成果の概要(英文)：4-Methylumbelliferone (MU) inhibits the cell surface hyaluronan (HA) formation, and that such inhibition results in suppression of adhesion and locomotion of cultured melanoma cells. We have previously reported that 4-methylumbelliferone (MU) inhibits HA synthesis and may be a useful tool for examining the functions of HA. This effect has not been reported so far as an anti-metastatic agent. MU is used domestically and abroad, and safety has been established. In colorectal cancer that shows increased HA in the tumor, MU is expected as a new anti-metastatic agent.

研究分野：消化器外科

キーワード：ヒアルロン酸合成阻害剤 進行再発大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織では間質を構成する細胞外マトリックスに質的・量的変化が高頻度に認められる。**なかでも細胞外マトリックスの主要な糖鎖成分である HA は、大腸癌組織においてその高い産生レベルが癌の進展としばしば関連している。**これまで癌遺伝子産物が HA 合成酵素 (HAS) の遺伝子発現を亢進させ、HA 合成の増加が導かれることが報告されている (Itano N et al. J Biol Chem 279:18679-18687, 2004)。HA 産生が増加すると、癌細胞は HA に富んだ細胞外マトリックスを形成し、腫瘍の成長や癌の浸潤・転移に対して促進作用があると考えられてきた。事実、HAS 遺伝子を用いた糖鎖合成の人為操作によって、HA 産生とマトリックス形成を増加させると、線維芽肉腫細胞における腫瘍形成や転移の促進がみられた (Kosari R et al. Cancer Res 59:1141-1145, 1999)。癌細胞が運動能を獲得し、浸潤・転移に適した環境を細胞周囲に再構築することは、原発巣からの離脱、周辺組織への浸潤、転移巣の形成に必要とされる。**HA は細胞の遊走活性を刺激して浸潤の増強に働くことされ、その背景となっている分子基盤が急速に解明されつつある。**HA を癌細胞に作用させると、CD44 受容体を介して、c-Src や PI-3 キナーゼ、MAP キナーゼなど、細胞内の様々なキナーゼカスケードが活性化される。続いて細胞内骨格系の再編や形質膜のラフリングが誘導され、活発な細胞増殖・移動が起こる。

2. 研究の目的

一方、MU (4-methylumbelliferone: 商品名ヒメコール) は 20 年以上利胆剤として肝胆道疾患に広く臨床応用され、大きな副作用などもなく安全な薬剤として用いられてきた。近年、Kudo らにより MU が HA 合成抑制を介して抗腫瘍効果があることが報告された (Kudo D et al. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 321(4):783-7.)。この作用機序はこれまでの抗癌剤にはない作用点であり、**新たな抗癌剤開発に大きな展望を開くことになり、その独創性は極めて高いと考えられた。**さらに、この抗腫瘍効果はこれまでの抗癌剤と作用点が異なるため併用・追加投与が容易である。ヒトにおける抗腫瘍効果が確認されれば、その早期の臨床への応用は比較的容易でありその臨床的価値は大きいと考えられる。

3. 研究の方法

【平成28年度】

1、Cell growth assay

MU の大腸癌細胞に対する細胞毒性を知るために種々の大腸癌細胞を培地 90 μ l あたり 6.25×10^2 個になるように 96 ウェルプレートに蒔き、細胞を接着させるために 24 時間インキュベートする。ME を 0 ~ 100 μ M になるように各ウェルに加え、24 時間毎に細胞増殖活性を測定する。測定はアラマブルーアッセイにて行う。即ち、各測定時間にアラマブルー (Biosource International) を 10 μ l ずつ各ウェルに注入し、3 時間インキュベート後、プレートリーダーで蛍光度を測定する。

2、MU の培養液中 HA 分析

MU の細胞培養培地中のヒアルロン酸合成抑制効果を知るために、10cm 培養皿で大腸癌細胞を 2.0×10^4 個ずつ蒔き、24 時間インキュベートする。それぞれの培地中に MU を 10 μ M になるように添加する。72 時間後に培養液と細胞を回収し、ヒアルロン酸測定キット (Seikagaku corporation) を用いてヒアルロン酸結合性タンパク質 (HABP) を利用した阻害法を用いて培地中ヒアルロン酸量を定量する。

3、MU の細胞外マトリックスの可視化

MU の細胞外マトリックスへの影響を可視化するために、大腸癌細胞を 35mm ディッシュに 1.5×10^3 個ずつ蒔き、細胞を接着させるために 24 時間インキュベートする。MU を

10 μ M になるように各ディッシュに加え、72 時間インキュベートする。72 時間後、培地を除き、リン酸緩衝液で 2 回洗浄後、1.0 \times 10⁸ 個/ml に調整した羊赤血球(Sigma, UK)を 0.75ml ディッシュに加える。15 分間静置後、顕微鏡で観察し、デジタルカメラで撮影する。

4、Adhesion assay

MU の大腸癌細胞に対する接着能を検討するため、フラスコ型培養 dish にそれぞれ 5 \times 10⁶ 個の大腸癌細胞を蒔き、一晚インキュベートする。MU を 10 μ M に調整して培地に加え、72h インキュベートする。前処理した膀胱癌細胞をトリプシン/EDTA 溶液で剥がした後に 5.0 \times 10⁵ cells/ml に調整し、35mm dish で 60 分間インキュベート後、培地を吸引して除き、PBS 2ml で静かに 2 回洗浄する。dish に残った細胞数を血球計算版で測定し、コントロール群の接着細胞に対する MU 群の接着細胞数の割合を計算する。

5、Locomotion assay

MU の大腸癌細胞に対する遊走能を検討するため MU を 10 μ M に調整した培地中で大腸癌細胞を 72 時間培養する。Control 群は培地のみで 72 時間培養した。Matrigel invasion chamber (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ)を室温にし無血清培地存在下でインキュベートする。プレートに 750 μ l の RPMI1640 + 10%FCS を注入する。その後、大腸癌細胞を無血清培地 500 μ l 中で 5 \times 10⁴cells/ml の懸濁液に調整し、インサートに注入する。24 時間インキュベート (37 度) 後、メタノールで細胞を固定し、ヘマトキシレン染色する。マトリゲルを通過した細胞数の平均を測定する。

【平成 29 年度以降】

1、MU 投与皮下大腸癌移植マウスにおける大腸癌腫瘍体積の測定

ヌードマウスの背部皮下に大腸癌細胞を 5.0 \times 10⁶cells/ml に調整して移植した。3 週間経過後に MU が 3mg / g (weight) / day になるように調節した餌を連日投与する。投与期間中マウスの体重、皮下腫瘍の体積を測定する。

2、大腸癌組織の免疫組織学的分析

皮下移植 9 週間経過後に皮下腫瘍を摘出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋する。まずアビジン溶液、ビオチン溶液で各 20 分インキュベートし、0.3%過酸化水素加メタノール 4 度、30 分間インキュベートする。1%BSA で室温、1 時間インキュベートし、2 μ g/ml ビオチン標識 HAPB で室温、1 時間インキュベートする。HRP 標識 - ストレプトアビジンで室温、15 分間インキュベートし、DAB 基質溶液で発色する。

3、大腸癌腫瘍中 HA の測定

遠心エバポレータを用いて乾燥重量を測定 (60 度、4 時間) する。タンパク質分解酵素溶液を添加 (2.5% アクチナーゼ E/10mM TrisHCL(pH8.0)1000 μ l) し、55 度、24 時間反応させる。100 度、10 分間で煮沸失活後、遠心分離、ろ過し、上清を採取した後、生理食塩水で希釈する。サンプルを HA 測定キットで HA 測定する。

4、MU 投与下腹腔内大腸癌移植マウス(末期大腸癌モデル)における Survival time

大腸癌を 5.0 \times 10⁶ cells/ml に調整してヌードマウスの腹腔内に移植した。大腸癌移植日より MU が 3mg / g (weight) / day になるように調節した餌を連日投与し、連日ヌードマウスを観察する。観察期間終了後に生存曲線を作成する。

4 . 研究成果

実験計画の進行に遅延を認めたため、ヒアルロン酸合成阻害効果を十分に確認するまで

には到達できなかった。そのため、それらのヒアルロン酸合成阻害効果が大腸癌の浸潤を抑制するということの確認に至らなかったが、その過程の結果について以下の学会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

1. 坂本義之、諸橋 一、三浦卓也、赤石隆信、原裕太郎、袴田健一、進行下部直腸癌に対する術前 SOX 療法を用いた治療戦略、第 90 回大腸癌研究会、2019
2. 諸橋 一、坂本義之、小笠原宏一、長瀬勇人、三浦卓也、袴田健一、cT1 大腸癌内視鏡的切除後の追加切除症例の検討、第 89 回大腸癌研究会、2018
3. 坂本義之、諸橋 一、三浦卓也、吉田達哉、佐藤健太郎、鈴木貴弘、袴田健一、進行下部直腸癌に対する治療戦略-術前 SOX 療法+側方郭清の有効性-、第 118 回日本外科学会定期学術集会、2018
4. 坂本義之、諸橋 一、三浦卓也、佐藤健太郎、袴田健一、下部直腸癌に対する腹腔鏡下側方リンパ節郭清、第 30 回日本内視鏡外科学会総会、2017
5. 坂本義之、長谷部達也、諸橋 一、三浦卓也、吉田達哉、佐藤健太郎、工藤大輔、袴田健二、同時性肝転移を有する大腸癌の治療戦略、第 73 回日本大腸肛門病学会、2018
6. 坂本義之、諸橋 一、三浦卓也、佐藤健太郎、袴田健一、高齢者直腸癌に対する治療の現状、第 72 回日本大腸肛門病学会、2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：工藤大輔

ローマ字氏名：Kudo Daisuke

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：00587024

研究分担者氏名：袴田健一

ローマ字氏名：Hakamada Kenichi

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30271802

研究分担者氏名：諸橋 一

ローマ字氏名：Morohashi Hajime

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：30598628

研究分担者氏名：三浦卓也

ローマ字氏名：Miura Takuya

所属研究機関名：弘前大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：30722136

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。