

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10591

研究課題名(和文) ビサボロール誘導体の作用機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Mechanism of action of a bisabolol derivative and its clinical application

研究代表者

國料 俊男 (KOKURYO, TOSHIO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60378023

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)：ヒト癌細胞株においてビスボロール誘導体は増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能を抑制した。網羅的遺伝子解析にてビスボロール投与後にFAK (Focal adhesion kinase) の発現低下を認めた。マウス皮下発癌モデルへのビスボロール、ビスボロール誘導体の経口投与は腫瘍の増殖を有意に抑制した。また徐放性カプセルを用いたビスボロールの薬物投与法は、マウス皮下発癌モデルにおいてジェムシタビンと同様の抗腫瘍効果を示した。質量分析器によるラットの血中ビスボロール測定は定量性が不十分のため、体内動態を明らかにできなかった。更なる研究は必要であるが、ビスボロールによる新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ビスボロール、ビスボロール誘導体による抗腫瘍効果およびその作用機序としてのFAK (Focal adhesion kinase) の関与を明らかにした。新たな知見が明らかになっただけでなく、治療薬としての臨床応用の可能性を明らかにしており、本研究成果の学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Bisabolol derivative suppressed proliferation, motility and invasion and induced cell death in human pancreatic cancer cell lines. Gene analysis revealed that the expression of focal adhesion kinase (FAK) in cancer cell lines was decreased by bisabolol treatment. In addition, bisabolol derivative and bisabolol significantly inhibited the tumor growth in a mouse xenograft tumor model. Bisabolol demonstrated a similar antitumor effect to that of gemcitabine upon application of a novel drug delivery system using capsules. Although bisabolol was measured in rat blood using a mass spectrograph, the pharmacokinetics of the drug was not evaluated. Further investigations will be required for clinical applications. However, this study suggests that novel therapies using bisabolol for treating refractory cancer could be efficacious.

研究分野：消化器外科学

キーワード：ビスボロール 誘導体

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

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は胆管を発生母地とする癌の1つである。われわれの施設では多くの胆管癌手術を行っており、これまでに手術術式の検討・改善により治療成績の向上を図ってきた。しかし転移や腹膜播種や高度浸潤例など手術不能例も多く、胆管癌の根治切除術後の5年生存率は20-30%である。その予後は不良であり、いまだ満足のいくものではない。また手術以外に確実な治療法がなく、抗癌剤の研究が進められているが、その効果も不十分である。現時点の胆管癌治療には限界があり手術以外の有効な治療法の開発が必要である。

テルペノイドは、C5単位のイソプレレンが複数結合してできた天然有機化合物群であり、植物などに幅広く存在している。テルペノイドやテルペノイド誘導体には生理活性を有するものが多く、生体内で重要な役割を果たしており、抗癌剤パクリタキセル、ドセタキセルもテルペノイド誘導体である。ピサボロールは、単環式テルペノイドの一種であり、抗刺激性・抗炎症性・抗菌性を持つことが知られている。近年、抗腫瘍効果に関する報告も散見されている。

我々はピサボロールの胆管癌、膵癌細胞株での増殖抑制および細胞死の誘導、その作用機序におけるPI3キナーゼ-AKTシグナル伝達系やEGR1(Early Growth Response protein 1)の関与、また膵癌皮下発癌モデルにおける抗腫瘍効果を明らかにし、その成果を報告している。

ピサボロールは難溶性であり、水だけでなく油などにもとけにくい物質である。難溶性物質は血中投与した場合には塞栓の可能性があり、経口投与した場合にも、水に溶けないため腸管からの吸収がされにくいと考えられる。ピサボロールは高い抗腫瘍効果を有しているが、臨床応用にはこの難溶性が問題となるため、ピサボロール誘導体の開発を進めてきた。名古屋大学大学院創薬研究科との共同研究により44種類のピサボロール誘導体を合成し、膵癌細胞株を用いたスクリーニングを行った。その結果、13種類のピサボロール誘導体にピサボロール同等の増殖抑制能を認め、構造および安定性などより2種類のピサボロール誘導体26、27を選択した。ピサボロール誘導体26、27は先行実験として行なったマウス皮下発癌モデルへの経口投与により、ピサボロールよりも高い抗腫瘍効果を示した(図1)。

図1



2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでのピサボロールおよびピサボロール誘導体の研究成果を発展させ、臨床応用のためのピサボロール誘導体の詳細なメカニズムを解明と体内動態、副作用の有無などの検討を行なうことである。

3. 研究の方法

(1) ピサボロール誘導体の機能解析

ヒト膵癌由来細胞株(KLM1、Panc1、KP4)に対してピサボロールおよびピサボロール誘導体27を31.25 μ M、62.5 μ M、120.0 μ M、250.0 μ Mを投与し、非投与と各濃度において投与前、投与後24、48時間後の増殖能をMTTアッセイにて経時的に検討した。

ヒト膵癌由来細胞株(KLM1、Panc1、KP4)に対してピサボロールおよびピサボロール誘導体

27 を 31.25 μM 、62.5 μM 、120.0 μM 、250.0 μM を投与し、非投与と各濃度において投与 24 時間後の細胞死誘導能についてトリパンブルー色素排出試験にて、アポトーシスについては MuseTM Annexin V & Dead Cell kit MuseTM Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。

ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1)、膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) に対してピサボロールおよびピサボロール誘導体を 62.5 μM 投与し、24 時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24 時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

(2) ピサボロール誘導体の基礎的研究

ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1) に対して、ピサボロールを 62.5 μM 投与し、ピサボロール投与群とピサボロール誘導体投与群より RNA の抽出後に、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行なった。ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1) に対して、ピサボロールを 62.5 μM 投与後の FAK (focal adhesion kinase) タンパクの発現をウェスタンブロッティングにて検討した。

ラットへのピサボロール投与後に、ラット頸静脈より採血を行ない、血中のピサボロールを質量分析器により測定し、ピサボロールの体内動態を検討した。

ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1)、膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) に対してピサボロールをエタノールに溶解したエタノール溶液とピサボロールをシクロデキストリンに溶解したシクロデキストリン溶液を投与し、投与後の細胞形態の変化また細胞死を検討した。FAK (Focal adhesion kinase) タンパクのリン酸化をウェスタンブロッティングにて検討した。

FAK に対する siRNA を作成し、ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1)、膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) に導入した。導入前、導入後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。導入 24 時間後の細胞死誘導能についてトリパンブルー色素排出試験にて、アポトーシスについては MuseTM Annexin V & Dead Cell kit MuseTM Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。導入 24 時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24 時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

ヒト胆管癌由来細胞株 (HUCCT1)、膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) への FAK siRNA の導入後、ピサボロール 62.5 μM を投与した。FAK とピサボロール同時投与における有効性について投与前、投与後 24、48 時間後の増殖能を MTT アッセイにて経時的に検討した。投与 24 時間後の細胞死誘導能についてトリパンブルー色素排出試験にて、アポトーシスについては MuseTM Annexin V & Dead Cell kit MuseTM Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。投与 24 時間後の運動能についてはスクラッチアッセイ、24 時間後の浸潤能についてはインベーションアッセイにて検討した。

(3) 担癌動物モデルを用いたピサボロールの有効性の検討

膵癌細胞株 KLM1 による膵癌皮下発癌モデルにピサボロールおよびピサボロール誘導体を経口投与し経時的な腫瘍体積の変化を観察した。切除標本を用いたウェスタンブロッティング法に AKT の発現を検討した。

経口投与以外の薬物投与方法としてラット頸静脈よりカテーテルを挿入し、ピサボロールの経静脈的投与を行ない、2 週間後にカテーテル挿入部の観察を行ない、経静脈的投与の有効性を検討した。

膵癌細胞株 KLM1 による膵癌皮下発癌モデルの腹腔内にピサボロールを入れた徐放性カプセルを留置し、経時的な腫瘍体積の変化を観察した。

膵癌細胞株 KLM1 による膵癌皮下発癌モデルに対して、頸静脈に挿入したカテーテルを介して

徐放性カプセルからのピサボロールを溶解したシクロデキストリン溶液を投与し、未治療群とジェムシタピン投与群との経時的な腫瘍体積の変化を比較検討した。

4. 研究成果

(1) ピサボロール誘導体の機能解析

ヒト膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) に対してピサボロール誘導体 27 の投与により、増殖能、細胞死誘導能、運動能、浸潤能について検討した。増殖能に関して、いずれの細胞株においてもピサボロール誘導体 27 は未治療群と比較して有意に増殖を抑制した。KLM1、KP4 は、ピサボロールと比較してピサボロール誘導体 27 で有意に増殖を抑制したが、Panc1 では、ピサボロールとピサボロール誘導体 27 で有意差を認めなかった。細胞死誘導能に関して、62.5 μ M のピサボロール誘導体 27 では Panc1 の細胞死に有意差が認められなかったが、125 μ M のピサボロール誘導体 27 では KLM1、Panc1、KP4 すべてで細胞死の誘導に有意差を認めた。また KLM1、Panc1、KP4 のいずれの細胞株においても未治療群、ピサボロール投与群と比較してピサボロール誘導体 27 においてアポトーシスが最も誘導されていた。またいずれの癌細胞株においてもピサボロール誘導体により運動能および浸潤能が抑制された。

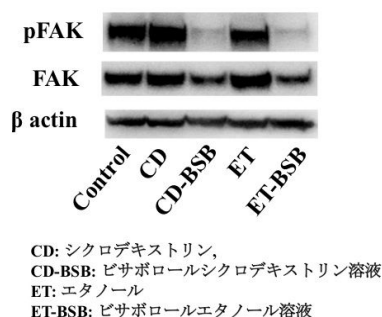
(2) ピサボロール誘導体の基礎的研究

ヒト胆管癌由来細胞株へのピサボロール投与後に DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析により、発現減弱している遺伝子として FAK (Focal adhesion kinase) を同定した。ヒト膵癌由来細胞株 (KLM1、Panc1、KP4) に対するピサボロール投与後の FAK の発現に関してウェスタンブロットングによる発現を検討した。ピサボロール投与群において FAK の発現低下を認めた。

ピサボロールの体内動態の検討のためピサボロールをラットに投与後、採血を行ない、血中のピサボロールを質量分析器による検討を行った。ラット血清中にコントロールと同様のピサボロールのピークが確認できた。しかし、ピサボロールの測定値と血中濃度に関して定量性が不十分であり、ラット体内でピサボロールがどの程度代謝されているか体内動態を明らかにできなかった。

エタノール溶液ではなく、シクロデキストリン溶液へのピサボロール溶解による薬物投与法の開発を行なった。ヒト胆管癌由来細胞株、膵癌由来細胞株に対して、シクロデキストリン溶液へのピサボロール溶解は、エタノール溶液の場合と比較して細胞形態の変化および細胞死に関して同様の効果を認めた。ウェスタンブロットングにおいても同様に FAK (Focal adhesion kinase) のリン酸化の低下を認めた (図 2)。

図 2



ヒト胆管癌由来細胞株、膵癌由来細胞株において FAK に対する siRNA を作成し、これらの siRNA を用いて増殖能については MTT アッセイ、細胞死に関して TUNEL 法、運動能についてはスクラッチアッセイ、浸潤能についてはインベションアッセイを行った。FAK の抑制により増殖抑制、運動能抑制、浸潤抑制を認めた。FAK siRNA による FAK の抑制後にピサボロールを投与し、増殖能に

ついては MTT アッセイ、細胞死に関して TUNEL 法、運動能についてはスクラッチアッセイ、浸潤能についてはインベションアッセイを行ったが、FAK 単独抑制の場合と比較して有意差を

認めなかった。FAK の抑制による相乗効果を認めなかった。

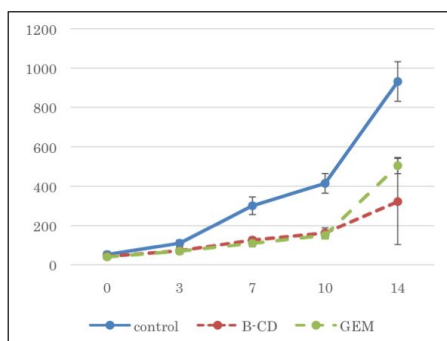
(3) 担癌動物モデルを用いたピサボロールの有効性の検討

膵癌皮下発癌モデルにピサボロールおよびピサボロール誘導体を経口投与し経時的な腫瘍体積の変化を観察した。未治療群と比較してピサボロール投与群とピサボロール誘導体投与群において有意な腫瘍の増殖抑制効果を認めた。また切除標本を用いたウェスタンプロティング法に AKT の発現を検討した。未治療群、ピサボロール投与群と比較してピサボロール誘導体投与群において AKT の発現は減弱していた。

ピサボロールの投与により異なる薬理作用を認めたため、投与方法の検討を行なった。経口投与以外の方法として、頸静脈よりカテーテルを挿入し経静脈的投与を行なった。経静脈的投与は可能であったが、長期間のカテーテル挿入では、漏れが生じ投与方法として不十分であった。そのためマウス皮下発癌モデルの腹腔内に徐放性カプセルを留置し、ピサボロールの投与を行なった。徐放性カプセル内のピサボロールは排出され、投与自体は問題なかった。しかし、腫瘍サイズの検討により抗腫瘍効果については十分に確認できなかった。

徐放性カプセルよりカテーテルを介してピサボロールの経静脈的投与を行なった。従来のエタノール溶液へのピサボロールの溶解では効果不十分であったため、シクロデキストリン溶液へのピサボロールの溶解後、マウス皮下発癌モデルへ投与した。その結果、マウス皮下発癌モデルにおいて未治療群と比較して腫瘍の増殖抑制効果を認めた(図3)。

図 3



B-CD: ピサボロールシクロデキストリン溶液
GEM: ジェムシタビン

その効果はジェムシタビンと同様であり、これまで報告した経口投与に必要なピサボロール量よりの減量が可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Tsunoda N, Ebata T, Nagino M. NEK2 Is an Effective Target for Cancer Therapy With Potential to Induce Regression of Multiple Human Malignancies. *Anticancer Res.* 2019 May;39(5):2251-2258. doi: 10.21873/anticancer.13341. PMID: 31092416 (査読有)

Baba T, Kokuryo T, Yamaguchi J, Yokoyama Y, Uehara K, Ebata T, Nagino M. Pre-exposure to Fluorouracil Increased Trifluridine Incorporation and Enhanced its Anti-tumor Effect for Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2018 Mar;38(3):1427-1434. PMID: 29491068 (査読有)

Murata Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Miwa T, Shibuya M, Yamamoto Y, Nagino M. The Anticancer Effects of Novel -Bisabolol Derivatives Against Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.* 2017 Feb;37(2):589-598. PMID:28179305 (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Baba T, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Nagino M. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin encapsulated -bisabolol (CD-BSB) improves the antitumor effect of -bisabolol for pancreatic cancer American Association of Cancer Research 2018.9.21

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：榑野 正人

ローマ字氏名：(NAGINO,masato)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 20237564

研究分担者氏名：横山 幸浩

ローマ字氏名：(YOKOYAMA,yukihiro)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：寄附講座教授

研究者番号(8桁): 80378091

研究分担者氏名：山口 淳平

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI,junpei)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁): 00566987

(2)研究協力者

なし