

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10539

研究課題名(和文) 乳癌に対する新規免疫漢方治療の確立

研究課題名(英文) New immune-Kampo therapy for breast cancer patients

研究代表者

長田 拓哉 (Nagata, Takuya)

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：40303242

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)：1、アスナロ精油による抗腫瘍効果：アスナロ精油を胃癌、食道癌、大腸癌、乳癌細胞株とそれぞれ反応させたところ、いずれの細胞株に対しても濃度依存的、時間依存的にアポトーシスを誘導した。腹腔内に胃癌細胞を投与したヌードマウスにアスナロ精油を吸引させたところ、コントロールと比較して腹膜播種転移が有意に抑制された。

2、アスナロ精油における抗腫瘍メカニズムの解明：アスナロ精油を分画し、ツヨブセンを同定した。ツヨブセンは抗腫瘍効果を有し、癌細胞にアポトーシスを誘導することを確認した。またツヨブセンが癌細胞内でPKM2と会合することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PKM2は癌細胞において、転移、増殖に必要な大量のエネルギーを産生するために重要な分子であり、ツヨブセンがPKM2と結合して癌のエネルギー産生経路をブロックすることにより、癌細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。このことから、アスナロ精油には腫瘍細胞の増殖を抑制する作用があり、高齢者や抗癌剤が使用困難な高リスク患者に対して新しい治療法となる可能性がある。アスナロ精油は明らかな副作用を示さず芳香剤として一般的に用いられていることから、新しい機能を持った製品として実用化できる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：1. Antitumor effect of essential oil of asunaro. When the asunaro essential oil was reacted with gastric cancer, esophageal cancer, colon cancer and breast cancer cell lines respectively, apoptosis was induced in all cell lines. When asunaro essential oil was aspirated into nude mice intraperitoneally administered with gastric cancer cells, peritoneal dissemination was significantly suppressed compared to controls.

2. Elucidation of anti-tumor mechanism in asunaro essential oil. Asunaro essential oil was fractionated to identify tsujopsen. It was confirmed that tsujopsene has an antitumor effect and induces apoptosis in cancer cells. Moreover, it was revealed that tsujopsen associates with PKM2 in cancer cells.

研究分野：乳癌、甲状腺癌の治療

キーワード：アスナロ精油 ツヨブセン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アロマセラピーは香りによる治療法として良く知られており、ストレス抑制効果や殺菌効果、認知症の改善効果等、幅広い効果が報告されている。アロマセラピーに用いられる精油製剤のうち、ヒバ(アスナロ)は青森と能登で主に栽培されており、既に商品化されている青森ヒバ精油にはリラクゼーション効果や抗菌作用、防虫効果等が示されている。我々はこれまでの研究から、能登ヒバ、並びにアスナロ精油の揮発成分が抗腫瘍効果を示すことが明らかにした(Nagata T et al. Clin Exp Pharmacol 2016)。さらにマウスを用いた実験では、アスナロ精油は明らかな副作用を誘導せずに、胃癌細胞の腹膜播種転移や皮膚転移の増殖を抑制することが示された。

2. 研究の目的

アスナロに含まれる抗腫瘍因子を同定するとともに、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アスナロ精油とヒノキチオールの調整

本研究においてアスナロ精油(AEO)は主に加賀木材(カナアテ)、およびYUICA(アスナロ)の製品を使用している。これらは水蒸気蒸留法を用いて精製され、その含有成分をGC-MSを用いて評価されている。原材料中のAEO含有量は1.5-2.0%である。AEOの濃度が 10^{-2} g/mLになる様にDimethyl sulfoxide(DMSO)が加えられた。このAEO溶液が以後の実験に用いられた。ヒノキチオールはWAKO(Osaka, Japan)から購入し、 10^{-2} g/mLの濃度になる様にDMSOに溶解され、 -20°C で保存された。

(2) 細胞株と培養条件

胃癌細胞株(MKN45)はAmerican Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)から購入した。MKN45細胞は5% FCSを含んだDMEM培養液で培養された。全ての培養液に抗生剤が加えられた。

(3) 細胞増殖アッセイ

AEO溶液、またはAEO蒸散成分(vAEO)による抗腫瘍効果はMTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)アッセイを用いて定量化された。癌細胞は96-wellプレートに 1×10^4 per 100 mLの割合で調整された。AEO溶液は $0.00006 \sim 2$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で培養細胞に投与され、 37°C で1-72時間培養された。MTT反応後、multi-function plate reader(Filter Max F5; Molecular Devices, Wokingham-Berkshire, UK)を用いて595 nmの吸光度を測定した。

(4) 形態の観察とアポトーシス反応の評価

AEO溶液、あるいはAEO蒸散成分(vAEO)によるMKN45胃癌細胞株への抗腫瘍効果は、偏光顕微鏡を用いて個々の細胞を観察することにより評価された。さらにAEO溶液、あるいはvAEOのアポトーシス誘導効果はTUNEL反応キット(In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)を用いて評価された。

(5) AEO中抗腫瘍因子の単離

アスナロ精油1.05gにヘキサン20mLx4回、MeOH20mLx2回を加えて静置し、可溶部を抽出した。得られた抽出物(610mg)について、がん細胞に対する毒性作用を指標として、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン-酢酸エチル-メタノール系)による分画・精製を行なった。得られた化合物をEIMS(GSMS)を用いて解析し、 1H-NMR および 13C-NMR から分子を同定した。

(6) Drug affinity responsive targets stability (DARTS) Analysis

MKN45細胞をPBSで洗浄した後に、protease and phosphatase inhibitor cocktail(Thermofisher Scientific)入りのM-PER(Thermofisher Scientific)に溶解した。ツヨブセ

ン溶液 (10 mM)を cell lysate に加えて 25 °C で 30min 反応させた。この溶液に thermolysin を 1: 0.1 の割合で加えて 37 °C で 30min 反応させ、DARTS 反応を行なった。分離されたバンドは silver staining kit (Silver Quest; Thermofisher Scientific) を用いて染色し、ツヨブセン存在下で細くなる位置のバンドを切り取り、Japan Bio Services (Asaka, Japan)にて Nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (nano-LC-MS/MS)解析を行なった。

(7) 乳酸アッセイ試験

Lactate Assay Kit-WST (Dojindo, Tokyo, Japan)を用いて、ツヨブセンと反応させた MKN45 細胞における乳酸産生の変化について解析した。

4. 研究成果

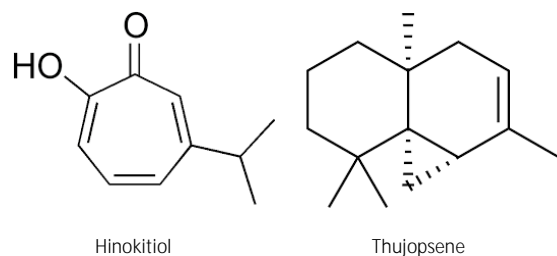
(1) AEO 中の抗腫瘍因子・ツヨブセンの同定

アスナロ精油中の抗腫瘍因子を同定する目的で、アスナロ精油にヘキサンを加えて有機溶媒抽出物を得た。この抽出物を、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて分画し、MTT assay による抗腫瘍効果を指標として、ツヨブセンを同定した。

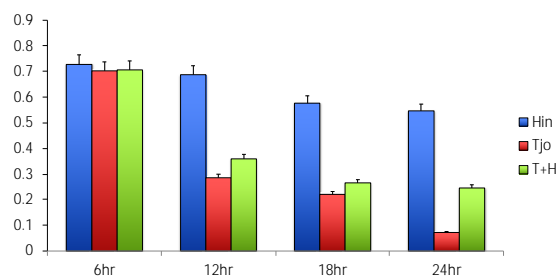
(2) ツヨブセンとヒノキチオールとの抗腫瘍効果

アスナロ精油中にはヒノキチオールが 1%程度存在している。ヒノキチオールとツヨブセンはどちらも分子量が小さく、蒸散しやすい(図 2 a)。そこでヒノキチオールをツヨブセンの抗腫瘍効果について解析した。ヒノキチオール、ツヨブセンおよびヒノキチオール+ツヨブセン (Mix) のそれぞれと MKN45 を反応させて、その抗腫瘍効果について MTT assay を用いて解析した。その結果、ツヨブセンはヒノキチオールよりも短時間で強力に MKN45 細胞の増殖を抑制した(図 2b)。

(a)



(b)

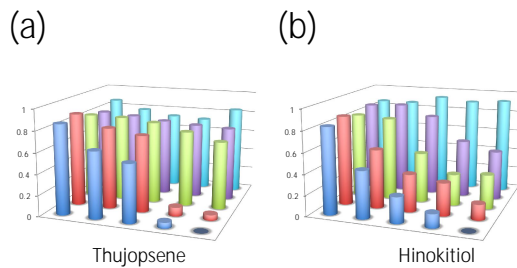


(3) ツヨブセンとヒノキチオールの蒸散成分による抗腫瘍効果

次にツヨブセンとヒノキチオールの蒸散成分における抗腫瘍効果を比較する目的で、それぞれ

の溶液(0.001g in 0.1ml)を 96 well plates の端の well に入れ、AEO 溶液と触れない様に他の well に MKN45 細胞を入れて反応させた。腫瘍細胞の増殖抑制効果は MTT assay を持ちいて比較検討された(図 3a、3b)。その結果、ツヨブセンとヒノキチオールはそれぞれ距離依存的に胃癌細胞の増殖を抑制した。両者の到達距離と抗腫瘍効果を比較すると、ヒノキチオールはツヨブセンよりも広い範囲で抗腫瘍効果を示した。一方ツヨブセンは、到達範囲は狭いものの、その抗腫瘍効果はヒノキチオールよりも強かった。

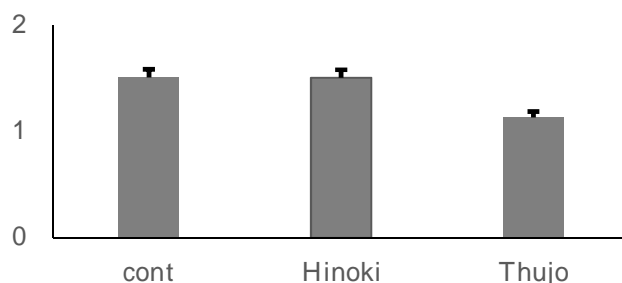
以上より、ツヨブセンは狭い範囲で強い抗腫瘍効果を持ち、ヒノキチオールは広い範囲で比較的弱い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。



(4) ツヨブセンによる抗腫瘍メカニズム

ツヨブセンの抗腫瘍メカニズムを明らかにするためには、ツヨブセンが癌細胞内で会合する分子を明らかにする必要がある。DARTS 法を用いてツヨブセンと結合するタンパクを同定した。まず MKN45 の cell lysate にツヨブセンを加えて反応させた。この溶液に thermolysin を加えて 37 °C で 30 分反応させ、DARTS 反応を行なった後に、SDS-PAGE による解析を行なった。ゲルを銀染色すると数多くのバンドが認められた。このうちツヨブセンと反応して細くなったバンドを切り出して nano-LC-MS/MS 解析を行い、ツヨブセンの結合タンパクとして PKM2 を同定した。

PKM2 は解糖系に關与するタンパクであることが知られている。ツヨブセンを反応させることにより解糖系反応がどのように変化するかを調べるためにツヨブセンを反応させた MKN45 細胞における Lactate の評価を行なった。その結果、ツヨブセンを反応させた MKN45 細胞では Lactate の産生が低下した(図 5)。またウエスタンブロットによる解析では、ツヨブセンと反応させた MKN45 細胞では、ブドウ糖を細胞内に引き込む膜タンパクである GLUT1、および PKM2 の発現が増強していた(図 4)。以上より、ツヨブセンは PKM2 と結合してその代謝を抑制することにより、PKM2 による解糖系反応を抑制する作用を示すことが示唆された。



(5) 考察

ヒバ精油に1%程度含まれているヒノキチオールには、抗菌作用以外にも各種癌の増殖を抑制する作用やアポトーシスを誘導する作用が報告されており、その臨床応用が期待されている(Huang CH et al. *Molecules* 2015, Liu S et al. *BBRC* 2006, Li LH et al. *PLoS one* 2014)。ヒノキチオールの抗腫瘍メカニズムについては、腫瘍細胞における MMP9/2 抑制、NF- κ B/ MAPK シグナル伝達経路抑制、SOD 活性上昇、OH \cdot ラジカル抑制などに関する報告がある (Jayakumar T et al. *Int J Mol Sci.* 2018, Huang CH et al. *Molecules.* 2015)。今回の研究により、ヒノキチオールには Caspase3 の活性化により、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する事が示された。

今回、我々はアスナロ精油中の抗腫瘍因子としてツヨブセンを同定した。ツヨブセンは水蒸気蒸留精製されたアスナロ精油中に60%程度と大量に濃縮されて存在しており、効率的に製剤を装薬することができる利点がある。さらにその抗腫瘍効果はヒノキチオールよりも高い事が示された。これまでの研究では、ツヨブセンが PI3K 経路をブロックすることにより、mTOR, AKT の発現が抑制され、腫瘍細胞の増殖を抑制するメカニズムを示唆する報告がある (Bordoloi M et al. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018)。

今回、DARTS 法を用いた研究により、ツヨブセンが PKM2 と会合する事が示された。ピルビン酸キナーゼである PKM2 はタンパクリン酸化活性を持つ2量体と解糖活性を持つ4量体からなり、腫瘍組織に多く発現する事が報告されている (N. Wong et al. *Int. J. Cell Biol.* 2013)。腫瘍細胞は主に解糖経路を通じて ATP を取得する事が知られている。この現象はワールブルク効果と呼ばれ、腫瘍細胞の増殖に重要な役割を果たしている (Warburg O. *Science.* 1956)。PKM2 を発現する腫瘍細胞においては、グルコースに由来する炭素のクエン酸回路への流入が制限されるとともに、乳酸の産生が促進される。今回の研究により、ツヨブセンを作用させた胃癌細胞株においては、PKM2 の作用がブロックされた結果、乳酸の産生が抑制された。この時、ヒノキチオールを作用させても乳酸の酸性は抑制されなかった。以上より、ツヨブセンは癌細胞の解糖系路をブロックすることにより抗腫瘍効果を誘導する事が示された。ツヨブセンを用いた抗腫瘍製剤は他になく、抗腫瘍吸入製剤や塗布製剤も存在しない事から、本製品は極めて新規性、ならびに独自性の高い製品になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuya Nagata
2. 発表標題 KLF4 improve prognosis of triple negative breast cancer by suppression of epithelial mesenchymal transition.
3. 学会等名 2018 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 ヒバ精油による新規抗腫瘍剤の開発
3. 学会等名 JST新技術説明会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 “能登ヒバ精油”を用いて癌の増殖・転移を抑制する芳香治療薬の開発
3. 学会等名 イノベーションジャパン2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 “能登ヒバ精油”を用いて癌の増殖・転移を抑制する芳香治療薬の開発
3. 学会等名 Toyama Academic GALA 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 新規チップシステムを用いた乳癌CTCの解析
3. 学会等名 第1回Liquid Biopsy研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 漢方を用いた消化器癌増殖転移抑制効果の研究
3. 学会等名 第117回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長田拓哉
2. 発表標題 消化器癌術後転移再発抑制効果を目指した漢方治療の研究
3. 学会等名 第72回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 長田拓哉	権利者 富山大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-036853	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小澤 龍彦 (Ozawa Tatsuhiko) (10432105)	富山大学・学術研究部医学系・助教 (13201)	
研究分担者	奥村 知之 (Okumura Tomoyuki) (10533523)	富山大学・学術研究部医学系・講師 (13201)	