

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15666

研究課題名(和文) 抗アレルギー薬のドラッグリポジショニングによる膵発がん予防薬への臨床応用基盤

研究課題名(英文) Chemopreventive effect of anti-allergy drug as drug-repositioning on pancreatic carcinogenesis

研究代表者

加藤 寛之 (Hiroyuki, Kato)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・助教

研究者番号：80791293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：以前の疫学調査の結果、アレルギー疾患罹患患者かつ治療歴の長い患者は膵癌の発生は低いという報告がなされた。この報告から抗アレルギー薬には膵癌発生予防効果があるのではないかと考えハムスター膵発癌モデルを用いて実験を行った所、4種類の抗アレルギー薬からロイコトリエン受容体拮抗薬のみが有意な膵発癌予防効果が有ることが分かった。その機序として、膵星細胞内から分泌される物質を修飾する事により、Smad3経路を介して増殖抑制効果を来している事が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は治療抵抗性で、5年生存率の最も悪い固形癌の一つであるため、膵癌になる前予防するという化学予防という考え方も重要になる。さらに、近年ドラッグリポジショニングという考え方は安全性の担保された薬剤を用いるということで臨床応用につながる可能性は高い。その中で疫学調査を元に、ロイコトリエン受容体拮抗薬が膵発癌予防剤として有効であるとin vivoで証明出来たことは、同薬を膵発癌に対するドラッグリポジショニング薬として用いる臨床基盤として示す事が出来たことは意義深く、社会に対する還元力も高い。

研究成果の概要(英文)：Previous epidemiological study reported that incidence of pancreatic ductal carcinoma (PDAC) is low in patients who have allergy, in particular received treatment for long time. Thus, we hypothesized that anti-allergy drugs have chemopreventive effect against PDACs. In hamster PDAC model, only Montelukast (Mont), one of leukotriene antagonist, prevented pancreatic carcinogenesis in four drugs. As one mechanism, Mont modulate secretion from pancreatic stellate cells, and it may be involved in down-regulation of proliferation via Smad3 pathway.

研究分野：実験病理

キーワード：膵癌 抗アレルギー薬 化学予防 ロイコトリエン受容体拮抗薬 ハムスター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期発見が難しく、効果的な治療法にも乏しいため、5年生存率は10%未満と極めて予後不良な悪性腫瘍の一つである。従って、より早期からの膵癌発生機構を解明し、有効な予防法を開発することは重要な喫緊の課題である。また、当初型アレルギー疾患である喘息やアレルギー性鼻炎患者を対象とする疫学調査が報告された。その中で喘息罹患患者は非罹患者に比べ、膵癌発症率は有意に低下すること、さらに、治療介入が長期の患者はより膵癌の発症率が減少することが明らかとなった(Paulina G *et al*, Gut, 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、ハムスター膵癌モデルを用いて型アレルギー薬の化学予防効果を検討する。さらに組織における遺伝的背景に基づく網羅的な解析を行い、メカニズム解析を行うことにより、抗アレルギー薬を用いた膵癌予防法の樹立に向けドラッグリポジショニング研究を行う。

3. 研究の方法

(1) ハムスター膵癌モデルを用いた抗アレルギー薬の化学予防効果の検討

6週齢の雌シリアンゴールドンハムスター48匹に実験開始時から高脂肪食を摂餌し、その3日後(6週齢時)からN-nitrosobis(2-oxopropyl)amine(BOP) 10mg/kgの皮下投与を4回隔日投与した。1週間の休薬後、各群12匹ずつ4群に分け、それぞれ対照群に対し、人への投与量から概算し、ロイコトリエン受容体拮抗薬(Montelukast; Mont)(5ppm)群、選択的H1受容体拮抗薬(Levocetizine: Levo)(2.5ppm)群、選択的 β_2 アドレナリン受容体作動薬(Bambterol: Bamb)(5ppm)群として飲水投与した。10週間飲水投与後の18週齢時に全匹解剖し、膵全体の膵癌の発生頻度、個体当たりの個数をHE染色標本にて評価した。

(2) ロイコトリエン受容体拮抗薬の膵癌化学予防効果の再検討

Montの濃度を分け、1群あたりの個体数を増やし、投与期間の延長を行い再検討した。同様のハムスター膵癌モデルを用い、それぞれ対照群(n=17)、Mont低容量群(0.1mg/kg/day, n=15)、Mont中容量群(0.2mg/kg/day, n=15)、Mont高容量群(0.4mg/kg/day, n=15)とし飲水投与を行った。13週間の飲水投与後屠殺し、膵全体の膵癌の発生頻度、個体当たりの個数をHE染色標本にて評価した。

(3) ハムスター膵組織を用いたmRNAマイクロアレイ解析

ハムスター膵組織内での早期での変化をみるために、ハムスターにBOPを投与後、高脂肪食を4週間摂餌させた個体(n=3)とMont(0.4mg/kg/day)を同時に飲水させた個体(n=3)から膵全体を凍結組織として採取し、mRNAを抽出した。それぞれの個体に対しmRNAの網羅的解析を行い、膵全体での変化を検討した。その結果をRT-PCRにより確認した。

(4) ハムスター膵組織におけるSmad3の免疫組織学的検討

(3)の検討から、Smad3発現が重要であると考え、(2)のハムスター組織内の前癌病変であるPanIN2病変内でのSmad3の核陽性率を免疫組織化学的に検討した。

(5) In vitroにおける抗アレルギー薬の膵癌細胞への影響

膵癌細胞への増殖抑制効果について抗アレルギー薬を確かめるために薬剤投与後48時間後におけるWST-1 assayをヒト膵癌細胞株(MIAPaCa, PANC1)。ハムスター膵癌細胞株(HPD1NR)に対して行った。

(6) In vitroにおけるMontのPancreatic Stellate Cell (PSC)に対する影響とPSC分泌物の膵癌細胞に対する影響

PSC 細胞(HPaSteC)に対して、Mont を投与し WST-1 によって増殖に対する影響を確認した。

PSC に対して Mont(1-10 μ M)を 48 時間作用させた後、無血清培地に交換し、24 時間後の PSC 分泌物を含有した培地を PANC1 細胞に添加し増殖変化を見た。

4. 研究成果

(1)ハムスター膵発癌モデルに対する抗アレルギーの膵発癌抑制効果(図 1-)

実験期間中に抗アレルギー薬投与による摂餌量変化は見られなかったが、選択的 H1 ブロッカー投与群で、対照群に対し有意な体重増加が見られた。膵癌発生を見ると、膵臓には対照群で 5/12 匹(42%)に膵癌を認め、Mont、Levo、Bamb 群では各々 3/12 匹(25%)、6/12

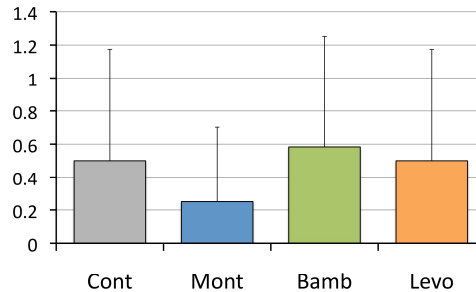


図1 膵癌の個体あたりの発生数

匹(50%)、5/12 匹(42%)と Mont 群では抑制傾向は見られるものの有意差は見られなかった。個体あたりの発生数も対照群が 0.5 ± 0.67 個に対し、Mont 群で 0.25 ± 0.45 個と低下傾向はみられたが有意差は見られなかった(図 1)。

(2) ロイコトリエン受容体拮抗薬の膵発癌抑制効果の再検討(図 2)

(1)の結果、ロイコトリエン受容体拮抗薬での膵癌化学予防効果が示唆されたが対照群での膵癌発生数がこれまでの結果より低い傾向があり有意差が見られなかった。そこでより詳細な検討を行った。実験期間中にいずれの群間にも体重、摂餌量に有意差は見られず、飲水投与した薬剤摂取量も問題は見られなかったまた屠殺時の相対肝重量、相対腎重量も各群有意差は見ら

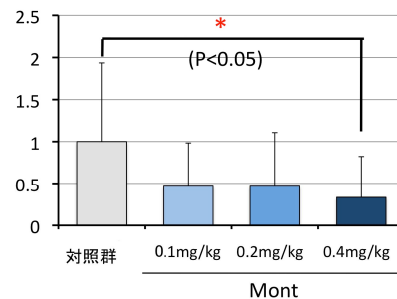


図2 膵癌の個体あたりの発生数

れなかった。膵癌の発生頻度は対照群で 65%(11/17) に対し、Mont 0.1, 0.2, 0.4mg/kg/day 投与群ではそれぞれ 53%(8/15), 53%(8/15), 40%(6/15)と濃度依存性に低下傾向が見られたが有意差は見られなかった。個体あたりの発生数は Control 群が 1.06 ± 1.03 個に対し、Mont

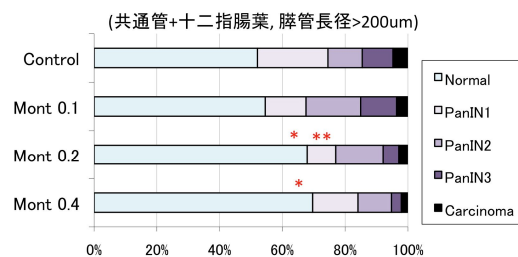


図3 膵管進行度分類

0.1, 0.2, 0.4mg/kg/day 投与群群では各々 0.53 ± 0.52 個、 0.53 ± 0.52 個、 0.4 ± 0.5 個と Mont 0.4mg/kg 群で有意な低下を認めた($P < 0.05$)。また濃度依存性に腫瘍発生数の低下を見る有意な弱い相関を認めた(Pearson rho = -0.30, $P = 0.02$)(図 2)。さらに、十二指腸葉内の膵管(共通管含む、膵管長径 $> 200 \mu m$)を正常膵管、PanIN1-3、膵管癌と割合を見ると、Mont 0.2mg/kg, 0.4mg/kg 群で有意に正常膵管が増殖していることがわかった(図 3)。さらに膵癌内の増殖マーカーである Ki67 labeling index は Control 群 $8.9 \pm 3.5\%$ に対し、Mont 0.4mg/kg 群では $4.6 \pm 2.2\%$ と有意に低下していた($P < 0.05$)。

(3) ハムスター膵組織を用いた mRNA マイクロアレイ解析

Mont 投与により膵内で 2/3 以下になる遺伝子群が 893 遺伝子見つかり、1.5 倍以上上昇した遺伝子群が 952 遺伝子見つかった。その中で比較的発現が保たれておる遺伝子群を種々RT-PCR で確認した所、*smad3* 発現が有意に低下する事が分かった (図 4)。

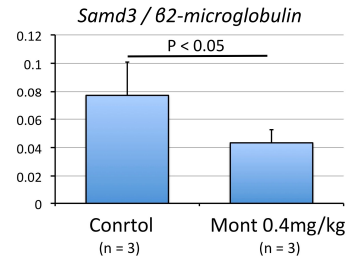


図4 膵組織全体の*Smad3* のmRNA発現変化

(4) ハムスター膵組織における *Smad3* の免疫組織学的検討

(2) 実験群におけるハムスター膵組織内の PanIN2 病変内の *Smad3* 免疫染色を比較した所、いずれの群においても有意な *Smad3* 核陽性率の有意な低下が見られた(図 5)

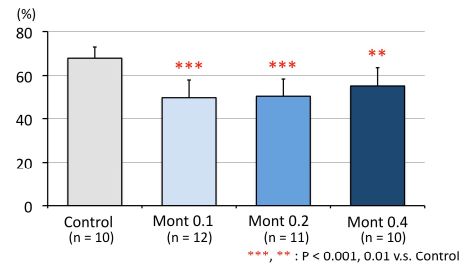


図5 ハムスターPanIN2病変内の*Smad3*核陽性率の変化

(5) In vitro における抗アレルギー薬の膵癌細胞への影響

ヒト膵癌細胞株である MIAPaCa, PANC1 いずれにおいても、Bamb, Levo は 100uM 以上、Mont は 50 μ M 以上の高用量でしか有意な膵癌細胞の抑制効果を示さなかった(図 6 は MIAPaCa 細胞における結果を示す)。

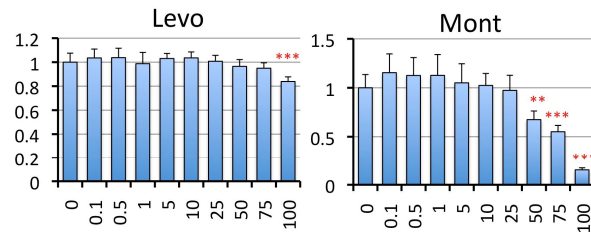


図6 ヒト膵癌細胞に対する増殖抑制効果

(6) In vitro における Mont の Pancreatic Stellate Cell (PSC) に対する影響と PSC 分泌物の膵癌細胞に対する影響

(2)の実験から Mont の膵癌における細胞増殖作用が考えられたが、(5)の実験結果から、Mont 直接的な細胞増殖作用は弱いと考えられた。そのため、微小環境を含めた間接的な要因を見るため PSC との関係を見た。

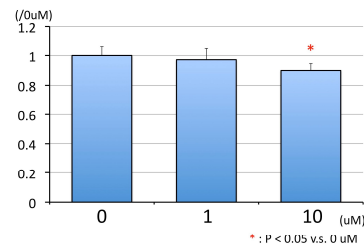


図7 PSCに対するMont処理Condition Mediumを用いたPANC1細胞への増殖抑制作用効果

HPaSteC 細胞に対し、0-10uM の範囲で Mont を 48 時間、96 時間処理を行ったが、細胞増殖に対する有意な増殖抑制変化は見られなかった。

HPaSteC 細胞に対し、0,1,10uM で 48 時間処置を行った後、FPS(-)の培地を添加し 24 時間後の上清から condition medium を作成し、PANC1 細胞に 48 時間処置を行った結果、1uM でも増殖抑制傾向を示し、10uM では有意な増殖抑制効果を示した (P<0.05) (図 7)

以上の結果から、抗ロイコトリエン受容体拮抗薬であるモンテルカストが膵癌予防効果を示し、ドラッグリポジショニング薬として用いることができる可能性が示唆され、その機序として PSC や *Smad3* 経路が関与している可能性がある。現在、本結果を元に論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Mapoung Sariya, Suzuki Shugo, Fuji Satoshi, Naiki Ito Aya, Kato Hiroyuki, Yodkeeree Supachai, Ovatlarnporn Chitchamai, Takahashi Satoru, Limtrakul (Dejkriengkraikul) Pornngarm	4. 巻 110
2. 論文標題 Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration resistant prostate cancer in?vitro and in?vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 596 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Etani Toshiki, Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Suzuki Takayoshi, Iida Keitaro, Nozaki Satoshi, Kato Hiroyuki, Nagayasu Yuko, Suzuki Shugo, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 8
2. 論文標題 NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 442 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8040442	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Shugo, Toyoda Takeshi, Kato Hiroyuki, Naiki-Ito Aya, Yamashita Yoriko, Akagi Jun-ichi, Cho Young-Man, Ogawa Kumiko, Takahashi Satoru	4. 巻 32
2. 論文標題 Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 73 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2018-0050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okabe Asako, Kiriyama Yuka, Suzuki Shugo, Sakurai Kouhei, Teramoto Atsushi, Kato Hiroyuki, Naiki-Ito Aya, Tahara Sayumi, Takahashi Satoru, Kuroda Makoto, Sugioka Atsushi, Tsukamoto Tetsuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Short-term detection of gastric genotoxicity using the DNA double-strand break marker -H2AX	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Toxicologic Pathology	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1293/tox.2019-0007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ito Yusuke, Naiki-Ito Aya, Kato Hiroyuki, Suzuki Shugo, Kuno Toshiya, Ishiguro Yukari, Takahashi Satoru, Uemura Hiroji	4. 巻 9
2. 論文標題 Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13859 ~ 13869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuno Toshiya, Kato Hiroyuki, Naiki-Ito Aya, Suzuki Shugo, Tanaka Takuji, Takahashi Satoru, Mori Hideki	4. 巻 19
2. 論文標題 Preventive Effects of Fermented Brown Rice and Rice Bran on Spontaneous Lymphomagenesis in AKR/NS1c Female Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian Pacific Journal of Cancer Prevention	6. 最初と最後の頁 3217 ~ 3223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31557/APJCP.2018.19.11.3217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Iida Keitaro, Etani Toshiki, Kato Hiroyuki, Suzuki Shugo, Yamashita Yoriko, Kawai Noriyasu, Yasui Takahiro, Takahashi Satoru	4. 巻 9
2. 論文標題 GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 15847 ~ 15859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shugo, Kato Hiroyuki, Fuji Satoshi, Naiki Taku, Naiki-Ito Aya, Yamashita Yoriko, Takahashi Satoru	4. 巻 43
2. 論文標題 Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 359 ~ 367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shugo, Cohen Samuel M., Arnold Lora L., Kato Hiroyuki, Fuji Satoshi, Pennington Karen L., Nagayasu Yuko, Naiki-Ito Aya, Yamashita Yoriko, Takahashi Satoru	4. 巻 398-399
2. 論文標題 Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2018.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fuji Satoshi, Suzuki Shugo, Naiki-Ito Aya, Kato Hiroyuki, Hayakawa Masashi, Yamashita Yoriko, Kuno Toshiya, Takahashi Satoru	4. 巻 45
2. 論文標題 The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Suppresses Preneoplastic Liver Foci of Rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Toxicologic pathology	6. 最初と最後の頁 544 ~ 550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0192623317710013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 山下 依子, 高橋 智
2. 発表標題 Chemopreventive effects of anti-allergic drugs on hamster pancreatic carcinogenesis
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Kato, Aya Naiki-Ito, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi
2. 発表標題 Luteolin suppresses pancreatic carcinogenesis by inhibition of pSTAT3 pathway and DPYD expression
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 高橋 智
2. 発表標題 Luteolinは相互依存関係にあるpSTAT3とDPDの発現抑制を介して膵発癌を抑制する
3. 学会等名 第36回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 高橋 智
2. 発表標題 抗アレルギー薬の膵癌化学予防効果の検討
3. 学会等名 第35回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 山下 依子, 高橋 智
2. 発表標題 Chemopreventive effects of luteolin and hesperetin on pancreatic carcinogenesis
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kato, Aya Naiki-Ito, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi
2. 発表標題 Chemopreventive effects of flavonoids on pancreatic carcinogenesis
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kato, Yoriko Yamashita, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Satoru Takahashi
2. 発表標題 CD44 as an invasion marker for encapsulated papillary carcinoma of the breast
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 高橋 智
2. 発表標題 Luteolinの膵癌化学予防効果の検討
3. 学会等名 第34回日本毒性病理学会総会及び学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyuki Kato, Aya Naiki-Ito, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi
2. 発表標題 Chemopreventive effects of flavonoids on pancreatic carcinogenesis
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 寛之, 内木 綾, 鈴木 周五, 久野 壽也, 高橋 智
2. 発表標題 LuteolinおよびHesperetinによる膵癌化学予防効果の検討
3. 学会等名 がん予防学術大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤 寛之、小林 瑞穂、早川 将史 内木 綾、鈴木 周五、久野 壽也、 高橋 智
2. 発表標題 A case of adenocarcinoma arising in ectopic pancreas of the stomach
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----