

令和元年6月27日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16545

研究課題名(和文) 難治性膵癌の根絶を目指した革新的抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Development of innovative anticancer drugs for eradication of intractable pancreatic cancer

研究代表者

松下 克則 (Matsushita, Katsunori)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60768951

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)： 活性酸素の構成要素の一つである過酸化水素は正常細胞より癌細胞で多く発現していることがわかっている。そのため、過酸化水素に反応して活性型となる改良型ゲムシタピンは、より癌細胞に選択的に作用する可能性があると考え、以下の実験を行った。

膵臓の正常細胞株と癌細胞株では、癌細胞株の方が過酸化水素を多く含んでいた。過酸化水素の量を反映して、正常細胞株では改良型ゲムシタピンの細胞増殖抑制効果が、癌細胞株に比べて軽減されていた。マウスの皮下腫瘍モデルを用いた実験では、改良型ゲムシタピンと通常型ゲムシタピンで腫瘍増殖抑制効果に差はなく、骨髄抑制は前者のほうが、軽減されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法は、膵癌の治療において重要な位置を占めている。化学療法を効果的に行う上で、副作用の軽減は非常に重要であり、特に骨髄抑制による化学療法の中断は、患者の予後に影響をあたえる可能性がある。癌細胞に選択的に作用するゲムシタピンは、これまでも報告があるが、今回のような過酸化水素に反応するものは、報告がされていない。

過酸化水素の高い癌細胞により選択的に作用する改良型ゲムシタピンは、抗腫瘍効果では通常型ゲムシタピンと差はなく、骨髄抑制は軽減されており、より効果的な化学療法を行う上で、今後の臨床応用が期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)： Hydrogen peroxide, which is one of the components of reactive oxygen, is known to be expressed more in cancer cells than in normal cells. Therefore, we considered that the activated gemcitabine, which becomes active in response to hydrogen peroxide, may act more selectively on cancer cells, and the following experiment was performed.

In normal and cancer cell lines of the pancreas, cancer cell lines contained more hydrogen peroxide. Reflecting the amount of hydrogen peroxide, the cell growth inhibitory effect of activated gemcitabine was reduced in normal cell lines compared to cancer cells. In experiments using a mouse subcutaneous tumor model, there was no difference in tumor growth inhibitory effect between activated gemcitabine and original gemcitabine, and myelosuppression was reduced in the former.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 ゲムシタピン 過酸化水素 副作用

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

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は自覚症状に乏しく、発見時は既に局所進行あるいは多臓器に転移した状態であるため予後不良とされている。アメリカでは 2030 年には癌における死因の第 2 位になると予想されており、患者数は増加傾向にある。発見時の 8 割以上が切除不能で見つかるという報告もあり、外科的切除の対象となる症例は少ない。結果として、化学療法に放射線を組み合わせた集学的治療が必要となることが多い。

膵癌の化学療法として頻用されているものにゲムシタピンがあげられる。ゲムシタピンは切除不能膵癌において単剤もしくはエルロチニブや Nab-PTX などと組み合わせることで予後の改善が報告されている。一方で骨髄抑制や下痢といった副作用も一定の割合で認めている。今回は従来の通常型ゲムシタピンより副作用の少ないプロドラッグとしての改良型ゲムシタピンの作成を行うに至った。化学療法による副作用の原因の一つとして、化学療法が骨髄や腸管などの正常組織にも作用してしまうことがあげられる。そのため、副作用を軽減させるためには、より癌細胞に特異的に化学療法が作用する必要がある。

癌細胞と正常細胞の違いは様々あるが、我々は活性酸素(reactive oxygen species 以下 ROS)に着目した。ROS は正常細胞より癌細胞でより多く発現しているとされている。ROS は  $H_2O_2$ 、 $O_2$ 、 $HO\cdot$ 、 $^1O_2$  といった物質で構成され、炎症や低酸素といった誘引で刺激されると DNA の損傷や遺伝子の変異を引き起こし、癌細胞の進展に関与するとされている。

今回我々は ROS の中でも生体内で一定の安定性を保ちながら、化学的反応性に富む  $H_2O_2$  に注目した。 $H_2O_2$  は様々な癌細胞において細胞内濃度の上昇が報告されている。今回生成した改良型ゲムシタピンは  $H_2O_2$  応答性であり、 $H_2O_2$  存在下で、通常のゲムシタピンに変化するというものである。つまり  $H_2O_2$  の細胞内濃度がより低いと考えられている通常細胞ではゲムシタピンへの変化率が癌細胞より低く、結果として副作用の軽減に繋がることを期待している。これまでゲムシタピンのプロドラッグは報告があるが、大部分は抗腫瘍効果の報告であり、副作用についての報告は非常に稀である。

### 2. 研究の目的

膵癌の化学療法において、ゲムシタピンはしばしば使用される薬剤である。ゲムシタピンによる副作用の軽減は、化学療法を安定して継続させるために重要であると考えられる。そこで今回は、副作用の軽減を目的とした改良型ゲムシタピンを開発した。改良型ゲムシタピンは、過酸化水素に反応してゲムシタピンに変化するという特徴を持っている。過酸化水素は、癌細胞でより多く発現しているとされているため、改良型ゲムシタピンはより癌細胞特異的に作用すると考えられる。そのため、改良型ゲムシタピンは、従来のゲムシタピンと同等の抗腫瘍効果を持ちつつ、体重減少や骨髄抑制といった副作用の軽減を達成することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1. 膵管上皮正常細胞と膵癌細胞株において、過酸化水素アッセイを用いて、正常細胞と癌細胞の過酸化水素の量を比較検討した。
2. MTT アッセイを用いて膵管上皮正常細胞と膵癌細胞株において、通常型ゲムシタピンと改良型ゲムシタピンのそれぞれの細胞増殖抑制効果を比較検討した。
3. 改良型ゲムシタピンが癌細胞においてアポトーシスを誘導していることを確認した。
4. 細胞内の過酸化水素の量を 2-DG を用いて上昇させ、過酸化水素が上昇した状態で、改良型ゲムシタピンや通常型ゲムシタピンの腫瘍増殖抑制効果やアポトーシスがどのように変化するかを比較検討した。
5. ノードマウスを用いて膵癌細胞株の皮下腫瘍モデルを作成し、改良型ゲムシタピンと通常型ゲムシタピンそれぞれ腹腔内に投与し、腫瘍増殖抑制効果および体重減少および骨髄抑制を比較検討した。

### 4. 研究成果

まず、試験管レベルの実験で、改良型ゲムシタピンに、直接的に、過酸化水素を投与したところ改良型ゲムシタピンはほぼ全てが、通常型ゲムシタピンに変化していることを確認した。また、膵癌細胞株において、改良型ゲムシタピンに直接的に過酸化水素を投与したとき、通常型ゲムシタピンの細胞増殖抑制効果と同等の抑制効果を認め、細胞実験レベルでも、改良型ゲムシタピンが過酸化水素に反応して、通常型ゲムシタピンに変化していることを確認した。

次に、膵管上皮正常細胞株と膵癌細胞株で細胞内に含まれる過酸化水素の量を比較したところ、膵癌細胞株のほうが過酸化水素を多く含んでいた。MTT アッセイを用いて、通常型ゲムシタピンと改良型ゲムシタピンの細胞増殖抑制効果を比較検討したところ、正常細胞株では改良型ゲムシタピンの細胞増殖抑制効果が、癌細胞に比べて軽減されていた。

また、膵癌細胞株で、改良型ゲムシタピンが細胞増殖抑制効果を示し、やアポトーシスを誘導することを確認した。また、細胞内過酸化水素量を上昇させる目的でグルコース拮抗阻害剤 2-デオキシグルコース(以下 2-DG)を用いた。2-DG 単独で膵癌細胞株に暴露し、過酸化水素濃度を上昇させつつ、細胞増殖抑制効果を認めない最大濃度を決定した。決定した 2-DG の濃度において改良型ゲムシタピンに対する 2-DG の相乗効果を証明するために、改良型ゲムシタピン単独と 2-DG を加えた改良ゲムシタピンとを比較したところ 2-DG を加えたもののほうが、

細胞増殖抑制効果およびアポトーシスが增強することを確認した。

ヌードマウスの実験では膵癌細胞株 PSN1 を用いて皮下腫瘍モデルを作成し、通常型および改良型ゲムシタピンをそれぞれマウスに投与して抗腫瘍効果や副作用について評価した。腫瘍体積や体重減少は通常型と改良型で差はなかった。一方で、骨髄抑制については改良型で骨髄抑制が軽減されていた。マウスの腫瘍、骨髄を採取し、質量分析を用いてゲムシタピンの蓄積を評価したところ、腫瘍では両群間に差はなかったが、骨髄では改良型ゲムシタピンのほうが、検出されたゲムシタピンは少なかった。また、マウスの腫瘍組織を TUNEL 染色にてアポトーシスの比較を行い、通常型ゲムシタピンと改良型ゲムシタピンで差がないことを確認した。

以上のことから改良型ゲムシタピンは通常型ゲムシタピンと比較して、同等の抗腫瘍効果を持ちつつ、骨髄抑制は軽減される可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

### 1. 第 77 回癌学会学術総会

発表者：松下克則

演題名：Development of new chemotherapy for pancreatic cancer with gemcitabine targeting hydrogen peroxide

共同演者：今野雅允、江口英利、岩上佳史、秋田裕史、浅岡忠文、野田剛広、後藤邦仁、小林省吾、小比賀聡、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始

場所：大阪国際会議場

日時：2018 年 9 月 29 日

### 2. 第 30 回肝胆膵外科学会学術総会

発表者：松下克則

演題名：Development of a new gemcitabine-derived reagent targeting hydrogen peroxide for pancreatic cancers

共同演者：今野雅允、江口英利、岩上佳史、秋田裕史、浅岡忠文、野田剛広、後藤邦仁、小林省吾、小比賀聡、石井秀始、森正樹、土岐祐一郎

場所：パシフィコ横浜

日時：2018 年 6 月 9 日

### 3. 第 26 回日本がん転移学会学術集会

発表者：松下克則

演題名：膵癌に対する過酸化水素応答性改良型ゲムシタピンを用いた新規治療法の開発

共同演者：今野雅允、川本弘一、江口英利、土岐祐一郎、森正樹、小比賀聡、石井秀始

場所：大阪国際会議場

日時：2017 年 7 月 28 日

### 4. 第 72 回日本消化器外科学会総会

発表者：松下克則

演題名：膵癌に対する過酸化水素応答性改良型ゲムシタピンを用いた新規治療法の開発

共同演者：今野雅允、川本弘一、江口英利、小比賀聡、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始

場所：ANA クラウンプラザホテル金沢

日時：2017 年 7 月 20 日

〔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：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (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。