

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591555

研究課題名（和文） アクチン重合阻害剤ラトルンキュリンの抗腫瘍効果と臨床応用

研究課題名（英文） Experimental analysis of anti-cancer effect of latrunculinA in human gastric cancer.

研究代表者

落合 登志哉 (Ochiai Toshiya)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：30311913

研究成果の概要：

近年、早期診断と手術・化学療法の進歩によりわが国の胃癌治療成績は世界最高水準にある。しかし、胃癌腹膜播種は治療方法の確立していない難治性の病態である。本研究の目的は胃癌腹膜播種に対して、新しい治療方法を確立することにあった。結果としてはアクチン阻害剤であるラトルンキュリンが、ヒト胃癌細胞株に対して強い抗腫瘍効果を持ち、マウスにおける腹膜播種モデルでは生存期間の大幅な延長が見られることを確認できた。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃十二指腸外科学、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

胃癌・卵巣癌・腎癌等の切除不能もしくは非治癒症例において化学療法に反応しない症例の代表的組織型としては、印環細胞癌・粘液癌・低分化腺癌・clear cell carcinoma などがある。TS-1・タキサン系薬剤や FOLFOX などの多剤併用療法

によりこれらの癌に対する治療成績は若干改善傾向にあるものの、腹膜播種症例に対しては十分な効果が得られていないのが現状である。特に胃癌において壁浸潤性の強い癌には印環細胞癌・低分化腺癌が多い。これらは 10 代の若年女性にもスキルス胃癌として発症するものがあり、

非常に予後は悪い。現在わが国の胃癌治療成績は世界に冠たるものであるが、胃壁浸潤と腹膜播種は他臓器転移とともに未解決の問題であり、一層の治療成績向上を目指すうえで避けては通れない問題である。

我々は、日々の消化器癌症例の治療を通じて新しい腹膜播種の治療法の必要性と現行の化学療法および手術の限界を痛感する状況にある。また、これまでERM(Ezrin-Radixin-Moesin)とアクチン系細胞骨格、CD44などの接着因子などの研究を通じてアクチン系細胞骨格阻害による新たな抗癌剤の開発を模索してきた。

細胞においては微小管が物質輸送・細胞分裂などにおいて重要であることは良く知られており、タキソールは他の化学療法剤に耐性を示す癌に対してすでに臨床で使用され効果を上げている。タキソールは分裂中の細胞を選択的に障害するが、強制的に微小管重合を起こすことで、細胞死を起こさせる。これは有糸分裂紡錘体の機能には微小管の構築や解離が不可欠であることに起因する。その他にも微小管重合阻害剤としてのコルヒチン・ビンブラスチン・ビンクリスチンなども痛風発作治療薬や抗癌剤として使用されている。

一方、アクチン系細胞骨格に選択的に作用する薬剤としてはファロイジン・サイトカラシン・スフィンホリド・ラトルンキュリンなどが知られている。しかし、これらの薬剤は細胞生物学の研究には使われているものの、抗腫瘍剤としては使用されてはいない。過去2年間に我々は入手可能なアクチン系細胞骨格に作用する複数の薬剤にかんして抗腫瘍効果を検

討してきた。その中で有望視しているのがラトルンキュリンである。これは地中海産海綿の一種から抽出された自然毒であり、アクチンの重合を阻害する。ヒト胃癌細胞株(低分化腺癌)に対して使用してみたところ、細胞は接着能を消失して浮遊して膨化した後に破裂して細胞死することが明らかになった。またヌードマウス腹膜播種モデルを作製してラトルンキュリンの投与を週1回×3回行った所、強い抗腫瘍効果を得た。一方で副作用に関しても死に至るようなものはなく、良好な結果を得ている。

2. 研究の目的

本研究の特色としては、癌細胞のアクチン系細胞骨格を標的とする点で、CD44/ICAMなどの細胞接着因子の機能弱めること・浸潤(運動)能を阻害すること・細胞内の輸送を障害することが考えられる。腹膜播種治療において標的とすべき癌細胞の多くは細胞質内にムチンなどの物質を多量に蓄積しており、細胞内輸送の障害は細胞死を起こしやすいことが予想される点である。微小管を標的にする場合やDNAを標的にする場合に比較して全く新しい作用機序が期待できる。ラトルンキュリンは新規抗腫瘍剤となる可能性が高くこれまでの薬剤にはない利点があり、実用化されればこれまでに治療方法の乏しかった癌性腹膜炎に対しての初めての有効な治療薬になりうる。特に胃癌はわが国で非常に多い癌であり、治療法に関しても他の国と比べて格段に進歩しているが、腹膜播種に対する有効な治療法の開発は更なる治療成績の向上を可能にすると思われる。

3. 研究の方法

(1)分化度の異なる3種のヒト癌細胞株を使

いラトルンキュリンの抗腫瘍効果を *in vitro* で解析した。

(2)5-FUやCDDPなどの代表的な化学療法剤との併用で *in vitro* における抗腫瘍効果を検討した。

<平成19年度>

・ヒト癌細胞株にたいするラトルンキュリンの抗腫瘍効果の検討

96well plateにそれぞれの細胞を 1×10^4 づつ播いて24時間後に濃度の異なるラトルンキュリンを加える。3日間培養した後にSF試薬によるviability assayを行った。

ヒト癌細胞株としては印環細胞癌 (NUGO-4, RCB1939)、胃癌 (MKN-45, MKN-74)、大腸癌 (DDL-1, HCT116, Colo320)、clear cell carcinoma (腎癌---Caki-1, RCB1985、卵巣癌---HLA A9, B12, W35) などを使用した。

<平成20年度>

・培養状態でのヒト癌細胞株へのラトルンキュリンの作用機序と効果の判定

培養細胞にラトルンキュリンを加えて5分・10分・30分・1時間・2時間での細胞内アクチンの変化を蛍光抗体染色で解析した。

・生細胞の培養状態での連続撮影を行い、細胞の形態変化と浮遊・膨化・細胞死を撮影した。

・平成19年度に引き続きマウス腹膜播種モデルにおけるラトルンキュリンの有効性を検討して薬剤の至適濃度を検討する。複数のヒト胃癌細胞株を用いて*in vitro*と*in vivo*でのアクチン阻害剤の作用を、電子顕微鏡などを用いた形態学的解析・caspase assayによるapoptosis assay・nude mouseへの移植実験での生存期間の解析・血液検査などから抗腫瘍効果や副作用の検討などを行った。

4. 研究成果

ヒト印環細胞癌 (NUGC-4) と低分化腺癌 (MKN-45) 株を使いマウス腹膜播種モデルを作製して、腹腔内にLatrunculinAを投与した。その結果、平均生存期間の有意な延長を認めた。電子顕微鏡を行ったところ、MKN-45では短時間のうちに細胞膜に無数の小孔を生じて細胞内の小器官が細胞外に放出され、NUGC-4ではアポトーシスを誘導することが明らかになった。viability assayの結果からはLatrunculinAの抗腫瘍効果は薬剤濃度に依存していた。アクチン重合阻害剤であるLatrunculinAはヒト印環細胞癌と低分化腺癌細胞に対して特異的に強い抗腫瘍効果を認め、腹膜播種に対する腹腔内投与型の新規抗癌剤として使用できる可能性が考えられた。癌細胞のアクチン系細胞骨格を標的とする新しい抗がん剤の候補としてラトルンキュリンが有望であり、マウスにおいては(少なくとも腹腔内では投与)明らかな副作用は認めなかった。狙い通りの結果が得られたと考えている。今後の課題は、ヒトに対する投与方法の実用化研究と安全性の確認である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

(査読あり)

Latrunculin A has a Strong Anti-cancer Effect in a Peritoneal Dissemination Model of Human Gastric Cancer in Mice.

Hiroo Konishi, Shojiro Kikuchi, Toshiya Ochiai, Hisashi Ikoma, Takeshi Kubota, Daisuke Ichikawa, Hitoshi Fujiwara, Kazuma Okamoto, Chouhei Sakakura, Teruhisa Sonoyama, Yukihiro Kokuba, Hiroyuki Sasaki, Takeshi Matsui, Eigo Otsuji
Anticancer Research Vol. 29, No. 6, 2009 in press

〔学会発表〕（計 2 件）

①第 80 回 日本胃癌学会総会
「アクチン骨格阻害剤である latrunculin の
ヒト胃癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討」
熊野達也 菊池正二郎 市川大輔 藤原
斉 岡本和真 落合登志哉 國場幸均 阪
倉長平 園山輝久 萩原明於 大辻英吾
2008 年 2 月 28 日 パシフィコ横浜第 6 会場
P05-4

②第 108 回 日本外科学会定期学術集会
「ヒト胃癌細胞に対するアクチン骨格阻害
剤の抗腫瘍効果の検討」
小西啓夫、菊池正二郎、落合登志哉、生駒久
視、木村彰夫、市川大輔、藤原斉、國場幸均、
阪倉長平、園山輝久、萩原明於、大辻英吾
2008 年 5 月 15 日 ウェルシティ長崎
第 11 会場 SF-026-2

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 登志哉 (Ochiai Toshiya)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：30311913

(2) 研究分担者

菊池 正二郎 (Kikuchi Shojiro)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：70381960