

機関番号：15101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20580352

研究課題名 (和文) 悪性黒色腫に対する分化誘導剤の開発

研究課題名 (英文) Development of cell differentiation against malignant melanoma.

研究代表者 岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50194410

研究成果の概要 (和文)：

今回の研究により、細胞レベルでのルパン型トリテルペン (ルペオール) のメラノーマ分化誘導の機序を解明することができた。また遺伝子解析により、細胞周期に影響を及ぼすことも判明した。マウスを用いた *in vivo* 実験より、ルペオールを腫瘍局所あるいは全身に投与することにより、メラノーマの増殖を抑制することが明らかとなった。さらに犬の自然発症例メラノーマに対しても十分有効なことが示された。

研究成果の概要 (英文)：

In the present study, we could elucidate the mechanism that lupeol induces differentiation of melanoma cell *in vitro*. In the gene analysis, lupeol affects cell cycle. *In vivo* study using mice, it was found that lupeol inhibits growth of melanoma by local and systemic administrations. Furthermore, it was found that lupeol is effective for naturally occurring melanomas in dogs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：メラノーマ、分化誘導、イヌ、遊走能、B16 2F2、チロシナーゼ、MITF、Rab27a

1. 研究開始当初の背景

メラノーマ (悪性黒色腫) は転移率が高く、進行が速い。そのため早期発見を除き、完全治癒が困難な腫瘍である。これまで、メラノーマ治療に用いられている薬剤としては、タキソールなどがあげられるが、

毒性が強く、副作用も多い。メラノーマ細胞は α -メラノサイト刺激ホルモン等により、メラニン産生の亢進、細胞分裂速度の低下、運動性の低下がおこる。これらの変化は未分化なメラノーマ細胞が正常なメラノーマ細胞へと分化したことを意味

する。これまで、秋田県農林水産技術センター 総合食品研究所(以下秋田県総食研)では、メラノーマ細胞分化誘導物質として、キク科植物よりルペオールを単離し、メラニン産生亢進メカニズムなどを解明してきた。また、ルペオールはメラニン産生促進能以外にも、*in vitro* でメラノーマ細胞の運動性を選択的に抑制することを明らかにした。さらに、マイクロアレイを用いた遺伝子解析の結果、ルペオール処理により、癌細胞において過剰発現している *aurora kinase* などの発現抑制が確認された。その後の研究より、ルペオールの化学構造と分化誘導活性との相関、メラニン産生促進作用機構の解明を行ってきた。これらの研究結果より、ルペオールを基にしたメラノーマ細胞に選択的な分子標的薬剤開発の可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究においては、下記の点について検討を行った。

(1) *in vitro*において、ルペオールのメラノーマに選択的な分子標的薬剤としての機能を明らかにする(秋田県総食研、麻布大)。

(2) メラノーマ担癌マウスを用いた *in vivo*でのルペオール投与量、投与間隔等と腫瘍治療効果の関係を明らかにする(鳥取大)。

(3) 自然発生メラノーマ(主にイヌ)に対して、実験動物で得られたデータを基にルペオールによる治療を行い、分化誘導治療法を確立する(鳥取大)。

3. 研究の方法

(1) ルペオールによるメラノーマ分化誘導機構の解明(秋田県総食研)

ルペオール処理したマウスメラノーマ細胞における、癌特有分子ならびに転移等に関する分子の消長を Western blotting やリアルタイム PCR により確認した。さらに、変化が著しい分子に関して、メラノーマ細胞に対して遺伝子導入を行い、細胞分化との関連を検討した。

(2) 動物由来メラノーマ細胞に対するルペオールのメラニン産生促進活性評価ならびに超微形態学的解析(麻布大学)

これまでの実験はヒト、マウス由来メラノーマ細胞を用いた実験であり、動物由来メラノーマ細胞に対するルペオール産生促進活性を評価する必要がある。またこれまで超微形態学的な観察は行われていなく、構造と活性の相関を検証した。

(3) メラノーマ担癌マウスを用いた *in vivo*における基礎的検討(鳥取大学)

メラノーマ担癌マウス(マウス由来メラノーマ)を用いて、投与量、投与回数と治療効果の関係を検討した。

(4) 自然発生メラノーマに対する治療効果の検証(鳥取大学)

担癌マウスを用いた動物実験データを基に、メラノーマ自然発生症例に対して、ルペオールを投与し治療効果を検証した。また、鳥取大学と連携している県内外動物病院にもルペオールを配布し、可能な限り多くの治療例を集めた。

4. 研究成果

(1) ルペオールによるメラノーマ分化誘導機構の解明および超微形態学的解析

今回下記の点を明らかにした。

1. マウスメラノーマ細胞(B16 2F2)はルペオール10 μ M濃度で48時間処理すること

により、形態的には十分に成熟したメラノーマ細胞となった。

- マウスメラノーマ細胞 (B16 2F2) をルペオール10 μ M濃度で48時間処理することにより、メラノーマ細胞のバイオマーカーであるチロシナーゼ、MITF、Rab27a、myosin-Vaの活性は上昇した。一方、Slac2-aは変化しなかった。
- ルペオール10 μ M濃度で4時間処理では、マウスメラノーマ細胞 (B16 2F2) は細胞表面より樹状突起を発現しなかったが、8時間処理することにより樹状突起発現が観察された。
- ルペオール10 μ M濃度でメラノーマ細胞 (G361) および神経芽細胞 (NB-1) はその遊走能が顕著に抑制された。同濃度のルペオールは他のヒト由来腫瘍細胞に対してはその遊走を抑制しなかった (表1)。
- マウス由来黒色腫細胞B16を用いて、細胞周期関連遺伝子PCNA、Ki-67およびアポトーシス関連遺伝子 Rab27a、Bcl-2の発現に及ぼす影響をリアルタイムPCRで調べた結果、PCNA、Ki-67の遺伝子発現は約40%まで減少した。Rab27a、Bcl-2については、変化はみられなかった。このことにより、ルペオールは細胞周期に影響を及ぼすことが判明した (表2)。

Cell line (origin)	Cell growth (%)	Migration index (%)
G361 (melanoma)	97.5 \pm 3.8	40.5 \pm 3.1
NB-1 (neuroblastoma)	96.0 \pm 2.5	39.7 \pm 6.1
A549 (lung adenocarcinoma)	100.1 \pm 7.4	87.3 \pm 5.0
ACHN (renal adenocarcinoma)	106.3 \pm 6.9	103.4 \pm 4.8
HeLa (cervical carcinoma)	72.4 \pm 2.3	101.4 \pm 4.1
HT1080 (fibrosarcoma)	91.6 \pm 6.5	100.6 \pm 10.8
MIA PaCa2 (pancreatic cancer)	99.1 \pm 4.9	93.1 \pm 4.7
Saos2 (osteogenic sarcoma)	100.0 \pm 9.8	101.3 \pm 5.0
SH-10-TC (stomach cancer)	99.6 \pm 5.2	94.6 \pm 4.1
T24 (urinary bladder carcinoma)	90.7 \pm 5.5	101.5 \pm 2.3

The effects of 10 μ M lupeol on cell growth for 72 h and migration for 6 h were examined. The values represent percentages, relative to the control (n = 4).

表1 各種細胞に対する遊細胞増殖能および遊走能

遺伝子	Non-treated	Lupeol-treated
Tyrosinase	1.0 \pm 0.07	2.84 \pm 0.08
PCNA	1.0 \pm 0.05	0.36 \pm 0.03
Ki-67	1.0 \pm 0.04	0.40 \pm 0.02
Rab27a	1.0 \pm 0.02	1.0 \pm 0.03
Bcl-2	1.0 \pm 0.03	1.1 \pm 0.03

Relative intensity/GAPDH

表2 遺伝子検査

(2) 担がんマウスへのルペオール投与による抗腫瘍効果

エタノール溶媒を用いた群では、ルペオール投与により腫瘍生長率の減少傾向がみられたが、有意な差は認められなかった。オリーブ油溶媒を用いた群では、ルペオール投与により腫瘍生長率の有意な減少を認めた (図1)。増殖性指標マーカーである Ki-67 および PCNA 染色における陽性細胞面積率は、ルペオール皮下投与群で有意な減少がみられた (図2)。TUNEL 染色では、ルペオール非投与群において陽性細胞が観察されなかったのに対し、ルペオール投与群の一部で観察された。

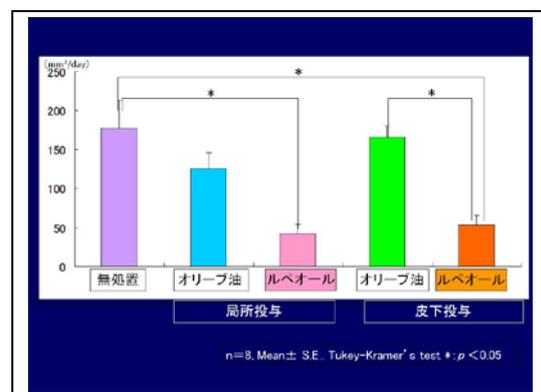


図1 腫瘍成長率

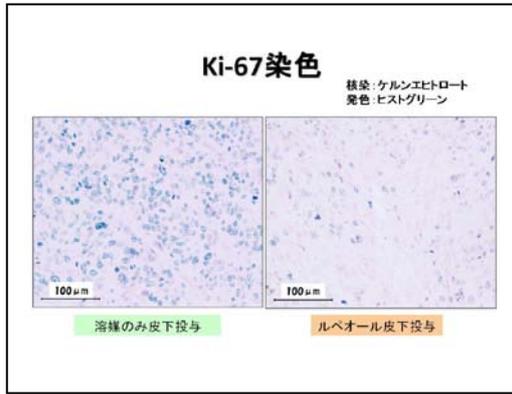


図2 Ki-67染色

(3) 実験犬を用いたルペオール投与による生体への影響

溶媒コントロール投与犬、ルペオール投与犬のどちらも、投与による一般状態、血液性状の変化は認められなかった。

(4) 自然発症悪性黒色腫に対するルペオールの抗腫瘍効果

自然発症例の悪性黒色腫 13 例にルペオールを適用した。腫瘍発生部位は下顎 7 例、口腔内 3 例、鼻梁 1 例、腹側皮下 1 例、後肢端 1 例であった。投与方法は初期治療として原則皮下に 1~3ml/kg (5mg/ml) のルペオールを週 2 回で計 4 回投与した。その後、2-3 週間に 1 回定期的に投与した。これまで報告されている悪性黒色腫の中央生存期間の 168 日を基準とし、168 日以上再発転移のないものを有効とした。その倍の 336 日以上再発のない症例およびルペオール単独投与により腫瘍消失が認められた症例を著効とした (図 3)。その結果、13 例中 7 例で著効、4 例で有効、2 例で無効だった (図 4)。今回の中央生存値は 233 日であった。下顎吻側の 1 例では、3 回のルペオール投与により腫瘍が消失した。しかし、ルペオールを 3 週間投与しないと再発が見られた。再度 1 週間間隔で 2 回投与し、腫瘍は消失した。全症例においてルペオール

投与による有害事象は認められなかった。このことより、ルペオールは悪性黒色腫に対する治療効果が期待でき、早期治療や手術を希望されない場合の治療の選択肢の 1 つになりえることが示唆された。

判定基準(犬の悪性黒色腫)

口腔内悪性黒色腫(ステージⅡ、Ⅲにおける中央生存値:168日)
(Macewen et al. 1986)

著効:

- ・悪性黒色腫の中央生存値の168日の2倍の336日以上生存している症例
- ・168日以上再発転移が見られない症例
- ・単独投与により腫瘍が消失した症例

有効:

168日以上生存している症例(再発の有無は関係なし)

無効:

167日以内に死亡した症例、腫瘍増大が見られた症例

図3 判定基準

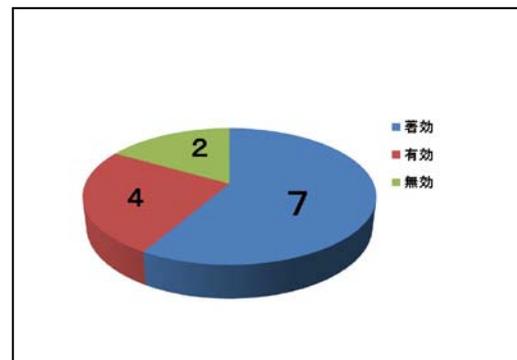


図4 治療成績

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Keishi Hata, Kikumi Ogiwara, Saori Takahashi, Takeshi Tsuka, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto. Effects of Lupeol on Melanoma In Vitro and In Vivo: Fundamental and Clinical Trials. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 査読有, 16, 339 - 344 (2010).

② Kikumi Ogiwara, Keishi Hata. Melanoma cell

differentiation induced by lupeol separates into two stages: morphological and functional changes. J. Nat. Med. 査読有, 63, 323-326 (2009).

③Keishi Hata, Toshiyuki Mukaiyama, Noriyuki Tsujimura, Yusuke Sato, Yasuyuki Kosaka, Kenji Sakamoto, Kazuyuki Hori. Differentiation-inducing activities by lupane triterpenes from *Lactuca indica* on a mouse melanoma cell line. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 査読有, 15, 279 - 285 (2009).

[学会発表] (計 4 件)

①岡本芳晴、松島伸昭、柄 武志、新田牧子、今川智敬、大崎智弘、南 三郎. 悪性黒色腫に対するルペオールの基礎的検討と臨床応用 平成22年度日本獣医師会学会年次大会, 2011/2/11, 岐阜市

②新田牧子、柄 武志、今川智敬、南 三郎、畠 恵司、荻原喜久美、岡本芳晴. 悪性黒色腫に対する lupeol の効果 第 148 回日本獣医学会, 2009/9/26, 鳥取市

③畠 恵司、高橋沙織、荻原喜久美、柄 武志、南三郎、岡本芳晴. キク科植物由来ルペオールのメラノーマ細胞分化誘導活性. 第 148 回日本獣医学会, 2009/9/26, 鳥取市

④ Keishi Hata, Kikumi Ogihara, Saori Takahashi, Takeshi Tsuka, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto. Effects of lupeol on melanoma in vitro and in vivo-Fundamental and clinical trials-. The 21st Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAAC 2008), 2008/11/26, 福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 芳晴 (OKAMOTO YOSHIHARU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号 : 50194410

(2) 研究分担者

畠 恵司 (HATA KEISHI)

秋田県農林水産技術センター総合食品研究所・食品機能グループ・主任研究員

研究者番号 : 80360353

荻原喜久美 (OGIHARA KIKUMI)

麻布大学・環境保健学部・講師

研究者番号 : 50154381

(3) 連携研究者

南 三郎 (MINAMI SABUROU)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号 : 70032307

柄 武志 (TSUKA TAKESHI)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号 : 30432610