

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22791273

研究課題名（和文）

胆管癌に対するビスボロールおよびその誘導体による新規抗癌治療法の開発

研究課題名（英文） Novel cancer therapy using Bisabolol and modified Bisabolol

研究代表者

板津 慶太 (ITATSU KEITA)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：90534842

研究成果の概要（和文）：

ビスボロールは胆管癌、膵癌細胞株において増殖抑制能、アポトーシス誘導能を有していた。この作用は癌特異的であり正常膵上皮由来細胞株では認めなかった。網羅的遺伝子解析よりビスボロールの作用機序にはPI3K-AKTシグナルが関与しており、これらのシグナルの減弱およびこのシグナルの下流に存在するEGR1の亢進を明らかにした。またヒト膵癌皮下発癌マウスモデルへのビスボロールの週1回3週連続経口投与により、ビスボロール投与群において有意な増殖抑制効果を認め、腹膜播種モデルにおいてもビスボロール投与群において、腹膜播種の減少を認めた。ビスボロールは胆管癌、膵癌において抗腫瘍効果を有しており、新規抗癌治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether Bisabolol has antitumor effects against these cancers. Bisabolol induced a decrease in cell proliferation and viability in cholangiocarcinoma and pancreatic cancer cell lines, but not in pancreatic epithelial cells. Profiling revealed that treatment induced apoptosis and suppressed Akt activation in cholangiocarcinoma. Bisabolol treatment induced the overexpression of early growth response-1 (EGR1). Furthermore, Tumor growth in both subcutaneous and peritoneal xenograft nude mouse models was significantly inhibited by intragastric administration of 1000 mg/kg of Bisabolol, once a week for three weeks. The results indicate that Bisabolol could be a novel therapeutic option for the treatment of cholangiocarcinoma and pancreatic cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：ビスボロール、胆管癌、PI3K-AKT シグナル

1. 研究開始当初の背景

近年、診断法・手術手技の発達、癌に対する新たな治療法としての分子標的治療薬などが開発され消化器癌の多くは治療成績が飛

躍的に向上しつつある。胆管癌は化学療法や放射線療法には治療効果が認められず、手術で切除する以外には有効な治療法はない。しかも極めて難治性であり、たとえ切除できて

も根治切除例の5年生存率は20-30%と未だ満足すべきものではない。かかる現状から手術療法だけによる胆管癌の治療には限界があり、新たな治療法の開発が必要である。このような現状のなかで、われわれは生理的活性を持つ小分子化合物であるビスボロール(図1)に注目した。ビスボロールは天然に存在する単環式セスキテルペノイドの一種である。IUPAC名はビスボラ-3,7(11)-ジエン-10-オール bisabola-3,7(11)-dien-10-olでカモミール (*Matricaria recutita*) や *Myoporum grassifolium* の精油の成分である。抗刺激性、抗炎症性、抗菌性を持つことが知られており、癌に対してはアポトーシスを誘導 (Darra E, Suzuki H. Ital J Biochem. 2007) し、ミトコンドリアの浸透性への関連も報告されている (Darra E, Suzuki H. Arch Biochem Biophys. 2008)。われわれはこのビスボロール研究の第一人者である鈴木尚憲教授 (ヴェローナ大学, イタリア) (Cavaliere E, Suzuki H. Biochem Biophys Res Commun. 2004) と共同研究を行っている。これまで先行実験にて胆管癌由来細胞株である HuCCT1 およびヒト膵癌由来細胞株である KLM1、Panc1、KP4 における細胞死の誘導を確認している。

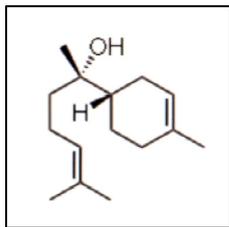


図1. ビサボロール構造

2. 研究の目的

胆管癌は化学療法や放射線療法には治療効果が認められず、手術療法だけによる胆管癌の治療には限界があり、新たな治療法の開発が必要である。生理的活性を持つ小分子化合物であるビスボロールは癌に対するアポトーシスの誘導能を有し、われわれの先行実験においても胆管癌細胞株に対して細胞死を起こすことが可能であった。ビスボロールの作用機序の解明、その有効性の検討を行う。本研究の目的は生理的活性を持つ小分子化合物であるビスボロールによる新規癌治療法を開発し、治療成績を向上させることである。

3. 研究の方法

胆管癌および膵癌細胞株を用いて以下の研究を行った。

(1)胆管癌、膵癌細胞株を用いたビスボロールの機能解析

胆管癌、膵癌細胞株にビスボロールを投与し、MTT アッセイによる増殖能、インベージョンアッセイによる浸潤能、トリパンプルー色素

排出試験による細胞死、TUNEL 法によるアポトーシスの検討を行なった。また導入効率、至適濃度、副作用の有無について検討した。

(2)ビスボロールの基礎的研究

胆管癌細胞株にビスボロールを投与し、投与した細胞株と非投与の細胞株を用いて DNA アレイによる網羅的遺伝子解析によりシグナル伝達系などの作用機序を検討した。

(3)ビスボロールの誘導体の開発

ビスボロールの誘導体を作成し、胆管癌、膵癌細胞株を用いて MTT アッセイによる増殖能、インベージョンアッセイによる浸潤能、トリパンプルー色素排出試験による細胞死の検討を行なった。

(4)担癌動物モデルを用いたビスボロールの有効性の検討

胆管癌および膵癌細胞株を用いた皮下発癌、腹膜播種、肝転移モデルにビスボロールを投与し、その効果を検討した。

5)ビスボロールの副作用の検討

ラットに対してビスボロールの経口投与、腹腔内投与を行い、その副作用を検討した。

4. 研究成果

(1)胆管癌、膵癌細胞株を用いたビスボロールの機能解析

ビスボロールは胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1, KP4, Panc1, MIA Paca2 において細胞の増殖を抑制した。しかし正常膵上皮由来細胞株 ACBRI515 においてはビスボロールの増殖抑制を認めなかった (図2)。ビスボロールは胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1, KP4, Panc1, MIA Paca2 において細胞死を誘導していた (図3)。TUNEL 法 (図4) およびウエスタンブローディング法での胆管癌、膵癌細胞株での Cleaved PARP の発現亢進 (図5) より、この細胞死はアポトーシスによるものと考えられた。一方で膵上皮由来細胞株 ACBRI515 においては明らかなアポトーシスの誘導を認めなかった。またビスボロールは膵癌細胞株 KLM1, KP4, Panc1, MIA Paca2 において癌細胞の浸潤能を抑制させる機能も有していた。

これらの検討よりビスボロールの至適濃度は癌細胞株によって異なっているが、250 から 500 μ M と考えられた。

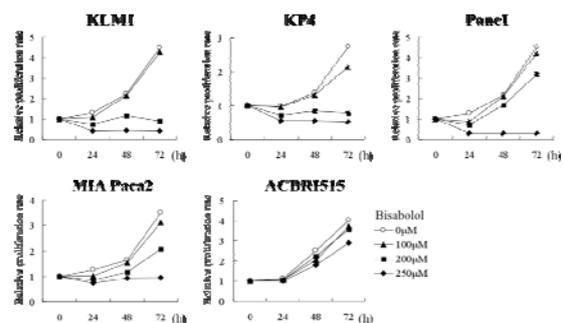


図 2. ビサボロールによる癌細胞の増殖抑制

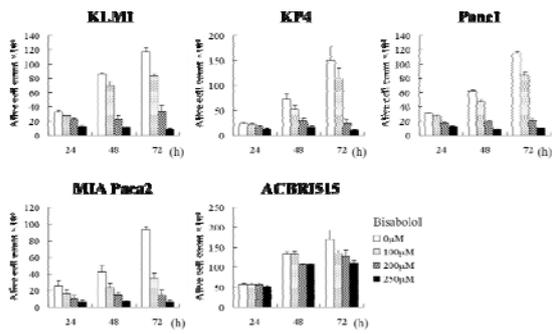


図 3. ビサボロールによる細胞死誘導

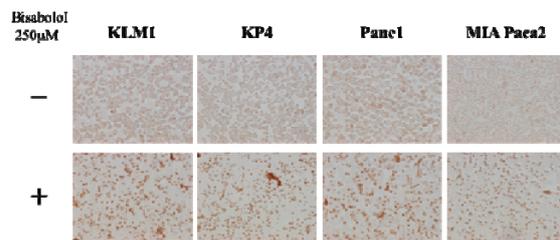


図 4. ビサボロールによるアポトーシス誘導

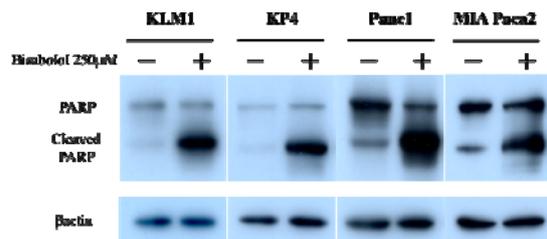


図 5. ビサボロールによるアポトーシス誘導

(2) ビサボロールの基礎的研究

胆管癌細胞株へのビサボロール投与群と非投与群の DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析により生存に関する PI3K-AKT シグナルの発現減弱が認められた (図 6)。

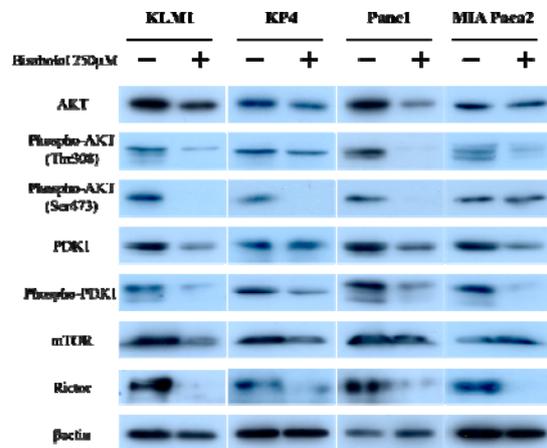


図 6. ビサボロールによる PI3K-AKT シグナルの変動

また PI3K-AKT シグナルの下流に存在する EGR1 の発現の亢進していた。EGR1 の抑制によりビサボロールによる増殖抑制効果が減弱したことより、ビサボロールによる癌細胞の増殖抑制に EGR1 が関連していることを明らかにした。EGR1 を恒常的に抑制した膵癌細胞株を樹立し、それらの細胞を用いてビサボロール投与時の増殖能、アポトーシス誘導能、浸潤能の作用機序に関してさらに検討を行った。EGR1 の抑制により、増殖能、アポトーシスの誘導能が低下し、ビサボロールの効果が減弱し、増殖能、アポトーシス誘導能に EGR1 の関連が明らかになった。一方で浸潤能に関しては関連を認めなかった。浸潤能のメカニズム解明のため PCR アレイ法により浸潤転移能に関連する 84 の遺伝子について解析を行ない、複数の遺伝子の誘導を確認した。

(3) ビサボロールの誘導体の開発

ビサボロールの誘導体を 44 種類作成し、その増殖能、アポトーシス誘導能の検討を行った。ビサボロール誘導体 5 種類においてビサボロールより増殖を抑制し、アポトーシス誘導能を有していた。いずれもビサボロールより低濃度での抗腫瘍効果が可能であった。

(4) 担癌動物モデルを用いたビサボロールの有効性の検討

ヌードマウスに対してヒト膵癌細胞株を移植した皮下発癌マウスモデル、腹膜播種マウスモデルを作成し、各担癌動物モデルにビサボロールの週 1 回 3 週連続経口投与を行った。皮下発癌モデルのビサボロール投与群は非投与群と比較して増殖抑制効果を認めた (図 7a, b)。腹膜播種モデルにおいてもビサボロール投与群において、腹膜播種の減少を認めた。

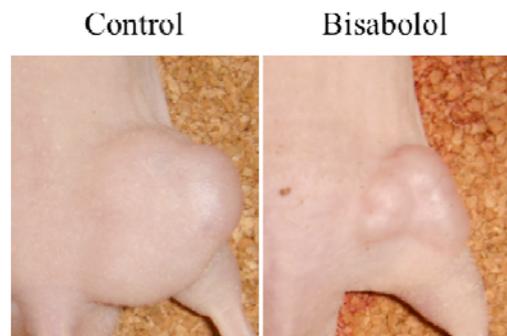


図 7a. 皮下発癌モデルにおけるビサボロールの抗腫瘍効果

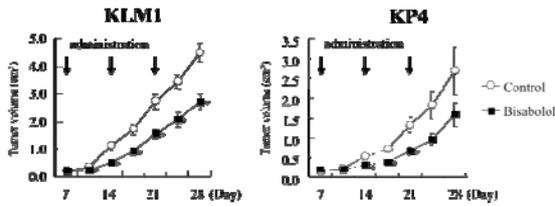


図 7b. 皮下発癌モデルにおけるビスボロールの抗腫瘍効果

(5) ビサボロールの副作用の検討

ラットに対してビスボロールの経口投与を行い、血液生化学的検査を行なった。ビスボロール投与群において軽度の WBC、PLT の減少、AST、ALT の軽度上昇を認めるが有意差はなかった (図 8)。

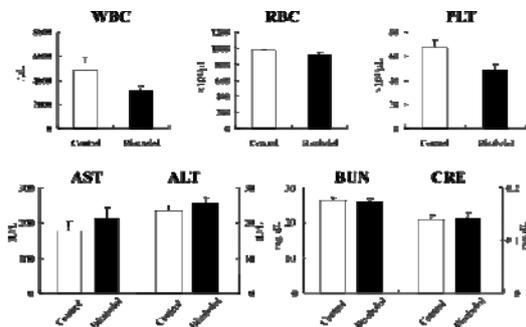


図 8. ビサボロールの血液生化学検査結果

ビスボロールは抗腫瘍効果を有しており、その作用機序の一部を解明した。研究を進めることにより、ビスボロールを用いた新規癌治療法の開発が可能となり、治療成績の向上が期待される。

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)

Antitumor effects of α -bisabolol against pancreatic cancer. Seki T, Itatsu K, Nagino M et al.; Cancer Sci. 2011 Dec;102(12):2199-205.

〔学会発表〕 (計 1 件)

1.平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ
(2013年02月06日～2013年02月07日 琵琶湖ホテル,大津)
宇野雅紀, 國料俊男, 横山幸浩, 関 崇, 江畑智希, 角田伸行, 伊神 剛, 菅原 元, 深谷昌秀, 板津慶太, 上原圭介, 吉岡裕一郎, 榎野正人

膵癌に対する α -ビスボロールの有効性の検討

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板津慶太 (ITATSU KEITA)

名古屋大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号 : 90534842

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし