

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462069

研究課題名(和文)モノテルペン類による新しい大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new chemotherapeutic agents using monoterpenes

研究代表者

村田 聡一郎(MURATA, Soichiro)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40436275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌は食生活の欧米化に伴って近年増加の著しい悪性腫瘍である。切除不能の進行大腸癌の唯一の治療法は化学療法であるが、その費用は高額であり医療費の高騰につながっている。モノテルペンはアロマテラピーで用いられる精油の主成分であり、抗炎症作用、殺菌作用に加えて、いくつかのモノテルペンは抗腫瘍作用を有することが明らかになっている。本研究では1,8-シネオール、テルピネン4オール、リナロールの3つのモノテルペンについてヒト大腸癌細胞株および免疫不全動物への腫瘍移植モデルを用いて検討した。その結果、3つの成分とも大腸癌に対する抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Monoterpenes are derived from natural plants and some of them have anti-tumor activity. We evaluated three kinds of monoterpenes, 1,8-cineole, terpinen 4-ol, and linalool, induced apoptosis in human colon cancer cell line HCT116 and RK0. In xenotransplanted SCID mice, these monoterpenes significantly inhibited tumor progression compared to control. Based on these studies, monoterpenes would be an effective strategy to treat unresectable colorectal cancer tumor especially 1,8-cineole, terpinen 4-ol, and linalool.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 モノテルペン 化学療法

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は食生活の欧米化に伴って近年増加の著しい悪性腫瘍であり、特に女性では癌死のトップになっている。今後20年間は大腸癌の増加傾向が続くとみられ、その征圧が社会的にも強く望まれている。検診での発見率は全症例の約1割程度と見られ、いまだに有症状の進行癌が多いのが現状である。切除不能の大腸癌の治療は化学療法であるが、その費用は高額であり医療費の高騰につながっている。

天然有機化合物にはイリノテカンやタキソールなど、抗腫瘍作用を有する物が知られている。モノテルペンはアロマセラピーで用いられる精油の主成分であり、炭素5個のイソプレレン単位が2つで構成されている。モノテルペンはバラのような芳香を持ち、代表的なものに柑橘類などに含まれるリモネンや清涼剤として用いられているメントールなどがある。近年モノテルペン類が抗炎症作用、殺菌作用を持つことで注目されており、いくつかのモノテルペンは抗腫瘍作用を有することが明らかになっている。

2. 研究の目的

本研究はモノテルペンに着目し、副作用のない安全で強力な大腸癌治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

モノテルペンとして1,8-シネオール、テルピネン4オール、リナロールの3つの物質についてヒト大腸癌細胞株および免疫不全動物への腫瘍移植モデルを用いて検討した。

(1)1,8-シネオールのヒト大腸癌細胞への効果の確認

1,8-シネオールはローズマリー精油やユーカリ・グロブルス精油などに含まれるモノテルペン類であり、殺菌剤としての効果が知られている。これまでに1,8-シネオールが白血病細胞に対して有効であると報告されている(Moteki H, Oncology Report, 2002)。その主な効果は腫瘍細胞のアポトーシスによるも

のと考えられているがこれまでのところ大腸癌細胞に対する作用は確認されていない。

我々はまず、ヒト大腸癌細胞株HCT116およびRKOに1,8-シネオールを添加し、抗腫瘍効果を検討した。殺細胞効果としてWST-8、増殖抑制効果としてBrdU試験を行った。次に1,8-シネオールの抗腫瘍効果のメカニズム解析を行うため、survivin、リン酸化Akt、p38、p53、p21、活性化Caspase 3の発現を検討した。またTUNEL染色によりアポトーシスの有無を検討した。最後にヒト大腸癌細胞株RKOをSCIDマウス皮下に移植し、1,8-シネオール50mg/kgを3日ごとに投与して抗腫瘍効果を検討した。

(2)テルピネン4オールのヒト大腸癌細胞への効果の確認

テルピネン4オールはフトモモ科メラルーカ属であるtea-treeから得られる精油の主成分である。これまでテルピネン4オールは中皮腫細胞株、悪性黒色腫細胞株、非小細胞肺癌細胞株に対する抗腫瘍作用が報告されているが、大腸癌に対する作用は報告されていない。本研究では、ヒト大腸癌細胞株HCT116、RKOおよび非腫瘍性の正常細胞としてヒト大腸線維芽細胞株CCD18Coを用いた。殺細胞効果としてWST-8、増殖抑制効果としてBrdU試験を行った。アポトーシスの判定はフローサイトメトリーによるAnnexin Vの陽性率で検討した。またヒト大腸癌細胞株HCT116をSCIDマウス皮下に移植し、テルピネン4オール200mg/kgを3日おきに投与して抗腫瘍効果を検討した。

(3)リナロールのヒト大腸癌細胞への効果の確認

リナロールは赤ワインに含まれるモノテルペンで、同じ赤ワインに含まれるフェノールであるレスベラトロールと比較しても生物学的活性が高いとされている。リナロールの大腸癌に対する作用もこれまで報告されていない。本研究では、ヒト大腸癌細胞株HCT116

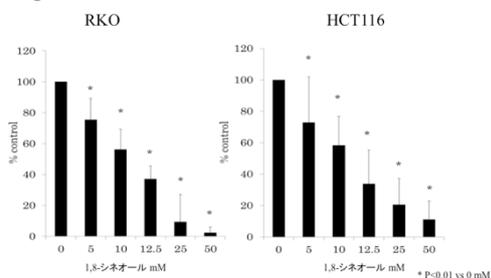
および非腫瘍性の正常細胞としてヒト大腸線維芽細胞株CCD18Coを用いた。殺細胞効果としてWST-8、増殖抑制効果としてBrdU試験を行った。ヒト大腸癌細胞株HCT116をSCIDマウス皮下に移植し、リナロールを3日おきに経口投与して抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 1,8-シネオールの大腸癌細胞への効果の確認

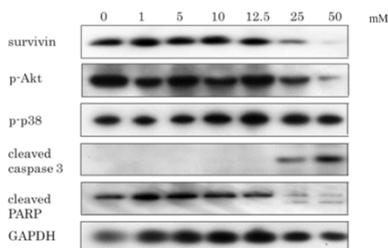
ヒト大腸癌細胞株HCT116およびRKOに1,8-シネオールを添加すると濃度依存的に著明な抗腫瘍効果が認められた(Figure 1)。

Figure 1 1,8-シネオールの殺細胞効果



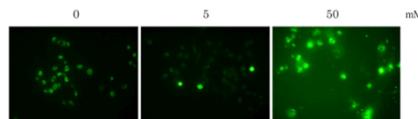
1,8-シネオールの添加により抗アポトーシス作用を有するsurvivinとリン酸化Aktが阻害され、その結果アポトーシス関連タンパク質である活性型Caspase-3と活性型PARPが増加してアポトーシスが促進されると考えられた(Figure 2)。

Figure 2 抗腫瘍効果のメカニズム解析(Western Blot)



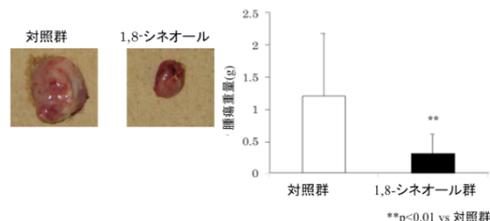
TUNEL染色では1,8-シネオールの添加により、TUNEL陽性細胞が検出され、アポトーシスが示唆された(Figure 3)。

Figure 3 アポトーシスの検討(TUNEL染色)



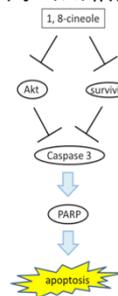
In vivoの検討では1,8-シネオールの投与によりSCIDマウスの皮下に移植したヒト大腸癌細胞株RKOは著明に縮小した(Figure 4)。

Figure 4 1,8-シネオール局所投与の腫瘍抑制効果



1,8-シネオールの大腸癌に対する抗腫瘍効果は以下のようなメカニズムが考えられた(Figure 5)。

Figure 5 1,8-シネオールの作用機序

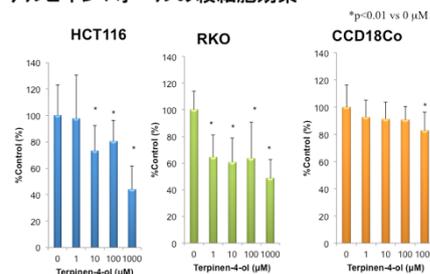


すなわち、1,8-シネオールが大腸癌の抗アポトーシス分子であるAktとsurvivinを抑制することで、caspase3と下流のPARPが活性化し、アポトーシスが誘発されることが考えられた。

(2) テルピネン4オールの大腸癌細胞への効果の確認

テルピネン4オールをヒト大腸癌株HCT116、RKO、およびCCD18Co細胞に添加したところ、HCT116とRKOに対しては濃度依存的に細胞死が認められたが、CCD18Co細胞は耐性が見られた(Figure 6)。

Figure 6 テルピネン4オールの殺細胞効果

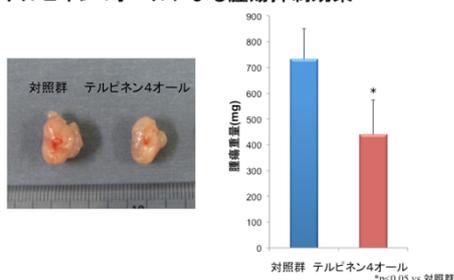


テルピネン4オール添加によりAnnexin V 陽

性率が有意に増加し、テルピネン4オールによって大腸癌細胞がアポトーシスを起こすことが示唆された。

ヒト大腸癌モデルマウスにテルピネン4オールを投与すると有意に腫瘍縮小効果が認められた(Figure 7)。

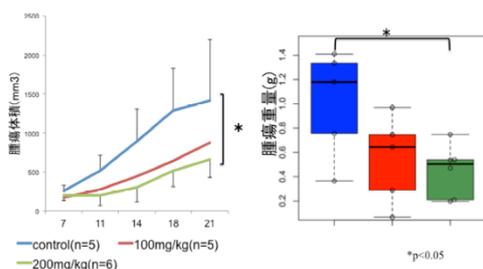
Figure 7
テルピネン4オールによる腫瘍抑制効果



(3) リナロールのヒト大腸癌細胞への効果の確認

リナロールをヒト大腸癌細胞株 HCT116 およびヒト大腸線維芽細胞株 CCD18Co に投与すると、HCT116 に対して濃度依存的な抗腫瘍効果を認めた。リナロールを担癌モデルマウスに経口投与すると、200mg/kg 投与した群で有意に腫瘍縮小効果を認めた(Figure 8)。

Figure 8
リナロール投与による腫瘍の体積と重量の変化



本研究で 1,8-シネオール、テルピネン 4 オール、リナロールという 3 つのモノテルペンに関して大腸癌に関する抗腫瘍効果の検討を行った。検討したモノテルペンは、植物由来で低コストであるうえに正常組織への侵襲が軽度なことが予想され、新規の抗癌剤としての可能性を秘めている。今後さらに有効なモノテルペンの探索を進め、最適な投与経路の検討などを行い、低コストで有効な抗癌

剤の開発につなげていきたいと考えている。

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 2 件)

① Murata S, Ogawa K, Matsuzaka T, Chiba M, Nakayama K, Iwasaki K, Kurokawa T, Sano N, Tanoi T, Ohkohchi N.

1,8-Cineole Ameliorates Steatosis of Pten Liver Specific KO Mice via Akt

Inactivation. *Int J Mol Sci*. 査読あり. 2015 May 27;16(6):12051-63. doi: 10.3390/ijms160612051.

② Murata S, Shiragami R, Kosugi C,

Tezuka T, Yamazaki M, Hirano A, Yoshimura Y, Suzuki M, Shuto K,

Ohkohchi N, Koda K. Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncol Rep*. 査読あり. 2013 Dec;30(6):2647-52. doi: 10.3892/or.2013.2763.

[学会発表] (計 4 件)

① 岩崎 健一、村田 聡一郎、大和田 洋平、中山 健、黒川 友博、佐野 直樹、田野井 智倫、松村 英樹、寺崎 正彦、伊藤 紘、松井 裕史、鄭 允文、大河内 信弘. 赤ワインに含まれる Linalool は腫瘍選択的に細胞膜脂質の過酸化を引き起こしアポトーシスを誘導する. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016.4.14.大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

② 中山 健、村田 聡一郎、岩崎 健一、黒川 友博、佐野 直樹、田野井 智倫、野渡 剛之、Villareal Orlina、磯田 博子、大河内 信弘. アロマオイルによる新規抗癌治療. 第 115 回日本外科学会定期学術集会. 2015.4.16. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

③ 中山 健、村田 聡一郎、磯田 博子、

黒川 友博、佐野 直樹、田野井 智倫、
野渡 剛之、丸山 岳人、大河内 信弘。
テルピネン 4 オールは大腸癌細胞の増殖
を抑制する。第69回日本消化器外科学会
総会。2014.7.16. 郡山市民文化センター
(福島県郡山市)

- ④ 村田 聡一郎、白神 梨沙、小杉 千弘、
平野 敦史、吉村 雪野、山崎 将人、
首藤 潔、幸田 圭史。1,8-シネオールは
ヒト大腸癌細胞の増殖を抑制する。第 113
回日本外科学会定期学術集会。2013.4.11。
福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

[図書] (計 1 件)

Soichiro Murata. InTech, New
chemotherapeutic agents: Monoterpenes
and fatty acid synthase inhibitors. Colorectal
Cancer-from Pathogenesis to Treatment.
Editor Luis Rodrigo, 2016.

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 聡一郎 (MURATA, Soichiro)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号 : 40436275