

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861149

研究課題名(和文) 抗癌剤耐性関連ABCトランスポーターに対するクルクミン誘導体の抑制効果の研究

研究課題名(英文) Study of the inhibitory effect of curcumin derivatives for the anticancer drug resistance related ABC transporter

研究代表者

工藤 克昌 (Katsuyoshi, Kudoh)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30607768

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)：癌に対する抗癌剤治療の問題として抗癌剤耐性能の獲得があり、その要因のひとつに抗癌剤耐性ABCトランスポーターの過剰発現がある。本研究ではクルクミン誘導体のABCトランスポーターへの効果を明らかにすることを目的とした。

抗癌剤耐性ABCトランスポーターを過剰発現させた癌細胞株を用い、ABCトランスポーターに特異的な蛍光基質を用いてFACS解析し、クルクミン誘導体存在下においてABCトランスポーター機能の抑制効果が示唆された。細胞毒性試験で抗癌剤の感受性を検討しクルクミン誘導体存在下で抗癌剤感受性が約20倍に上昇した。クルクミン誘導体のABCトランスポーターに対する抑制剤としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There is the acquisition of anticancer drug resistance capacity as an anti-cancer agent treatment of the problem with respect to cancer, there is an over-expression of anticancer drug resistance ABC transporter in one of the factors. In this study aimed to clarify the effect on ABC transporters curcumin derivatives.

Using carcinoma cell lines overexpressing anticancer drug resistance ABC transporters, and FACS analysis using a fluorescent substrate specific for the ABC transporter in the presence of curcumin derivative inhibitory effect of ABC transporter function was suggested. Anticancer drug sensitivity was increased to about 20-fold in the presence of curcumin derivatives examined the anticancer drug sensitivity in cell toxicity test. Potential as an inhibitor for the ABC transporter curcumin derivatives have been suggested.

研究分野：消化器外科学

キーワード：抗癌剤耐性 ABCトランスポーター クルクミン誘導体

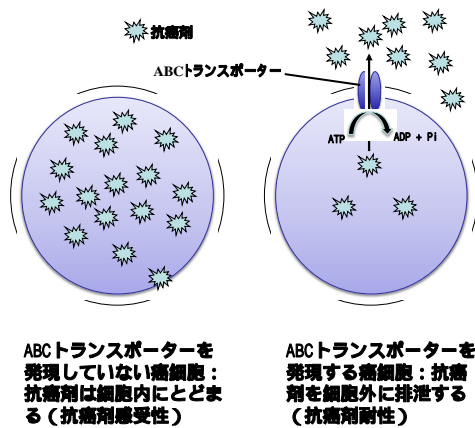
1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する手術成績の向上、切除不能進行再発大腸癌に対する抗癌剤治療の進歩にも関わらず、その治療成績はまだまだ満足できる状況にない。大腸癌に対する抗癌剤治療の問題点として癌細胞の抗癌剤耐性の獲得があるが、その一因として抗癌剤耐性 ABC トランスポーターの癌細胞での過剰発現がある。

ABC トランスポーターとは、ATP のエネルギーを用い薬剤等の排出を行なう膜輸送タンパクである(図1)。ヒトには 48 種類の ABC トランスポーターが存在し、A-G のサブファミリーに分類され、胃癌・大腸癌といった消化器癌においても ABCB1 (P-glycoprotein: Pgp), ABCC1 (MRP1), ABCG2 (BCRP) などの抗癌剤排出 ABC トランスポーターが過剰発現していることが知られている。これらトランスポーターに対する抑制剤の開発により、癌の抗癌剤耐性の克服が可能になると考えられている(Shukla S. Ohnuma S. et al. Curr Drug Targets. 2011)。しかし、これまで実地臨床で使用できる抑制剤はこれまで存在しない。

クルクミンはカレーのスパイスであるウコン(ターメリック)の黄色色素で、ポリフェノール的一种である(図2)。クルクミン

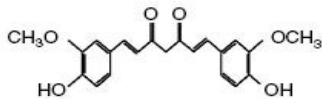
図1 ABCトランスポーターによる薬剤耐性のメカニズム



ABCトランスポーターを発現していない癌細胞：抗癌剤は細胞内にとどまる(抗癌剤感受性)

ABCトランスポーターを発現する癌細胞：抗癌剤を細胞外に排泄する(抗癌剤耐性)

図2 クルクミンの化学構造



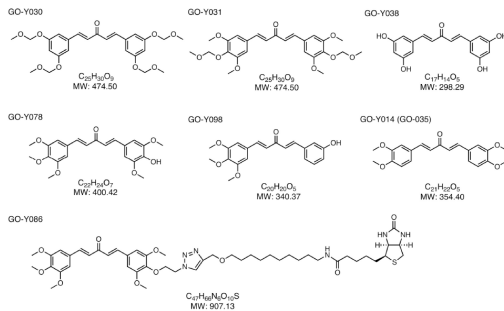
化学式：C₂₁H₂₀O₆、分子量：368.38

には抗腫瘍効果があることが報告されており、その作用としては、アポトーシスの誘導、転写因子である NF-κB の抑制が知られている(Aggarwal BB. et al. Ann N Y Acad Sci.)。また、クルクミンは抗癌剤耐性 ABC トランスポーターに直接作用することによって、抗癌剤排出機能を抑制し、癌細胞の抗癌剤感受性を向上させると報告されている(Limtrakul P. et al. Mol Cell Biochem.

2007)。

東北大学大学院薬学研究科合成有機化学では 2000 種を超える新規合成有機化合物ライブラリーを有し、その中でクルクミン誘導体の一つがクルクミンに比較して大腸癌細胞株増殖抑制効果を示したことから、その誘導体の化学構造を基に新たに 50 種類のクルクミン誘導体が新規合成された(図3)。

図3 クルクミン誘導体の化学構造



Hiroyuki Shibata and Yoshiharu Iwabuchi, CHALLENGES IN ESTABLISHING POTENT CANCER CHEMOTHERAPY USING NEWLY SYNTHESIZED 1,5-DIARYL-3-OXO-1,4-PENTADIENE ANALOGS OF CURCUMIN より引用

そして実際にそれら新規誘導体のひとつは大腸癌細胞株に対して約 40 倍の増殖抑制効果を示した(Ohori H. et al. Mol Cancer Ther. 2006)。しかし、これらクルクミン誘導体が抗癌剤耐性 ABC トランスポーター機能を抑制するかどうかはまだ明らかとなっていない。

申請者はこれまで、消化器外科医として消化管癌の臨床に携わってきたが、進行再発癌における抗癌剤耐性は克服しなければならない喫緊の課題であることを認識している。また、学位研究として消化管生理の研究をしてきた(Kudoh K et al. J Gastroenterol. 2009)。ABC トランスポーターは、癌細胞だけでなく小腸、大腸に生理的に発現し薬剤のバイオアベイラビリティを規定する一因ともなっている。消化管生理という観点からも、クルクミン誘導体が ABC トランスポーターにどのように作用するかを明らかにすることは重要と考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クルクミン誘導体が、大腸癌に発現する抗癌剤耐性 ABC トランスポーターの新規抑制剤になることを証明し、chemosensitizer として臨床に応用できることを証明することである。具体的研究項目は、クルクミン誘導体が、

- (1) ABC トランスポーター発現大腸癌細胞株の抗がん剤感受性を向上させることを確認する、
- (2) ABC トランスポーターにどのように作用し機能抑制するかを生化学的に明らかとする、
- (3) 抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させることを動物モデルにおいて確認することである。

3. 研究の方法

ABC トランスポーターは癌細胞に過剰発現している ABCB1, ABCG2 を解析対象とし、ヒト子宮頸癌細胞株の KB-3-1 と ABCB1 を過剰発

現させた KB-V1、慢性骨髄性白血病細胞株の K562 と ABCG2 を過剰発現させた K562/BCRP を用いる。また、クルクミン誘導体は、これまでに抗腫瘍効果が認められている GO-Y030, GO-Y078 を始めとした、入手可能であった計 19 種で検討を行う。

(1) 使用する癌細胞株の ABC トランスポーター発現を確認する。

RT-PCR

ABCB1, ABCG2 の発現を mRNA レベルで確認する。

(2) クルクミン誘導体が ABC トランスポーターの排泄能を抑制することを証明する。

FACS assay

ABC トランスポーターに特異的な蛍光基質 (ABCB1 : Rhodamine123, ABCG2: Mitoxantrene) を用い、クルクミン誘導体が ABC トランスポーターによる基質輸送を抑制するかどうかをフローサイトメトリで解析する。

(3) クルクミン誘導体が ABC トランスポーター発現癌細胞株の抗癌剤耐性を克服するかどうか明らかにする

細胞毒性試験 (MTS アッセイ)

クルクミン誘導体自体の細胞に対する毒性チェックを行う

クルクミン誘導体が ABC トランスポーター発現癌細胞株の抗癌剤感受性 (vinblastine, SN-38 など) を向上させるか ABC トランスポーター非発現癌細胞株と比較し確認する。

(4) クルクミン誘導体の ABC トランスポーターに対する作用メカニズムの生化学的解析

A) ATPase アッセイ

ABCB1, ABCG2 の基質は ATPase 活性を促進する事が知られており、クルクミン誘導体が ATPase 活性を促進するかどうかを検討する。またミカエリス-メンテンの式を用い、Km (ATP) 値を制酸剤の存在 / 非存在下で求め、制酸剤が ATP 結合部位にも作用するかどうかを確認する。

B) IAAP アッセイ

ABCB1, ABCG2 の基質であるプラゾシンのアナログ、[125I]iodoarylazidoprazosin (IAAP) は基質結合部位を標識できる。クルクミン誘導体が ABCB1, ABCG2 の IAAP 標識を抑制するかどうかを確認することで、クルクミン誘導体が ABCB1, ABCG2 の基質結合部位に結合 (競争) するかどうかを証明できる。

この実験では、ABCB1, ABCG2 発現細胞の膜分画を使う。膜分画はヒト ABCB1, ABCG2 を発現させた昆虫細胞より抽出する。

(5) 動物実験

ABC トランスポーター発現癌細胞株による皮下移植ヌードマウスモデルにおいて、クルクミン誘導体が併用抗癌剤の抗腫瘍効果を増強させるか確認する。抗癌剤単独投与群と抗癌剤/クルクミン誘導体併用群それぞれの腫瘍体積を比較する。各群 5 匹を予定している。

4. 研究成果

(1) RT-PCR

使用した癌細胞株 KB-3-1, KB-V1, K562, K562/BCRP の RT-PCR を行い、KB-V1 には ABCB1 が、K562/BCRP には ABCG2 が過剰発現していることを確認した

(2) FACS assay

まず、ABCB1 に対して検討を行った。ABCB1 に特異的な蛍光基質 Rhodamine123 を用いてクルクミン誘導体併用下での細胞内への取り込みの変化を解析した。ABCB1 発現のない KB-3-1 細胞株では Rhodamine123 は細胞内に取り込まれ、高い蛍光強度を示したが、ABCB1 過剰発現株では Rhodamine123 が細胞外に排出され細胞内の蛍光強度は低下した。クルクミン誘導体 GO-Y030 存在下において 10 μ M, 20 μ M で併用した際に細胞内の蛍光強度の上昇を認めトランスポーター機能を抑制していることが示唆されたが、その効果は既知の Positive control の Cyclosporin A ほどは認めなかった。GO-Y078 では有意な抑制効果は認めなかった (図 4-1, 2)

図4-1 ABCB1におけるRhodamine123の細胞内蓄積

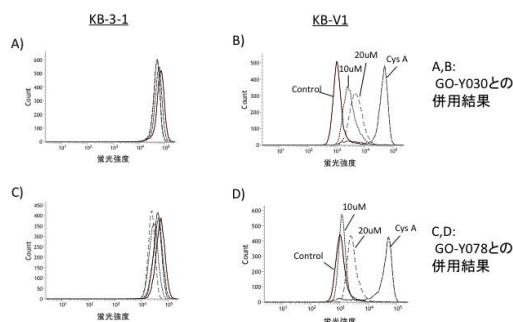
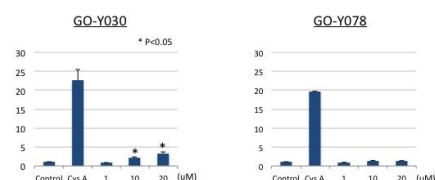


図4-2 KB-V1における細胞内蛍光強度の比較



次いで ABCG2 に対し同様に蛍光基質 Mitoxantrone の細胞内の蓄積の変化を検討したところ、GO-Y030,078 の両方でクルクミン誘導体の濃度が 1 μ M という低い濃度から細胞内蛍光強度の増加を認め、既知の Positive control の Ko143 と同等の抑制効果を認めた(図5-1,2)。その他クルクミン誘導体 17 種においてスクリーニングを行ったところ、GO-Y168,172 というクルクミン誘導体でも同様の効果が認められた(図6)。

図5-1 ABCG2 における Mitoxantrone の細胞内蓄積

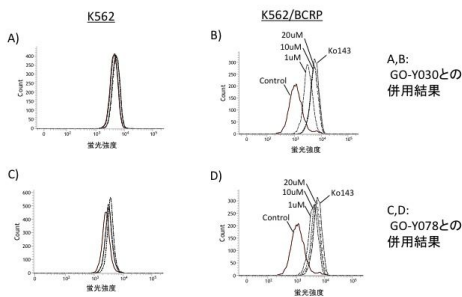


図5-2 K562/BCRPにおける細胞内蛍光強度の比較

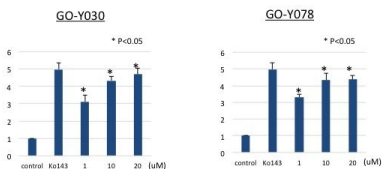
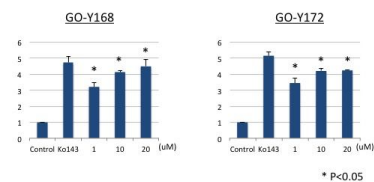


図6 K562/BCRPにおける細胞内蛍光強度の比較
他のクルクミン誘導体の解析結果



(3) 細胞毒性試験 (MTS アッセイ)

FACS assay でより強い抑制効果が示唆された ABCG2 を対象に細胞毒性試験を行った。ABCG2 の基質となる抗癌剤 SN-38 を用いて、クルクミン誘導体併用下において抗癌剤の感受性が改善するか検討した。

まずクルクミン誘導体単独での抗腫瘍効果を検討した。K562, K562/BCRP 細胞株に GO-Y030, GO-Y078 をそれぞれ 0-100 μ M の濃度で調節した培地を投与し 5 日間培養し IC50 を測定した。GO-Y030 の IC50 は K562 5.3 μ M, K562/BCRP 5.0 μ M, GO-Y078 の IC50 は K562 1.7 μ M, K562/BCRP 1.5 μ M であった。

次いでクルクミン誘導体単独で細胞障害をきたさない濃度の 1 μ M を用いて、抗癌剤の感受性の変化を検討した。

ABCG2 が発現している K562/BCRP 細胞では SN-38 が細胞外に排出されることにより抗癌剤の感受性が低下していた。GO-Y030,078 1 μ M を併用した場合、K562 細胞ではクルクミン誘導体の併用の有無に関わらず SN-38 の感受性は一定であったが、K562/BCRP では何も併用していない Control よりも SN-38 の感受性が改善した(図7)。IC50 値を比較すると、K562 と K562/BCRP の間に約 10 倍の抗癌剤の抵抗性を認めたが、クルクミン誘導体を併用することで抵抗性を約 2 倍までに減少させた(表1)。

図7 ABCG2に対するMTSアッセイ

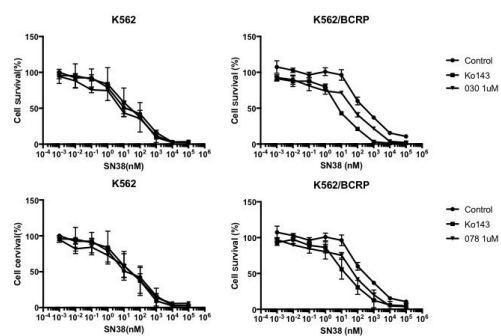


表1 IC50値の比較

SN-38 treatment	IC50 (μ M)	relative resistance
K562	29.2	1
K562/BCRP	297.4	10.2
Add Curcumin analog		
K562/BCRP + GO-Y030 1 μ M	52.4	1.8
K562/BCRP + GO-Y178 1 μ M	56.4	1.9

以上(1)-(3)の研究結果より、クルクミン誘導体がABCトランスポーターの薬剤排出機能を抑制しうることが示唆された。今後、ATPase assay, IAAP assay による生化学的解析を進め、クルクミン誘導体のABCトランスポーターの新規抑制剤としての可能性を探る予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

小原恵、抗癌剤耐性 ABC トランスポーターに対するクルクミン誘導体の抑制効果、第 1 回 疾患エピゲノムセンター冬の合宿、2015.2.14、秋保ホテルクレセント(仙台)

小原恵、Effect of Curcumin Analogs on Multidrug Resistant ABC Transporters、第

8 回リトリート大学院生研究発表会、
2015.1.17、東北大学(仙台)
〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 克昌 (Katsuyoshi Kudoh)・東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30607768

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

研究協力者

小原 恵 (Megumi Ohbara)・東北大学・大学院生