

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460244

研究課題名(和文) P2Y12受容体拮抗薬を癌転移抑制薬として臨床適用するための基礎的研究

研究課題名(英文) Basic studies on P2Y12 receptor antagonists as candidates for antimetastatic agents

研究代表者

中村 一基 (Nakamura, Kazuki)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20299093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： In vivo がん転移実験において、P2Y12 受容体拮抗薬であるクロピドグレル25 mg/kg 投与群ではコントロール群と比較して、肺転移結節数が有意に減少したことから、P2Y12 受容体拮抗薬による抗転移作用が動物実験で確認された。

次に、in vitro 実験によりクロピドグレルは、がん細胞の浸潤能および遊走能を低下させることを解明し、その機序として上皮間葉転換の指標であるVimentin発現量の減少が示唆された。一方、チクロピジン、がん細胞が浸潤する際に分泌するMatrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 活性とMMP-2発現量を減少させた。

研究成果の概要(英文)： First, we demonstrated that orally administered Clopidogrel, a P2Y12 receptor antagonist, inhibited lung metastasis in mice intravenously injected with B16-BL6 mouse melanoma cells.

To elucidate the mechanism of antimetastatic action of P2Y12 receptor antagonists, the effects of Clopidogrel and Ticlopidine on cell motility and invasiveness were measured by chemotaxis assay and chemoinvasion assay, respectively. Clopidogrel significantly reduced both cell motility and invasiveness in a dose-dependent manner. Ticlopidine also significantly reduced cell motility in a dose-dependent manner. Furthermore, Clopidogrel reduced the protein expression level of Vimentin, while Ticlopidine significantly reduced Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity and the protein expression level of MMP-2.

研究分野：腫瘍薬理学

キーワード：P2Y12受容体拮抗薬 クロピドグレル チクロピジン がん転移 がん細胞浸潤能 がん細胞遊走能 Vimentin MMP-2

1. 研究開始当初の背景

高転移性の癌細胞は、原発巣から遠隔臓器に血行性転移する際に、Adenosine 5'-diphosphate (ADP) を分泌し血小板凝集を惹起することで、癌細胞と血小板との凝集塊を形成し、血管内皮に接着することで転移先臓器内における血管外脱出の足場を築く。また、血小板凝集塊を纏うことで血中免疫担当細胞である単球や Natural killer (NK) 細胞からの攻撃を回避する。したがって、血小板の ADP 受容体の一つである P2Y₁₂ 受容体を遮断するクロピドグレルとチクロピジンは、抗転移薬候補として有力であると考えられる。また、放射線治療中の前立腺癌患者にクロピドグレルを投与することで、延命効果が認められたという臨床試験報告も存在する (Choe K.S., Correa D., Jani A.B. and Liauw S.L., The use of anticoagulants improves biochemical control of localized prostate cancer treated with radiotherapy, Cancer 116: 1820-1826, 2010)。

このように、クロピドグレルは臨床試験において癌患者に対する延命効果が報告されてはいるが、延命効果に貢献するであろうと予想される、その抗転移作用を実験的に証明した論文は乏しく、とりわけ、応募者が熟練している血行性肺転移モデルを用いた報告は、見当たらない。

したがって、応募者は既に熟練している血行性肺転移モデル (Yoshikawa N., Kunitomo M., Kagota S., Shinozuka K. and Nakamura K., Inhibitory effect of cordycepin on hematogenic metastasis of B16-F1 mouse melanoma cells accelerated by adenosine-5'-diphosphate, Anticancer Res 29: 3857-3860, 2009 にて報告済) を用いて、クロピドグレルならびにチクロピジンの癌転移抑制効果を検討しようという着想に至った。さらに、これらの癌転移抑制効果を解明した後には、これも応募者が既に熟練している癌細胞の化学浸潤能アッセイ (Yoshikawa N., Nakamura K., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K. and Kunitomo M., Effect of PKC412, a selective inhibitor of protein kinase C, on lung metastasis in mice injected with B16 melanoma cells, Life Sci 72: 1377-1387, 2003 にて報告済)、あるいはウエスタンブロッティングアッセイ (Yoshikawa N., Yamada S., Takeuchi C., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M. and Nakamura K., Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A₃ receptor followed by glycogen synthase kinase-3 activation and cyclin D₁ suppression, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 377: 591-595, 2008 にて cyclin D₁ の検出を報告済) などを用いて、クロピドグレルならびに

チクロピジンの癌細胞への直接作用による癌転移抑制効果の機序を分子生物学的に探究した。

2. 研究の目的

P2Y₁₂ 受容体を遮断することで ADP 誘発血小板凝集を抑制するクロピドグレルとチクロピジンは、抗血液凝固薬として汎用されているチエノピリジン誘導体である。

このヒトへの安全性がある程度認められている市販の抗血液凝固薬に着目し、これらを新たに抗転移薬として臨床適用 (効能追加) するための基礎的研究として、血行性肺転移モデルマウスに対するクロピドグレルの癌転移抑制効果を検討した。

さらに、*in vitro* の実験系を駆使することにより、クロピドグレルおよびチクロピジンが血小板凝集抑制作用以外の機序、すなわち、癌細胞に対する直接作用を介して癌転移を抑制している可能性を分子生物学的に追究した。

3. 研究の方法

(1) 高転移性の B16-BL6 マウスメラノーマ細胞 1×10^5 個を可移植性の C57BL/6NCr マウス尾静脈内に接種 2 週間後に、ウレタン麻酔下で肺を摘出し、肺に形成された黒色の肺転移結節をカウントした。クロピドグレルは、癌細胞接種日から連続 2 週間、1 日 1 回経口投与 (いずれも経口投与後、肝で代謝を受けて活性代謝物となるため) した。癌転移抑制効果は、クロピドグレルを投与せず B16-BL6 細胞のみを静脈内投与した対照マウスの肺転移結節数に対する減少作用にて判定した。

また、抗血液凝固能は、マウスの尾部先端から出血させて止血するまでの時間を測定することにより判定した。

(2) クロピドグレルとチクロピジンが血小板凝集抑制作用以外の癌細胞への直接的な癌転移抑制効果について *in vitro* の実験系を駆使して解析した。すなわち、*in vivo* におけるがん細胞の転移能を反映する浸潤能と遊走能に対するクロピドグレルとチクロピジンの影響を検討した後、浸潤能および遊走能抑制作用を示す際の標的分子の解明を分子生物学的に試みた。

また、上皮肝葉転換により癌細胞の浸潤能や転移能が亢進していると報告されていることから、肝葉系細胞のマーカーであり、癌細胞における上皮肝葉転換の指標として用いられている Vimentin タンパク質発現量に対するクロピドグレルとチクロピジンの影響を検討した。

4. 研究成果

In vivo 癌転移実験において、P2Y₁₂ 受容

体拮抗薬であるクロピドグレル 25 mg/kg 投与群ではコントロール群と比較して、肺転移結節数が有意に減少したことから、P2Y₁₂ 受容体拮抗薬による抗転移作用が動物実験で確認された。この際、クロピドグレル 25 mg/kg 投与群では、有意な出血傾向が認められたため、*in vivo* 実験系における癌転移抑制効果には P2Y₁₂ 受容体阻害を介する抗血液凝固作用が関与している可能性が示唆された。

次に、*in vitro* 実験によりクロピドグレルは、癌細胞の浸潤能および遊走能を、いずれも濃度依存的に有意に低下させることにより癌転移を抑制することを解明した。さらに、その機序として上皮間葉転換の指標である Vimentin 発現量の減少が示唆された。一方、チクロピジンは、癌細胞の遊走能を濃度依存的に有意に抑制させるとともに、癌細胞が浸潤する際に分泌する Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) 発現量を減少させた。さらに、チクロピジンには MMP-9 活性を低下させる作用のあることも示唆された。なお、癌細胞の浸潤過程において重要な働きを示す Integrin α_1 発現量に対するクロピドグレルおよびチクロピジンの影響は認められなかった。

以上の研究成果より、経口投与後に肝で代謝を受けて、血小板凝集抑制作用を示す活性体となるクロピドグレルが *in vivo* および *in vitro* 実験系のいずれにおいても抗転移作用を示すことが明らかとなった。とりわけ、*in vitro* 実験系におけるクロピドグレルによる抗転移効果は P2Y₁₂ 受容体以外の別の標的分子を介して発揮されている可能性が示唆された。

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 5 件)

Seiichi Takeda, Takao Toda and Kazuki Nakamura, Effects of medium molecular weight heparinyl phenylalanine on superoxide dismutase activity in mice, *In Vivo*, 査読有, 30 巻, 2016, 841-844.

Seiichi Takeda, Takao Toda and Kazuki Nakamura, Inhibitory effects of medium molecular weight heparinyl amino acid derivatives on ischemic paw edema in mice, *In Vivo*, 査読有, 30 巻, 2016, 433-437.

Seiichi Takeda, Takao Toda and Kazuki Nakamura, Middle molecular weight heparinyl amino acid derivatives (MHADs) function as indirect radical scavengers *in vitro*, *Pharmacology and Pharmacy*, 査読有, 7 巻, 2016, 117-123.

DOI:10.4236/pp.2016.73015

Narayanan K. Narayanan, Kazuhiro Kunimasa, Yukio Yamori, Mari Mori, Hideki Mori, Kazuki Nakamura, George Miller, Upender Manne, Amit K. Tiwari and Bhagavathi Narayanan, Antitumor activity of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract in human and murine tumor models *in vitro* and in a colon-26 tumor-bearing mouse model *in vivo*, *Cancer Med*, 査読有, 4 巻, 2015, 1767-1780.

DOI:10.1002/cam4.520

Kazuki Nakamura, Kazumasa Shinozuka and Noriko Yoshikawa, Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis*, *J Pharmacol Sci*, 査読有, 127 巻, 2015, 53-56.

DOI:10.1016/j.jphs.2014.09.001

〔学会発表〕(計 4 件)

Noriko Yoshikawa, Mayuko Hatai, Eriko Kinoshita, Satomi Kagota, Kazumasa Shinozuka and Kazuki Nakamura, Anti-metastatic effect of Clopidogrel is associated with inhibition of invasiveness in B16-BL6 mouse melanoma cells, 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 23 May 2017, Stockholm, Sweden

渡部 彩葉、吉川 紀子、木下 恵理子、畑井 麻友子、籠田 智美、篠塚 和正、中村 一基、血小板凝集抑制薬クロピドグレルのがん転移抑制作用機序の追究、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 27 日、仙台国際センター (宮城県・仙台市)

向井 裕香、山本 理紗子、冨田 安子、吉川 紀子、畑井 麻友子、田中 マチ子、籠田 智美、篠塚 和正、中村 一基、血小板凝集抑制薬クロピドグレルのがん転移抑制薬としての可能性について、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

栗林 千尋、北 佐知子、吉川 紀子、大石 真子、櫻井 文香、畑井 麻友子、田中 マチ子、籠田 智美、篠塚 和正、中村 一基、マウスメラノーマ細胞の転移能とがん抑制遺伝子 Pcdcd4 発現量の関係、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~yakuri1/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中村 一基 (NAKAMURA, Kazuki)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20299093