

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462007

研究課題名(和文)新規分化誘導剤と癌分子標的薬による固形癌細胞の増殖抑制とその分子基盤解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of solid tumor growth inhibition by a new differentiation inducer and molecular target agents

研究代表者

粕壁 隆 (KASUKABE, TAKASHI)

島根大学・医学部・特任教授

研究者番号：50152658

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)：本研究は白血病細胞の新規分化誘導剤が固形癌細胞への増殖抑制効果をも発揮する可能性があること、およびその分子基盤を明らかにし、新しい作用機序による固形癌の治療法を確立することを目的とした。この研究では、我々が新たに見出した分化誘導剤コチレニンAと白血病治療に使用されている低濃度の三酸化ヒ素とを併用すると相乗的に固形癌細胞の増殖を阻害出来ることを見出した。これら併用効果の分子機構には活性化カスパーゼ7の誘導、サーバイピン抑制および活性化酸素の誘導が関連していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have examined whether a new differentiation inducer of leukemia cells can suppress the proliferation of solid tumor cells. In this study we found that cotylenin A significantly potentiate arsenic trioxide-induced inhibition of cell growth of human breast and pancreatic cancer cells. The combined treatment with cotylenin A and arsenic trioxide induced cleaved caspase-7 in human breast cancer MCF-7 cells at the concentration which arsenic trioxide alone scarcely induced and cotylenin A alone only weakly induced. Expression of survivin was markedly decreased with the presence of both cotylenin A and arsenic trioxide. The pretreatment with N-acetylcysteine significantly reduced the combination treatment-induced cell growth inhibition. These data suggest that induction of cleaved caspase-7, inhibition of survivin and oxidative responses are important events in the corporative inhibition in the growth of MCF-7 cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：コチレニンA 三酸化ヒ素 分化誘導剤 乳癌細胞 増殖抑制 併用効果 アポトーシス 活性化酸素

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、広く使用されている抗癌剤の多くは癌細胞を殺すことにより、その治療効果を発揮する。しかし、その欠点として正常細胞にも作用するため深刻な副作用を引き起こすことがあげられる。そこで、今までとは異なる作用機構に基づいた治療法の開発が望まれている。我々は、白血病が分化調節機構の破綻に深く関わっていることに注目し、がん細胞の分化異常を克服する分化誘導剤の開発を進めてきた。分化誘導剤を用いた分化誘導療法はある種の白血病では有効性が確認され、現在臨床的に適応されている。このような分化誘導剤は、また、cDNA マイクロアレイの研究から多数の遺伝子の発現を修飾している事が判明してきた。従って、このような分化誘導剤は、遺伝子発現修飾物質とも考えられ、固形癌細胞の細胞生物学的性質をも変化させる可能性がある。そこで、これまでに白血病細胞で有効と見出してきた分化誘導剤が固形癌細胞の増殖制御にも応用できるか否かを検討することは、今までとは異なる作用機構に基づいた癌治療法の開発につながる可能性がある。

(2) 我々が新たに見出した分化誘導剤コチレニンAは、現在白血病の分化誘導剤として臨床的に用いられているレチノイン酸と同様に強い分化誘導活性を示し、また、レチノイン酸に抵抗性になった白血病細胞にも顕著な分化誘導効果を示した。さらに、白血病細胞を移植した SCID マウスにおいても延命効果を示したことから、コチレニンAはレチノイン酸につぐ *in vivo* で有効な分化誘導剤となる可能性がある。そこで、我々はこの新規で強力な分化誘導剤コチレニンAが単独または他の分化誘導剤や化学療法剤との併用で固形癌細胞の増殖を抑制できるか検討した。その結果、分化誘導剤コチレニンAが mTOR (mammalian target of rapamycin) の阻害剤であり、分化誘導剤でもあるラパマイシンと相乗的にヒト乳癌細胞の増殖を顕著に抑制すること、さらに、コチレニンAとラパマイシンの併用処理はヒト乳癌細胞を移植したヌードマウスに対して、単独処理よりも顕著な治療効果を示すことを見出した。これらの結果は、この併用処理が乳癌を含む固形癌に対する新しい治療法となる可能性を示唆する。さらに、最近、この併用処理に伴って、増殖抑制的に作用すると考えられているサイクリン G2 遺伝子の発現が早期から顕著に誘導されることを見出した。しかし、この併用処理効果の作用機序の研究は緒についたばかりである。

2. 研究の目的

(1) 本研究は新規分化誘導剤コチレニンAが固形癌細胞への増殖抑制効果を発揮する際の分子機構ならびに分子標的を明らかにし、新しい作用機序による固形癌の治療法を確立することを目的とする。癌細胞ではしばしば

mTOR および、その上流のキナーゼが活性化されていることが判っている。そこで、ラパマイシンのような mTOR 阻害剤は癌に特異的に有効な抗癌剤の候補になっている。現在、日本でもラパマイシン誘導体が進行性腎癌の治療に使用が認められた。しかし、種々の癌細胞に対する有効濃度と最大効果にはバラツキがあり、単剤での臨床応用には限界が指摘されている。我々は、最近、乳癌細胞を固形癌細胞の実験モデルとしてコチレニンAとの併用効果をスクリーニングした結果、コチレニンAとラパマイシンの併用が最も顕著であることを見出した。本研究ではコチレニンAとラパマイシンの併用による乳癌細胞の増殖抑制の分子メカニズムを解明する。さらに、これらの処理の最も重要な分子標的を明らかにし、その発現と臨床症状との関連性を検討するとともに、新しい分子標的治療法の確立を目指す。

(2) 最近、白血病細胞を用いてコチレニンAと様々な分化誘導剤との併用効果を検索している中で、低濃度の三酸化ヒ素 (arsenic trioxide, ATO) が前骨髄球性白血病細胞のコチレニンAによる分化を促進することを見出した。そこで、この併用処理が固形癌細胞に対しても有効な抗癌作用を示すことが出来るかどうか検討し、さらに、その併用効果の作用機序を検討する。

3. 研究の方法

細胞増殖は MTT assay または trypan blue dye exclusion test で測定した。リン酸化蛋白質は Western blotting で測定した。アポトーシス蛋白質のプロファイリングは Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems) を用いて行った。 *In vitro* 細胞浸潤能測定は xCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche-Diagnostics) で行った。

4. 研究成果

(1) 我々はこれまでに、植物成長制御因子として報告されているコチレニンAおよび mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害剤であるラパマイシンが白血病細胞に対する強い分化誘導剤であることを報告している。さらに、コチレニンAとラパマイシンがヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖を相乗的に抑制することを見出している。また、MCF-7 細胞をヌードマウスに移植した実験系でも、コチレニンAとラパマイシンを併用処理した場合、それぞれ単独処理よりも顕著な抗腫瘍効果を示すことを見出した。しかしながら、これら分化誘導剤の併用による効果のメカニズムは未だ不明である。我々は最近、癌細胞において高頻度に活性化されている Akt/mTOR シグナル経路について検討し、コチレニンAがラパマイシン処理で誘導される Akt のリン酸化を顕著に抑制することを見出した (図1)。このラパマイシンによる Akt リン酸化の誘導はラパマイシ

ン自身の増殖抑制効果を減弱させるものと考えられている。これらの結果は、ラパマイシンが誘導する Akt リン酸化のコチレニンAによる阻害が、コチレニンAとラパマイシンによる相乗的増殖抑制効果と密接に関連していることを示唆する。

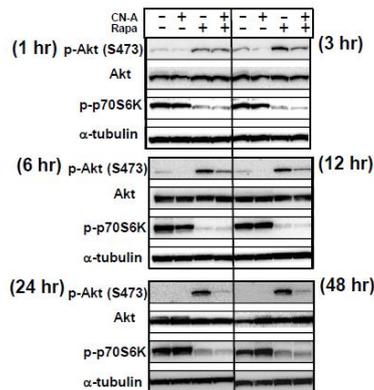


図1ラパマイシンによるAktリン酸化誘導に対するコチレニンAの抑制効果

(2) 我々はすでに、コチレニンAとラパマイシンの併用による乳癌細胞 MCF-7 の顕著な増殖抑制効果には、サイクリン G2 の誘導が密接に関係していることを明らかにしている。そこで、本研究では、サイクリン G2 遺伝子のプロモーター部分約 2kb をクローニングし、コチレニンAとラパマイシンの併用によるサイクリン G2 遺伝子誘導に必須な領域を検討した。クローニングしたサイクリン G2 遺伝子のプロモーター部分をさらに7個に分割し、サブクローニングした。これらを MCF-7 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ活性を測定することによって検討した。その結果、-331bp までのプロモーター部分がコチレニンAとラパマイシンの併用によるサイクリン G2 遺伝子発現誘導に必須な領域であることを明らかにした。これらの結果は、この併用効果の分子基盤を解明するのに重要な手がかりとなると考えられた。

(3) 我々は、最近、白血病細胞を用いてコチレニンAと様々な分化誘導剤との併用効果を検討している中で、低濃度の三酸化ヒ素 (arsenic trioxide, ATO) が前骨髄球性白血病細胞のコチレニンAによる分化を顕著に促進することを見出した。そこで、この併用処理がヒト乳癌細胞に対して有効な抗癌作用を示すか検討した。その結果、コチレニンAは ATO によるヒト乳癌細胞 (MCF-7, MDA-MB-231) 細

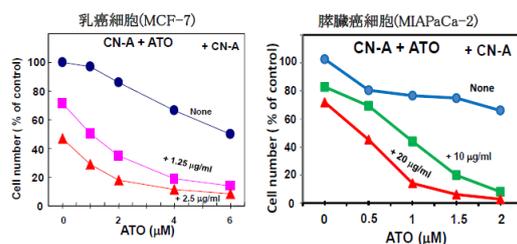


図2 コチレニンAと三酸化ヒ素による乳癌および膵臓癌細胞の増殖抑制効果

胞の増殖抑制を顕著に促進することを見出した (図2左)。さらに、コチレニンAと ATO の併用処理は足場非依存性の増殖抑制効果も示した。また、この併用処理は MCF-7 細胞において活性化カスパーゼ7を顕著に誘導し (図3)、逆に、サーバイビンの発現を抑制した (図

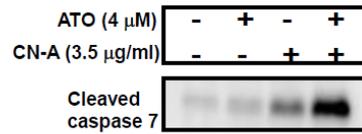


図3 コチレニンAと三酸化ヒ素による活性化カスパーゼ7の誘導

4)。これらの結果より、この併用処理は MCF-

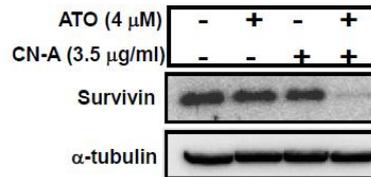


図4 コチレニンAと三酸化ヒ素によるサーバイビン発現抑制

7 細胞においてアポトーシスを誘導することを示した。さらに、コチレニンAと ATO の併用処理による増殖抑制効果は、抗酸化剤 N-acetyl-L-cystein (NAC) により、部分的に消失した (図5) ので、この顕著な併用効果には活

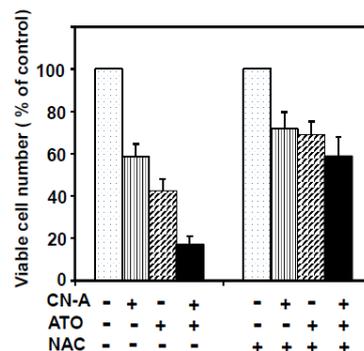


図5 コチレニンAと三酸化ヒ素による癌細胞死誘導のNACによる阻害

性化酸素 (ROS) の誘導が重要であることが示唆された。ATO の固形癌細胞に対する増殖抑制効果は既に報告されているが、その有効濃度が白血病細胞に対するよりも高く臨床応用は困難であった。我々は本研究で、臨床で応用可能な濃度の ATO でもコチレニンAを併用することで乳癌細胞の増殖を抑制できることを見出した。我々は、さらに、最近、このコチレニンAと低濃度 ATO との併用処理が膵臓癌のような難治性固形癌細胞の増殖をも効果的に抑制することを見出した (図2右)。

(4) 効果的な治療効果を得るためには癌細胞の増殖を抑制することに加えて、癌細胞の浸潤能を抑制することが非常に重要である。そこで、我々は、*in vitro*で癌細胞の浸潤能をリアルタイムで測定できる xCELLigence Real Time Cell Analyzer を用いて検討した。この測定システムにおいても、これまでのトランスウェルでの報告と同様に MCF-7 および T47D 細胞は浸潤能はなかったが、MDA-MB-231

細胞は明確な浸潤能を示した。コチレニンAまたはATOは単独でも濃度依存的にMDA-MB-231細胞の浸潤能を抑制したが、コチレニンAとATOとを併用処理するとMDA-MB-231細胞

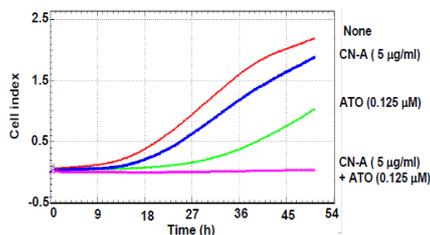


図6 コチレニンAと三酸化ヒ素による乳癌細胞(MDA-MB-231)の浸潤能阻害細胞の浸潤能を完全に抑制できることを見出した(図6)。この併用処理で用いた濃度ではアポトーシスは誘導されなかったため、この効果的な浸潤能抑制の機構にはアポトーシスは関与しないことが示唆された。

以上、本研究から、コチレニンAとラパマイシンとの併用による固形癌の増殖抑制に関連する重要な分子基盤の一部が解明された。また、コチレニンAとATOの併用処理は乳癌細胞だけでなく難治性の膵臓癌細胞の増殖を相乗的に抑制できることを見出した。この増殖抑制効果には活性化酸素誘導を介したアポトーシスが関与していることを明らかにした。さらに、このコチレニンAとATOの併用処理は癌細胞の浸潤能も効果的に抑制できることを見出した。今後さらに、これらの研究を進展させて行くことで、白血病の分化誘導剤が将来、固形癌細胞へ効率良く応用できる可能性が出てきた。

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3件)

- ① Maniwa, Y., Kasukabe, T., Kumakura, S. Vitamin K2 and cotylenin A synergistically induce monocytic differentiation and growth arrest along with the suppression of *c-MYC* expression and induction of cyclin G2 expression in human leukemia HL-60 cells. *Int. J. Oncol.*, 47, 473-480, 2015. 査読有、DOI:10.3892/ijo.2015.3028.
- ② Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Kato, N., Honma, Y., Kumakura, S. Cotylenin A and arsenic trioxide cooperatively suppressed cell proliferation and cell invasion activity in human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 46, 841-848, 2015. 査読有、DOI:10.3892/ijo.2014.2760
- ③ Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Kato, N.,

Honma, Y. Inhibition of rapamycin-induced Akt phosphorylation by cotylenin A correlates with their synergistic growth inhibition. *Int. J. Oncol.*, 42, 767-775, 2013. 査読有、DOI:10.3892/ijo.2012.1745

[学会発表] (計3件)

- ① 粕壁 隆、他2名 Cotylenin A and piperlongumine synergistically inhibit cell proliferation of several types of cancer cells. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月9日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ② 粕壁 隆、他2名 Effects of cotylenin A and phenethyl isothiocyanate on the formation of tumorspheres from pancreatic tumor cells. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日、パシフィコ横浜(横浜)
- ③ 粕壁 隆、他2名 Cotylenin A and phenethyl isothiocyanate (PEITC) synergistically induce apoptosis of human pancreatic cancer cells. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日、パシフィコ横浜(横浜)

[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

<http://www.shimane-u-education.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粕壁 隆 (KASUKABE TAKASHI)
島根大学医学部・特任教授
研究者番号：50152658

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :