

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08118

研究課題名(和文) PPAR 刺激薬による新規膵臓がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development for novel therapy for pancreatic cancer by PPARgamma agonists

研究代表者

岡村 昇 (Okamura, Noboru)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60379401

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)：ヒト膵臓がん細胞に対して、トログリタゾンの作用機序を検討したところ、クロマチンの凝集、Caspase 3活性の上昇、Bax/Bcl比の増加が認められ、Caspase依存的なアポトーシスが示唆された。またこの経路の一部はJNK経路が関与していた。さらに、トログリタゾン処置により、DNA修復酵素に関与するERCC1の発現量の低下を認められた。白金製剤との併用処置にて、相乗効果が認められたが、ERCC1に変動は認められず、他の機序による相乗効果であることが考えられた。さらに、担がんマウスモデルを用いた検討において、トログリタゾン経口投与において、有意な抗腫瘍効果も認められた。

研究成果の概要(英文)：When mechanisms of effects of troglitazone on human pancreatic cancer cell lines were investigated, troglitazone exhibited increases of chromatin condensation, caspase 3 activities and Bax/Bcl expression ratio, suggesting caspase-dependent apoptosis. Also, it was suggested that JNK pathway was involved in the apoptosis. In addition, ERCC1, a key protein in the pathway of DNA repair, were decreased by troglitazone treatment. Synergistic effects of troglitazone and a platinum drug were observed but no change of ERCC1 expression was observed. It was suggested that another mechanism could be involved in the synergistic effects. In addition, tumor growth in the xenograft model was inhibited by oral administration of troglitazone.

研究分野：医療薬学

キーワード：膵臓がん PPAR アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは、日本では5番目に死亡者数の多いがんであり、5年生存率は5%程度で、最も予後の悪いがんとして知られている。その原因として、早期発見が困難であること、化学療法が限られていることが考えられている。手術可能な症例は10%に過ぎず、手術患者平均生存期間は、2年程度である^{1,2)}。したがって、手術成績の向上のため、新たな補助化学療法が求められている。さらには、転移の認められる膵臓がんのうち、手術不能例では、平均生存率は6カ月以内であり、さらに深刻である。現在の転移性膵臓がんにおける標準療法はゲムシタピンを中心とした化学療法であるが、他の抗がん剤や放射線療法との組み合わせが模索されているものの、いずれもその効果は十分ではない²⁻⁴⁾。したがって、新規化学療法の探索が急務の課題である。そこで、新規化学療法の探索を目的として、PPAR γ に着目し、その刺激薬の抗腫瘍効果を明らかにし、その作用機序を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 膵臓がんに対するトログリタゾンの詳細な作用機序

これまで、膵臓がんに対する検討により、トログリタゾンはヒト膵臓がん細胞 MIA Paca-2 および Panc-1 細胞において、PPAR γ 非依存的な細胞増殖抑制作用を示唆するデータを得ていた。そこで、細胞死形態を明らかにする目的で、アポトーシスの関与を検討することを目的とし、クロマチンの凝集、caspase 3 活性、Bax/Bcl 発現量を検討するとともに、種々のシグナル伝達に関わる阻害剤の生存率に及ぼす影響ならびに発現変動について検討することを目的とした。

(2) 白金製剤シスプラチン、オキサリプラチンとの併用効果

近年、膵臓がん患者で、FOLFIRINOX などオキサリプラチンベースのレジメンが検討されており、その治療効果に DNA 修復に関わる ERCC1 の発現量が影響を与える報告が散見される^{5,6)}。そこで、膵臓がんを用いられるオキサリプラチンならびに白金製剤であるシスプラチンとの併用効果を検討するとともに、ERCC1 の発現変動についても検討した。

(3) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

上記(1)の検討において、トログリタゾンの膵臓がん細胞に対する抗腫瘍効果を *in vitro* で明らかにすることができたことから、その作用が *in vivo* においても抗腫瘍効果があるか否かについて、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの抗腫瘍

効果の検討

トログリタゾンの膵臓がん細胞に対する影響は、Panc-1 および MIA Paca-2 細胞を用いて検討した。細胞の生存率には、Cell Quanti-Blue 蛍光試薬を用いた。核形態は、Hoechst 33342 による染色後、蛍光顕微鏡で観察し、クロマチンの凝集を観察した。Caspase 3 活性は、Caspase 3 Assay Kit (Merck 社)を用い、caspase 3 の反応により遊離されてくる amido-4-methylcoumarin を蛍光プレートリーダーにより測定した。Bax、Bcl および細胞内シグナル伝達等に関わるタンパク発現量の検討は、Western blotting 法により検討し、Image J により定量化した。細胞内シグナル伝達経路の検討には、それぞれ特異的な阻害薬を用いて、トログリタゾンとの併用処置により、生存率が回復するか否かを検討した。

(2) 白金製剤シスプラチン、オキサリプラチンとの併用効果

トログリタゾンと白金製剤の併用効果は、MIA Paca-2 細胞を用い、シスプラチンあるいはオキサリプラチン (20 ~ 1000 μ M) にトログリタゾンを併用し、その生存率を(1)と同様の方法で検討した。併用効果は combination index (CI) 法⁷⁾で検討した。

(3) トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

Balb/c 雄性ヌードマウス背部に MIA Paca-2 細胞 (5×10^6 cells/mice) を皮下移植した。移植 14 日後を Day 0 とし、トログリタゾンを 200 mg/kg/day の投与量で 1 日 1 回、5 週間経口投与した。腫瘍の長径と短径を測定し、(長径 \times 短径²)/2 で体積を評価した。

4. 研究成果

(1) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの抗腫瘍効果の検討

トログリタゾンによる膵臓がん細胞に対する抗腫瘍効果におけるアポトーシスの関与を検討した。Fig. 1 に示すように、クロマチンの凝集が観察され、MIA Paca-2 細胞においては、ミトコンドリアを介したアポトーシス関連因子である Bax/Bcl 発現レベルの比および caspase 3 活性の上昇が認められた。したがって、MIA Paca-2 細胞においては、ミトコンドリア経路を介したカスパーゼ依存性アポトーシスの関与が大きいことが示された。一方、Panc-1 細胞においては、クロマチンの凝集は認められたものの、Bax/Bcl 発現比、caspase 3 活性に有意な変動が認められなかったことから、カスパーゼ非依存性のアポトーシスやネクローシスなどのアポトーシス以外の細胞死が惹起される可能性が考えられた。

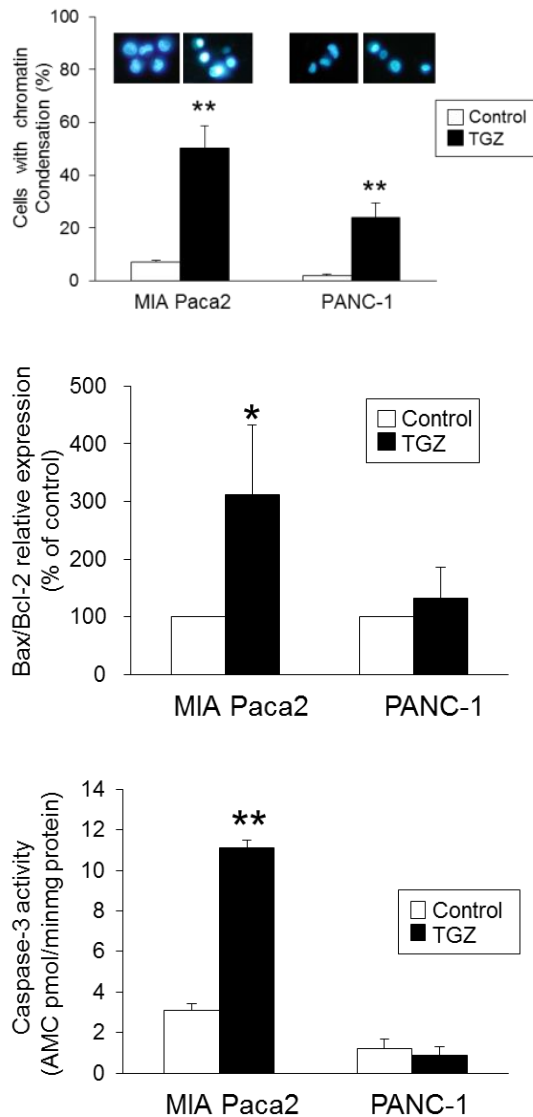


Fig. 1 Apoptosis assays for troglitazone (TGZ) in pancreatic cancer cell lines

さらに、詳細な作用機序を明らかにする目的で、細胞増殖ならびに生存シグナル経路に関連するタンパク質発現に対するトログリタゾンの影響を検討した。その結果、データには示さないが、Akt、ERK、JNK および p38 のリン酸化体の発現量は顕著に増大した。したがって、Akt および MAPK (ERK/JNK/p38) 経路が活性化されることが示唆された。また、JNK 阻害剤 SP600125 および p38 阻害剤 SB202190 をトログリタゾンと併用処置したところ、MIA Paca-2 細胞において、SP600125 併用処置において、有意な生存率の回復が認められた (Fig. 2)。したがって、MIA Paca-2 細胞においては、JNK 経路の活性化がトログリタゾンの細胞死に関与することが示唆された。

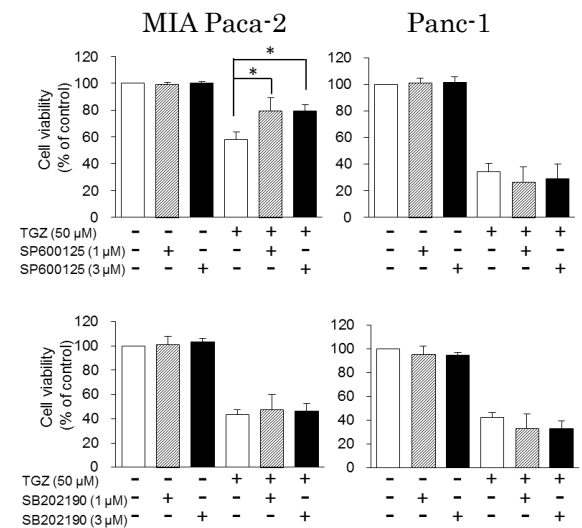


Fig. 2 Effects of a JNK inhibitor (SP600125) and a p38 inhibitor (SB202190) on antiproliferative effects of troglitazone (TGZ) in pancreatic cancer cell lines

(2) 白金製剤シスプラチン、オキサリプラチンとの併用効果

MIA Paca-2 細胞において、シスプラチンおよびオキサリプラチンとトログリタゾンの併用効果について検討した。その結果、シスプラチンとトログリタゾン 40 あるいは 60 μ M 併用において、オキサリプラチンとトログリタゾン 60 μ M 併用において、それぞれ combination index は 1 より小さくなり、相乗効果が示唆された。また、オキサリプラチンベースレジメンで治療効果に関与する ERCC1 のタンパク質発現を検討した。その結果、ERCC1 トログリタゾン単独で ERCC1 発現量は低下するものの (Fig. 3) オキサリプラチン併用処置してもその発現量は変化せず (data not shown) 相乗効果に ERCC1 発現量は影響しないことが考えられた。

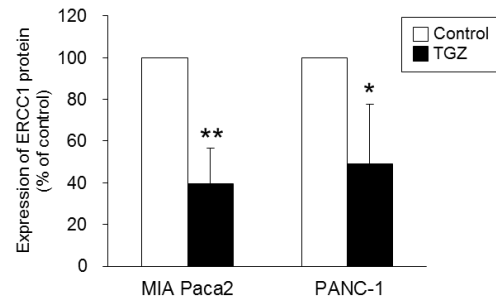


Fig. 3 Effects of troglitazone (TGZ) on ERCC1 expressions in pancreatic cancer cells

(3) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

MIA Paca-2 細胞をヌードマウスに移植後 2 週間後から、トログリタゾンの経口投与を連日 5 週間継続したところ、投与開始後 2 週目から腫瘍容積に有意な差が認められた。一方、体重には変化は認められなかった (Fig. 4)。したがって、トログリタゾンは in vivo においても抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、新たな治療薬となる可能性が示された。

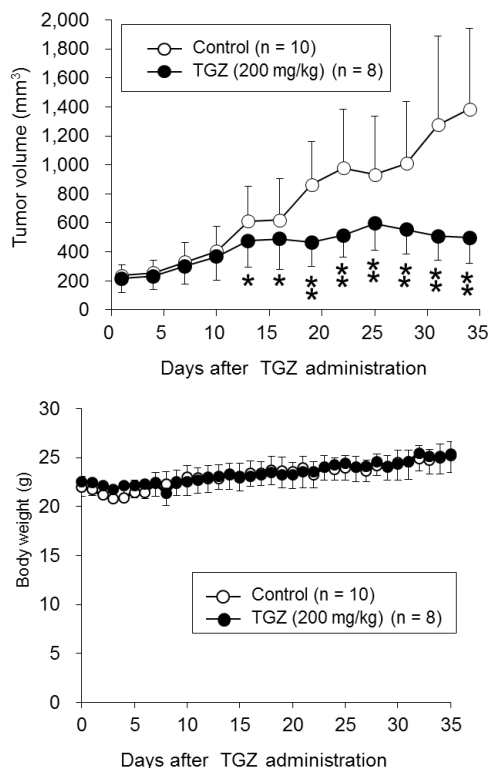


Fig. 4 In vivo antitumor effects of troglitazone (TGZ) in Balb/c mice inoculated with MIA Paca-2 cells

<引用文献>

1. Cameron *et al.*, One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg* **244**: 10-15, 2006.
2. Vincent *et al.*, Pancreatic cancer. *Lancet* **378**: 607-620, 2011.
3. Burris *et al.*, Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* **15**: 2403-2413, 1997.
4. Storniolo *et al.*, An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **85**: 1261-1268, 1999.
5. Fuereder *et al.*, Response to GEMOX plus erlotinib in pancreatic cancer is

associated with ERCC1 overexpression. *Eur J Clin Invest* **44**: 958-964, 2014.

6. Strippoli *et al.*, ERCC1 expression affects outcome in metastatic pancreatic carcinoma treated with FOLFIRINOX: A single institution analysis. *Oncotarget* **7**: 35159-35168, 2016.
7. Chou and Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55, 1984.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

In vitro and in vivo cytotoxicity of troglitazone in pancreatic cancer. Fujita M, Hasegawa A, Yamamori M, Okamura N. *J Exp Clin Cancer Res.* 36(1):91, 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

膵臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍効果(1) 前沙織、川上恵、山口京子、長谷川愛、本田陽子、山森元博、岡村昇 医療薬学フォーラム 2016 (2016) 滋賀県立芸術劇場(滋賀県・大津市)

膵臓がん細胞におけるトログリタゾンの抗腫瘍効果(2) 山口京子、川上恵、前沙織、長谷川愛、本田陽子、山森元博、岡村昇 医療薬学フォーラム 2016 (2016) 滋賀県立芸術劇場(滋賀県・大津市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岡村 昇 (OKAMURA Noboru)
武庫川女子大学・薬学部・教授
研究者番号: 60379401

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

山森 元博 (YAMAMORI Motohiro)
武庫川女子大学・薬学部・講師
研究者番号: 10444613

(4)研究協力者

なし