

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08772

研究課題名(和文) 膵癌の自然発症モデルマウスを用いた創薬開発

研究課題名(英文) Development of anti-cancer drugs using pancreatic cancer mouse model

研究代表者

佐野 誠 (SANO, Makoto)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：70339323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、多様なチロシンキナーゼ阻害活性を有するインディルビンとその誘導体が浸潤性膵管癌に対してp-CDK1/Cyclin B1抑制を介して抗腫瘍効果を発揮すること、また同コンパウンドがRAF/ERK、SAPK/JNK、AKT経路のリン酸化を阻害し、MMPの発現を低下させることで腫瘍浸潤能を抑制させることをin vitroならびにin vivoにて新たに明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

浸潤性膵管癌は未だに難治性の悪性腫瘍の一つであり、新たな治療薬の開発が望まれている。当該研究においては、副作用の認められていないインディルビンとその誘導体が浸潤性膵管癌に対して抗腫瘍効果を示すことをin vitroの系とマウスモデル(特に自然発症モデル)を用いたin vivoの系で明らかとしたことが学術的に高く評価された。現在、膵癌マウスに対する水溶化したコンパウンドの経口投与で良好な結果を得ており、将来的に飲み薬としての臨床応用が可能となれば社会的にも意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive cancer with high invasive and metastatic potential. In this study, we found that indirubin and the derivatives inhibited tumor proliferation accompanied with low levels of nuclear phosphorylated cyclin-dependent kinase (p-CDK) and cyclin B1 in vitro and in vivo. Furthermore, these compounds inhibited the migration/invasive activities of PDAC by down-regulation of matrix metalloproteinase (MMP) in vitro and in vivo via blocking the RAF/ERK, AKT and SAPK/JNK pathways.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：膵癌 膵癌モデルマウス KPCマウス 創薬開発 インディルビン誘導体 細胞周期 浸潤 シグナル経路

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵管癌は膵癌全体の90%以上を占め、未だに早期診断・治療が困難な悪性腫瘍である。診断時にすでに浸潤転移していることが多く、そのような症例に対してはゲムシタピン(GEM)とナブパクリタキセルの併用療法が効果的であることが示唆されている。しかしながら、化学療法剤とは作用メカニズムが異なり、抗癌剤耐性に関わる間質形成をも包括的に標的とした新薬の開発が必要と考える。インディルピンは古くから藍染や漢方薬に含まれる成分の一つとして知られ、海外では血液腫瘍(白血病)への治療薬としても使用されているが、膵癌への効果は知られていない。我々はインディルピンとその誘導体のライブラリーのなかから浸潤性膵管癌細胞株のスフェロイド形成を有意に阻害するインディルピン誘導体のスクリーニングに成功した。そこで、インディルピンとその誘導体の抗腫瘍効果ならびにその詳細な分子メカニズムの解明、さらに膵癌の自然発症マウスモデルでの抗腫瘍効果を解析した。

## 2. 研究の目的

インディルピンとその誘導体の膵癌細胞に対する詳細な分子メカニズム解析と膵癌の自然発症マウスモデルに対する抗腫瘍効果の判定を行うことを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 膵癌の移植モデルに対するインディルピンとその誘導体の抗腫瘍効果

ヒト膵癌細胞株各種をBALB/cヌードマウス(6週齢)の皮下へ移植し、腫瘍形成を確認した後、インディルピンとその誘導体(40 mg/kg/回、毎週2回)を腹腔内投与した。膵癌マウスから樹立した細胞株に関しては、B57BL/6マウス(6週齢)の皮下へ同様に移植し、インディルピンとその誘導体を腹腔内投与した。経時的に移植腫瘍の大きさを測定し、エンドポイント時には腫瘍の重量を測定した。ホルマリン固定後に組織切片を作製し、薬剤投与に伴う影響を病理組織学的に検討した。また、腋窩リンパ節、鼠径リンパ節、他臓器への転移への影響も比較検討した。

### (2) 膵癌の自然発症モデル(KPCマウス)に対するインディルピンとその誘導体の抗腫瘍効果

KPCマウスに対して、インディルピンとその誘導体を生後3ヶ月齢から毎週2回、40 mg/kg/回を腹腔内投与した。生存期間、腫瘍のフェノタイプ、浸潤・転移の有無、非腫瘍部における前癌病変(PanINs)の進展の程度を病理組織学的に検討した。

### (3) 膵癌細胞株を用いたインディルピンとその誘導体の抗腫瘍効果の解析

KPCマウスから樹立したマウス膵癌細胞株ならびにヒト膵癌細胞株の各種を用いて、インディルピンとその誘導体の増殖や遊走浸潤への影響を*in vitro*で比較検討した。各薬剤のアポトーシス誘導能に関しては、フローサイトメーターを用いたAnnexin V propidium iodide (PI) double-staining analysisにより検討した。また一方で、リン酸化抗体アレイを用いてインディルピンとその誘導体の標的分子を半網羅的に解析し、主な標的分子の蛋白レベルをウェスタンブロットング法により解析した。

## 4. 研究成果

膵癌の移植モデルに対してインディルピン誘導体のindirubin 3'-oxime (Indox)と5-methoxyindirubin 3'-oxime (5MeOIndox)がp-CDK1/Cyclin B1を抑制し、G2/Mアレストによる抗腫瘍効果を示すことを明らかにした(文献1)。また、ヒトならびにマウス膵癌細胞株において、Indoxと5MeOIndoxがアポトーシスと非アポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を示すこと

も明らかにした(文献1)。一方、コントロール群と薬剤投与群の両群でリンパ節と他臓器への転移は認められず、この皮下移植モデルにおいては転移への影響を検討することはできなかった。

膵癌を自然発症する遺伝子改変マウス(KPCマウス)においては、Indox投与群がコントロール群に比べてp-CDK1/Cyclin B1を低下させ癌細胞の増殖を有意に抑制すること、また癌細胞の脈管侵襲やリンパ節転移・遠隔転移を抑制し、生存期間を有意に延長することを明らかにした(文献2)。しかしながら、5MeOIndox投与群に関しては、明らかな腫瘍抑制効果を認めたものの、長期の反復腹腔内投与による腹膜癒着が問題となり、薬剤の水溶化が課題として残された。

KPCマウス由来の膵癌細胞株を用いて*in vitro*で遊走・浸潤アッセイを行いIndoxが膵癌細胞株の遊走・浸潤を有意に抑制すること、RAF/ERK、SAPK/JNK、AKT経路のリン酸化を阻害することで、MMPの発現を抑制し腫瘍浸潤を低下させることを見出した(文献2)。5MeOIndoxの*in vitro*の実験系に関するデータは現在、論文として投稿準備中である。

近年、インディルビン誘導体の水溶化に成功し、膵癌マウスへの経口投与が可能となった。マウス膵癌細胞株の健常マウスへの移植モデル(アログラフトモデル)と自然発症モデルに対して同インディルビン誘導体を経口投与し、有意な抗腫瘍効果の結果を得ている。*in vivo*と*in vitro*の実験結果を合わせて論文投稿の準備を進めている。

#### <引用文献>

- 1) Sano M \*, Ichimaru Y, Kurita M, Hayashi E, Homma T, Saito H, Masuda S, Nemoto N, Hemmi A, Suzuki T, Miyairi S\*, Hao H: Induction of cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime in vitro and in vivo, *Cancer Letters*, 397: 72-82, 2017. 査読有
- 2) Ichimaru Y\*, Sano M\*, Kajiwara I, Tobe T, Yoshioka H, Hayashi K, Ijichi H, Miyairi S\*: Indirubin 3'-oxime inhibits migration, invasion, and metastasis in vivo in mice bearing spontaneously occurring pancreatic cancer via blocking the RAF/ERK, AKT and SAPK/JNK pathways. *Translational Oncology*, 2019; 12:1574-1582. 査読有

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ichimaru Y, Sano M, Kajiwara I, Tobe T, Yoshioka H, Hayashi K, Ijichi H, Miyairi S	4. 巻 12
2. 論文標題 Indirubin 3'-Oxime Inhibits Migration, Invasion, and Metastasis InVivo in Mice Bearing Spontaneously Occurring Pancreatic Cancer via Blocking the RAF/ERK, AKT, and SAPK/JNK Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 1574-1582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2019.08.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sano M, Ichimaru Y, Kurita M, Hayashi E, Homma T, Saito H, Masuda S, Nemoto N, Hemmi A, Suzuki T, Miyairi S, Hao H	4. 巻 397
2. 論文標題 Induction of cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime in vitro and in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 72-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.03.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimaru Y, Fujii T, Saito H, Sano M, Uchiyama T, Miyairi S	4. 巻 25
2. 論文標題 5-Bromoindirubin 3'-(0-oxiran-2-ylmethyl)oxime: A long-acting anticancer agent and a suicide inhibitor for epoxide hydrolase.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem	6. 最初と最後の頁 4665-4676
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2017.07.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 市丸嘉, 佐野 誠, 吉岡弘毅, 林一彦, 宮入伸一
2. 発表標題 浸潤性膵管癌の自然発症モデルマウスに対するインディルビン誘導体の治療効果の検証
3. 学会等名 第64回日本薬学会東海支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市丸嘉, 吉岡弘毅, 加藤絨一, 佐野 誠, 林一彦, 宮入伸一
2. 発表標題 インディルピンの可溶化: Epox/Indへの応用
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野 誠, 市丸 嘉, 林 恵美子, 齋藤弘明, 本間 琢, 廣谷ゆかり, 根本則道, 増田しのぶ, 逸見明博, 宮入伸一, 羽尾裕之
2. 発表標題 肺癌移植モデルにおけるインディルピン誘導体の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村 仁衣菜, 小島 瑠実子, 近藤 綾香, 林 一彦, 宮入 伸一, 市丸 嘉
2. 発表標題 メトキシ置換インディルピン誘導体の抗がん活性再評価
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島 瑠実子, 近藤 綾香, 中村 仁衣菜, 林 一彦, 宮入 伸一, 市丸 嘉
2. 発表標題 新規インディルピン誘導体の構造活性相関: 抗がん活性と水溶性
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	宮入 伸一  (MIYAIRI Shinichi)  (50209855)	日本大学・薬学部・教授   (32665)	
研究 分担者	市丸 嘉  (ICHIMARU Yoshimi)  (80802917)	金城学院大学・薬学部・助教   (33905)	
研究 協力者	伊地知 秀明  (IJICHI Hideaki)  (70463841)	東京大学・医学部・講師   (12601)	
研究 協力者	齋藤 弘明  (SAITO Hideaki)  (30385976)	日本大学・薬学部・助教   (32665)	