

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591450  
 研究課題名（和文） 新規分化誘導剤による固形癌細胞の増殖抑制の分子基盤の解明と臨床応用  
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of solid tumor growth inhibition by a new differentiation inducer  
 研究代表者  
 粕壁 隆（KASUKABE TAKASHI）  
 埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・主幹  
 研究者番号：50152658

研究成果の概要：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発揮する可能性があること、およびその分子的基盤を明らかにし、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。その結果、我々が新たに見出した分化誘導剤 cotylenin A は rapamycin と相乗的にヒト乳癌細胞の増殖を顕著に抑制することを見出した。また、この作用機序には、サイクリン G2 が関与していることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：Cotylenin A, Rapamycin, 分化誘導剤、乳癌細胞、増殖抑制、G1 arrest、cDNA microarray、Cyclin G2

## 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、BRM (Biological response modifier) および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 cotylenin 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、cotylenin 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 cotylenin 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、最近、分化誘導剤 cotylenin A が mTOR (mammalian target of rapamycin) の阻害剤であり、分化誘導剤でもある rapamycin 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、cotylenin A と rapamycin 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。しかし、この併用処理効果の作用機序は殆ど解明されていない。

## 2 . 研究の目的

本研究は新規分化誘導剤 cotylenin A が固形癌細胞への増殖抑制効果を発揮する際の分子的基盤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、rapamycin のような mTOR 阻害剤は癌に特異的に有効な抗癌剤の候補となっていて、現在、乳癌と腎癌で第3相の臨床試験中である。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細胞として cotylenin A との併用効果を一掃した結果、cotylenin A と rapamycin との併用が最も顕著であることを見出した。この増殖抑制効果は apoptosis 誘導によるものではなく G1 期停止の誘導によるものである。しかし、この G1 期停止の誘導による増殖抑制は、rapamycin 単独処理でこれまでに報告されている cyclin D および c-myc の発現抑制によるものではないことから、新しい作用機序によるものと示唆された。本研究では cotylenin A と rapamycin と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。

## 3 . 研究の方法

(1) 細胞増殖は MTT assay または trypan blue dye exclusion test で行い、細胞周期は Flow cytometry で測定した。cDNA microarray 解析は 16,000 遺伝子を搭載した human expression chip (タカラバイオ) を用いた。遺伝子発現は RT-PCR で、リン酸化蛋白質は Western blotting で測定した。

(2) Cyclin G2 誘導可能な MCF-7 細胞の樹立。Tet-On vector (Clontech) を MCF-7 細胞へ transfect し、Tet-On MCF-7 細胞を樹立した。次に、cotylenin A と rapamycin を処理した MCF-7 細胞から、cyclin G2 cDNA

を調整し、pTRE2hyg 発現 vector (Clontech) の *SaI* と *EcoRV* 切断部位に組み込んで、plasmid pTRE2hyg-CG2 を作った。この pTRE2hyg-CG2 plasmid DNA を MCF-7 細胞へ transfect し、Doxycyclin で cyclin G2 が誘導可能な MCF-7 細胞の樹立した。

(3) Cyclin G2 siRNA を用いた cyclin G2 発現抑制効果。Cyclin G2 siRNA は siRNA Design Support System (タカラバイオ) を用いて作製した。

#### 4. 研究成果

(1) 我々は、最近、乳癌細胞 MCF-7 を固形癌細胞の実験モデル細胞として cotylenin A との併用効果をスクリーニングし、cotylenin A と

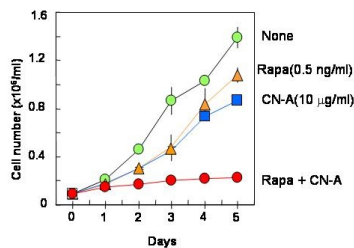


図 1 Cotylenin A と rapamycin による MCF-7 細胞の増殖抑制効果

rapamycin との併用が最も顕著であることを見出した(図 1)。また、これらの併用処理は MCF-7 細胞の E-cadherin や cell senescence に関連した  $\beta$ -galactosidase 活性も誘導した。しかし、この併用処理効果の作用機序は殆ど解明されていない。そこで、まず、cDNA microarray を用いて、cotylenin A や rapamycin の単独処理および、cotylenin A と rapamycin の併用処理した MCF-7 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。cotylenin A と rapamycin の 12 時間併用処理で、41 遺伝子の発現が 3 倍以上上昇していた。一方、cotylenin A または rapamycin 単独処理では、それぞれ 8 個と 1 個の遺伝子のみだった。中でも、TGFBI(TGF- $\beta$ -induced 68KDa protein)、

BIK(BCL2 interacting killer)、cyclin G2、および GRB7(growth factor receptor-bound 7)の遺伝子発現は併用処理で 5 倍以上上昇していた。Cyclin G2 は他のサイクリンとは異なり細胞増殖に対して負に作用していることが示唆されていたが、報告は少なかった。そこで、この併用効果と cyclin G2 発現との関係をさらに詳細に検討した。

(2) Cotylenin A と rapamycin の併用処理による cyclin G2 発現誘導(図 2)。Cotylenin A または rapamycin 単独でも、処理後 3 時間から有意な cyclin G2 の発現が見られるが、併用処理

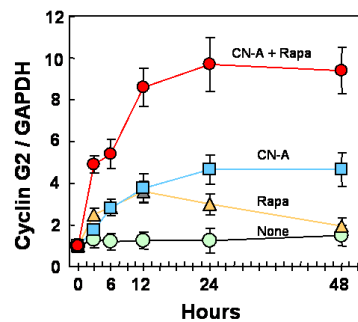


図 2 Cotylenin A と rapamycin による MCF-7 細胞の cyclin G2 発現誘導

ではその誘導はさらに顕著であり、かつ、長時間持続していることを明らかにした。これら併用処理によって相乗的に増殖が抑制された肺癌細胞 (A549) や白血病細胞 (NB-4) でも同様な cyclin G2 の発現の誘導が見られた。

(3) 細胞周期停止と cyclin G2 発現誘導との関係(図 3)。Cotylenin A と rapamycin の併用

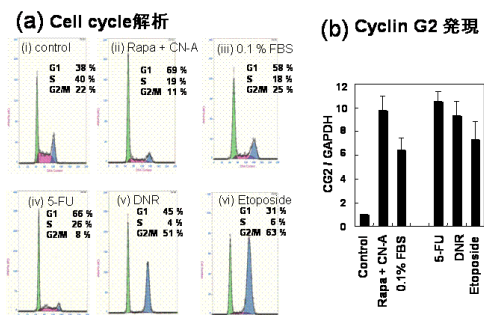


図 3 Cell cycle arrest 誘導と cyclin G2 発現誘導との関係

処理は cyclin G2 発現誘導とともに細胞周期を G1 期で停止させた。低濃度の血清または 5-FU

処理は細胞を G1 期で停止させ、cyclin G2 の発現も誘導した。しかし、Daunomycin や etoposide で G2/M 期で停止させた場合にも cyclin G2 の発現の誘導が見られた。したがって、cyclin G2 の発現の誘導はある特定の細胞周期での停止ではなく、どの周期での停止でも起こることが判明した。

(4) Cyclin G2 強制発現による MCF-7 乳癌細胞の増殖阻害の誘導(図 4)。Doxycyclin (Dox) で cyclin G2 遺伝子発現が誘導可能な MCF-7 (MCF7/CG2)細胞を樹立し、cyclin G2 遺伝子発

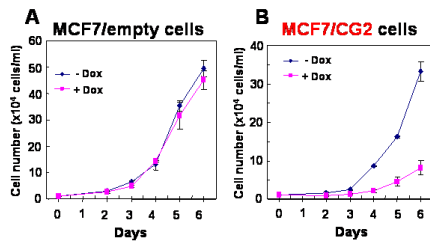


図 4 Cyclin G2発現誘導によるMCF7細胞の増殖抑制

現誘導と増殖抑制との関係を検討した。その結果、Dox 存在下で cyclin G2 が強制発現された細胞は処理後4日目から顕著に増殖が抑制されたので、cyclin G2 発現は MCF-7 乳癌細胞において増殖の停止を誘導することが判った。

(5) cotylenin A と rapamycin の併用処理による MCF-7 細胞の増殖抑制における cyclin G2 の役割(図 5)。Cyclin G2 に対する siRNA を作

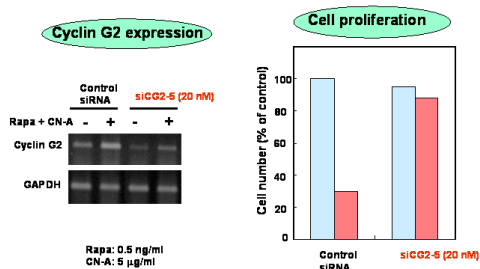


図 5 Cotylenin AとrapamycinによるMCF-7細胞の増殖抑制に対するcyclin G2 siRNAの効果

製し、MCF-7 細胞にトランスフェクトし、cyclin G2

の発現が抑制された細胞では、cotylenin A と rapamycin の併用処理による MCF-7 細胞の増殖抑制効果の殆どがキャンセルされた。これらの結果から、cotylenin A と rapamycin の併用処理による MCF-7 細胞の増殖抑制は cyclin G2 を介して起きていることが明らかになった。

(6) Rapamycin で誘導される Akt リン酸化の cotylenin A による阻害効果(図 6)。Rapamycin は mTOR の signaling を特異的に抑制する。しかし、この mTOR signaling では通常

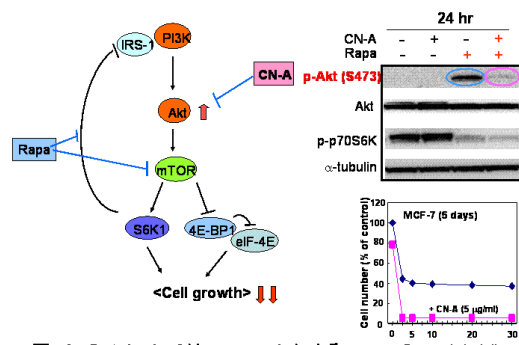


図 6 Cotylenin AはrapamycinによるAktの feedback activationを抑制する

feedback inhibition による Akt の活性化の抑制を伴っているが、rapamycin はこの feedback inhibition をも解除し、結果的に Akt を活性化させることが報告された。この活性化 Akt は rapamycin の増殖抑制効果を減弱させることが示唆されている。我々は最近、cotylenin A が rapamycin 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。これらの結果から、rapamycin による Akt の活性化の誘導に対する cotylenin A による阻害が、cotylenin A と rapamycin による相乗的増殖抑制効果に参与しているものと考えられた。

我々は本研究において、新規の白血病分化誘導剤である cotylenin A が新しい抗癌剤として期待される rapamycin と併用処理することにより、乳癌や肺癌由来の固形癌細胞の増殖を顕著に抑制することができることを世界にさきがけて見出した。これら併用による

増殖抑制効果はアポトーシスではなく、細胞周期の G1 停止によるものであることを明らかにした。さらに、この相乗効果には cyclin G2 発現誘導が関連していることを明らかにした。また、最近、cotylenin A が rapamycin が誘導する Akt の活性化を阻害することを見出した。以上、本研究から、cotylenin A と rapamycin との併用による固形癌細胞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。今後さらに、これらの研究を進展させて行くことにより、白血病の分化誘導剤が将来、固形癌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2件)

Kasukabe, T., Okabe-Kado, J., Honma, Y. Cotylenin A, a new differentiation inducer, and rapamycin cooperatively inhibit growth of cancer cells through induction of cyclin G2. Cancer Sci., 99, 1693-1698, 2008. 査読有り

Matunawa, M., Ishii, Y., Kasukabe, T., Tomoyasu, S., Ota, H., Honma, Y. Cotylenin A-induced differentiation is independent of the transforming growth factor- $\beta$  signaling system in human myeloid leukemia HL-60 cells. Leukemia & Lymphoma, 47, 733-740, 2006. 査読有り

[学会発表](計4件)

粕壁 隆, 他 2 名 Inhibition of rapamycin-induced Akt phosphorylation by cotylenin A correlated their growth inhibition of cancer cells. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋

粕壁 隆, 他 2 名 Cotylenin A, a differentiation-inducing agent, inhibits rapamycin-induced feedback activation of

Akt signaling. 第 66 回日本癌学会学術総会、

2007 年 10 月 4 日、横浜

粕壁 隆, 他 2 名 分化誘導剤 cotylenin A と rapamycin のヒト乳癌細胞に対する増殖抑制と cyclin G2 発現誘導。第 65 回日本癌学会学術総会、2006 年 9 月 30 日、横浜

粕壁 隆, 他 2 名 分化誘導剤 cotylenin A と rapamycin によるヒト乳癌細胞の増殖抑制と cyclin G2 発現誘導。第 10 回がん分子標的治療研究会総会、2006 年 6 月 16 日、東京

[図書](計1件)

Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Kaneko, Y., NOVA Publishers, Focus on Neuroblastoma Research, 2007, 85-97.

[その他]

ホームページ

<http://www.pref.saitama.lg.jp/A80/BA02/top.htm>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

粕壁 隆 (KASUKABE TAKASHI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・

主幹

研究者番号 50152658

(2)研究分担者

(3)連携研究者