

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09115

研究課題名(和文)天然有機化合物デカルシンを用いた新規骨肉腫治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapeutic agent for osteosarcoma using the natural organic compound decursin

研究代表者

白井 寿治 (Shirai, Toshiharu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20397186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は小児に好発する骨原発性悪性腫瘍である。約40年間新規治療薬は誕生しておらず、現在の治療法では複数の抗がん剤を大量に投与するため、副作用も重篤となる。今回、我々はデカルシンを用いて既存の薬剤との併用による増感効果を検討し、なおかつ副作用を軽減できないかを検証した。デカルシンは細胞周期に作用することで細胞増殖を抑制し、濃度および時間依存性にアポトーシスを誘導した。マウスを用いた実験でもデカルシンは腫瘍体積の増加を抑制し、シスプラチンとの併用ではさらに抗腫瘍効果を示した。シスプラチンによる腎機能低下や腎上皮細胞障害は、デカルシンを併用することで改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

したがって、デクリシンは骨肉腫細胞に対して抗腫瘍効果があり、シスプラチンと併用すると相乗効果があり、腎保護効果があります。したがって、Decursin は骨肉腫の治療薬として有望です。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma is a primary bone malignancies that predominates in children. No new therapeutic drug has been born for about 40 years, and the current treatment method administers a large amount of multiple anticancer drugs, resulting in serious side effects. This time, we examined the sensitizing effect of using decursin in combination with existing drugs, and examined whether side effects could be reduced.

Decursin acted on the cell cycle to suppress cell proliferation and induce apoptosis in a concentration and time-dependent manner. In experiments using mice, decursin suppressed the increase in tumor volume, and when used in combination with cisplatin, it showed a further antitumor effect. Cisplatin-induced renal dysfunction and renal epithelial cell damage were ameliorated by the combined use of decursin.

研究分野：骨・軟部腫瘍

キーワード：デカルシン 骨肉腫 シスプラチン アポトーシス 細胞周期 腎保護

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は全悪性腫瘍の中で約 0.2%と希少がんに属し、その発生頻度は 100 万人あたり年間 2-3 人と報告されている。1970 年代までは患肢切断術が唯一の治療法であり、5 年生存率は 10-20%であった。1980 年代にはドキソルビシンやシスプラチンなどの複数の抗がん剤が登場し、それらを併用した化学療法により、5 年生存率は 60-70%まで改善した。さらに、腫瘍の縮小による患肢温存も可能となった。現在では、化学療法と手術療法を併せた集学的治療が標準的治療となっている。しかしながら、この 40 年間、骨肉腫に対する新規抗がん剤は登場していない。原因として、骨肉腫の症例が他の癌と比較して著明に少ないことや、新規薬剤開発、臨床応用には莫大な時間、費用および労力がかかることなどが挙げられる。

骨肉腫治療における既存の化学療法の問題点は多量かつ長期間薬剤を投与することにより心筋障害や腎障害、骨髄抑制など重篤な副作用が生じることである。シスプラチンは多くの悪性腫瘍の化学療法で用いられる抗がん剤の 1 つであり、骨肉腫においても第一選択とされている標準治療薬の 1 つである。しかし、高用量の投与は骨髄抑制、腎機能障害、末梢神経障害をきたす。

近年、軟部肉腫に対しては天然化合物由来の抗がん剤が注目を集めている。Angelica gigas Nakai (AGN)も天然植物の 1 つで漢方薬として使用されている。AGN から最も抽出されるデカルシンは、抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、そして抗腫瘍効果を示すことが報告されている。その抗酸化作用により、薬剤性の神経毒性および腎機能障害に対する緩和作用が報告されている。しかしながら、デカルシンの骨肉腫に対する効果についての報告はまだない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は骨肉腫に対するデカルシンの作用を評価することである。さらに、シスプラチンにデカルシンを併用することで、デカルシンの増感効果の有無を評価するとともに、シスプラチンによる腎障害に対する緩和作用を検証することである。

## 3. 研究の方法

*In vitro* では、ヒト骨肉腫細胞 (143B、MG63) およびヒト骨芽細胞 (NHOst) を用いて、デカルシンの細胞増殖抑制効果を RealTime-Glo MT Cell Viability assay、アポトーシス誘導効果を AnnexinV-PI assay で評価した。シスプラチンとの併用では Combination Index を算定し、併用効果を評価した。*In vivo* では 143B の皮下移植マウスを作製し、デカルシン単剤、シスプラチン単剤、そして 2 剤併用での抗腫瘍効果、マウスの体重への影響を比較検証した。さらに、血液検査、腎臓の重量測定および組織標本を作製して、腎障害に対するデカルシンの作用を解析した。

#### 4. 研究成果

デカルシンはヒト骨肉腫細胞に対して濃度依存性に cell viability を抑制した。正常骨芽細胞において、100  $\mu\text{M}$  でのみ cell viability の低下を認め、それ以外の濃度ではコントロールと比較して同等であった(図1)。

ヒト骨肉腫細胞にデカルシンを投与することで早期・後期アポトーシスの細胞数が

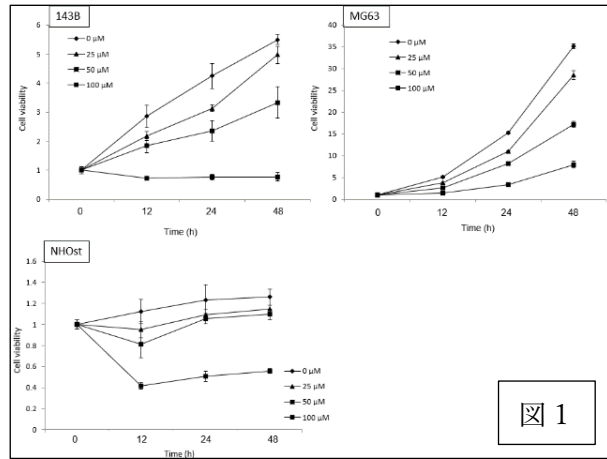


図 1

濃度・時間依存性にコントロールと比較して増加した。アポトーシス経路の下流に位置する caspase-3 は、デカルシン投与 24 時間ではコントロールと比較して有意差を認めなかったが、投与 48 時間では濃度依存性に caspase-3 の活性化を認めた。さらに、アポトーシス関連タンパクである Bax および Bcl-2 のうち、アポトーシス促進因子である Bax の発現を濃度依存性に増加させた。アポトーシス抑制因子である Bcl2 の発現は変わらなかったが、Bax / Bcl2 は増加した(図2)。

薬物併用効果の評価指標の一つである Combination Index(CI)を算出すると、2 剤を投与後 48 時間ではいずれの骨肉腫細胞株で  $CI < 1$  と相乗的であったことから増感効果を有した。アポトーシスを起こした細胞数もシスプラチンと併用することで増加した(図3)。

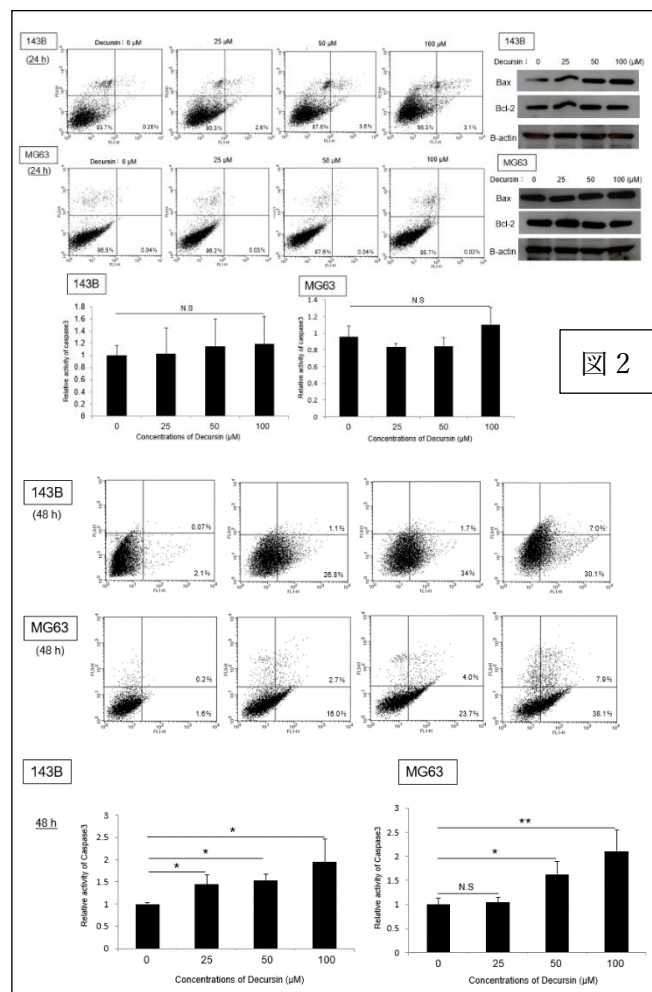


図 2

*In vivo*でも、デカルシンはシスプラチンとの併用で増感効果を示した。シスプラチンにデカルシンを併用することで抗腫瘍効果の増大を認めた。また、設定したシスプラチンの濃度から減量した濃度でもデカルシンを併用することで、元のシスプラチン単剤と同程度の抗腫瘍効果が得られた。マウスの体重変化は設定したシスプラチンおよびデカルシン、2 剤併用のいずれもコントロールと比較して有意差を認めなかった(図4)。マウスの動脈からの採血では、腎機能(BUN、Cre)においてコントロール群とデカルシンでは正常範囲内であった。Cisplatin は軽度 BUN および Cre の値が高く、2 剤併用では正常範囲内であった。最終観察時に摘出した腎臓の重量はシ

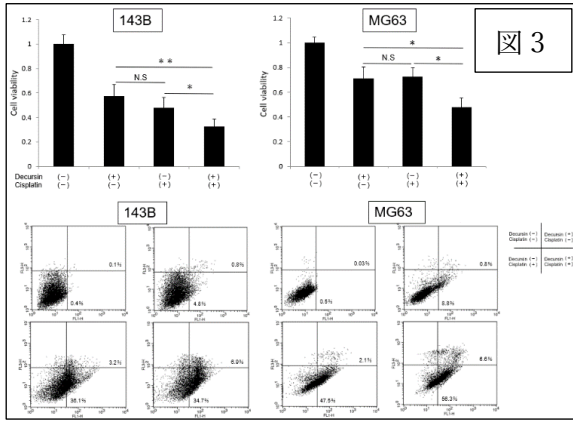
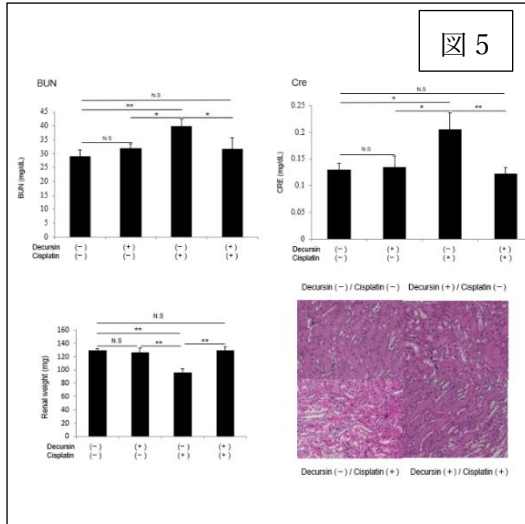
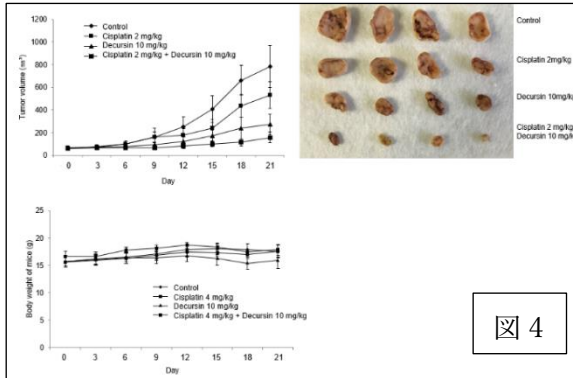


図 3  
 スプラチンでは減少し委縮していた。腎組織を HE 染色したところ、シスプラチンのみで近位尿細管における尿細管上皮細胞の泡沫様変性を認めた。2 剤併用での上皮細胞の変性所見は正常組織と同程度であった(図 5)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                        | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 土田 真嗣<br><br>(Tsuchida Shinji)<br><br>(10719834) | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教<br><br><br>(24303) |    |
| 研究分担者 | 寺内 竜<br><br>(Terauchi Ryu)<br><br>(20575154)     | 京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師<br><br><br>(24303) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|         |         |