

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790383

研究課題名（和文） 新規クルクミン誘導体による新しい抗癌剤・遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Search for novel cancer therapy by anticancer drug and gene therapy combined with new curcumin analogue.

研究代表者：角道 祐一（KAKUDO YUICHI）

東北大学・病院・助教

研究者番号：10396484

研究成果の概要：新規クルクミン誘導体が様々ながん細胞に対して増殖抑制効果を持つことが、培養細胞を用いた実験で明らかになった。この誘導体に抗癌剤を組み合わせた場合のがん細胞増殖抑制効果を検討した。また、がん抑制遺伝子 *TP53* ステータスによる増殖抑制効果についても検討した。その結果、クルクミン誘導体単独よりも抗癌剤を組み合わせた場合でより強い増殖抑制効果が認められ、この効果は相加的な効果であった。各種がん細胞の *TP53* ステータスによる細胞増殖抑制効果の違いは見出せなかった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	300,000	2,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：植物由来物質

1. 研究開始当初の背景

がんの罹患率及び死亡率は増加傾向であり、がん治療法の確立は急務である。現在のがん治療では、抗癌剤、放射線、外科手術が治療の柱であり、特に、抗癌剤は全身に転移した手術不能進行癌に対する最有力の治療法である。しかし、抗癌剤治療によって延命効果を得る代償として強い副作用が随伴するため、治療期間の QOL は必ずしも良好ではない。抗がん効果の増強とともに副作用の軽減をもたらす治療法の開発が重要となっている。

2. 研究の目的

（1）培養細胞を用いて、抗癌剤に新規クルクミン誘導体を併用することにより細胞増殖抑制効果が増強されるか *in vitro* で検討する。

（2）培養細胞を用いて、新規クルクミン誘導体との併用により抗癌剤投与量をどの程度まで減量できるか *in vitro* で検討する。

（3）新規クルクミン誘導体が、*TP53* のステータスにより細胞増殖抑制効果に違いを

生じるか、また野生型 p53 の導入によりその効果が増強されるか *in vitro* で検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規クルクミン誘導体および抗癌剤の各種がん細胞への投与量の決定

新規クルクミン誘導体および抗癌剤を段階的に希釈し、単独及び併用時の最適投与量を決定する。実験の煩雑性を回避するため、まず大腸癌細胞株 HCT116p53+/+を用いて検討し、その後さらに HCT116p53-/-および複数の各種がん細胞株でも同様の実験を行い検討する。

(2) 上記(1)の結果をもとに、TP53 のステータスと、新規クルクミン誘導体および抗癌剤の抗腫瘍効果の強弱に相関性について検討する。

4. 研究成果

われわれが得た新規クルクミン誘導体、GO-Y030 は大腸癌細胞株 DLD-1 に対してクルクミンの約 30 倍以上の増殖抑制活性を有する。この GO-Y030 および既存の抗癌剤を用いて TP53 のステータスの異なる複数の癌細胞株に投与し、IC50 値を算出して TP53 ステータスと細胞増殖抑制効果との相関性について検討した。

【成果 1】GO-Y030 の IC50 値は、大腸癌細胞株 DLD-1(p53mut) に対し 0.25 μ M、HCT116(p53+/+) に対し 0.25 μ M、HCT116(p53-/-) に対し 0.25 μ M といずれの cell line でも同等であった。3 種類の大腸癌細胞株において TP53 のステータスと IC50 値に関連性は示唆されなかった。また、骨肉腫細胞株でも SaOS2(p53 null) に対し 0.20 μ M、U2OS(p53 wild type) に対し 0.20 μ M と、TP53 のステータスと IC50 値に関連性は示されなかった。

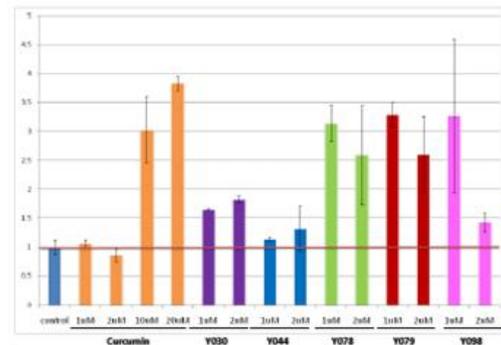
【成果 2】5-FU の IC50 値は、DLD-1 に対し 2.0 μ M、HCT116(p53+/+) に対し 2.5 μ M、HCT116(p53-/-) に対し 2.5 μ M といずれの cell line でもほぼ近似した値であり、TP53 のステータスと IC50 値に明らかな関連性は示唆されなかった。また、SaOS2 では 10 μ M、U2OS では 10 μ M と、細胞増殖抑制効果は大腸癌細胞株に対する値と比べ弱いものであった。

【成果 3】

クルクミン誘導体 GO-Y030 の大腸癌細胞株 HCT116(p53+/+) に対する IC50 値: 0.25 μ M をもとに optimize し、抗癌剤(5-FU, Paclitaxel, Gemcitabine) 併用時の相加効果および相乗効果について検討した。なお、GO-Y030 以外の複数の新規クルクミン誘導体を含め M30 モ

ノクローナル抗体を用いたアポトーシス検出 ELISA 解析も行ったが (Fig.1)、やはり GO-Y030 は HCT116(p53+/+) 細胞に対し、強いアポトーシス誘導能を示し強い抗腫瘍活性を有することが予想された。

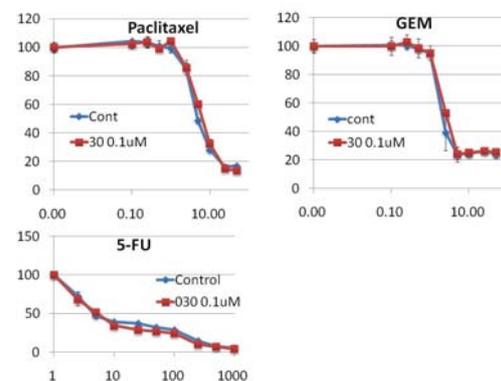
Fig.1



【成果 4】

GO-Y030 を各濃度下で抗癌剤と併用した場合、抗癌剤の濃度依存的な細胞増殖抑制効果は認められたものの、明らかな増感作用を観察することは出来なかった。GO-Y030 : 0.1 μ M 処理下で各種抗癌剤を併用した場合の IC50 値は Paclitaxel で 6nM, Gemcitabine で 2nM、5-FU で 1nM 以下であった (Fig.2)。

Fig.2



※5-FU 耐性細胞株に対する耐性解除能については今後の課題としたい。

【成果 5】

TP53 のステータスと IC50 値に関連性は示されなかったことに基づき、GO-Y030 の p53 の安定化作用についてクルクミンをコントロールとして HCT116(p53+/+) を用いて比較検証した。経時的に p53 の細胞内発現レベルを調べたが、GO-Y030 とクルクミンのいずれも一時的な p53 の発現上昇を認めた後、やや GO-Y030 が早いタイミングで細胞内発現レベ

ルの低下を認めた (Fig.3, 4)。p53 の標的遺伝子である MDM2 の発現レベルの変化も p53 の挙動と同様であり、特に差は認められなかった (Fig.3, 4)。この結果から、GO-Y030 の有意な p53 安定化や MDM2 分解の作用を確認することはできず、GO-Y030 の強力な細胞増殖抑制効果が p53 経路依存性であるか否かについて新たな知見を得ることは出来なかった。

Fig.3

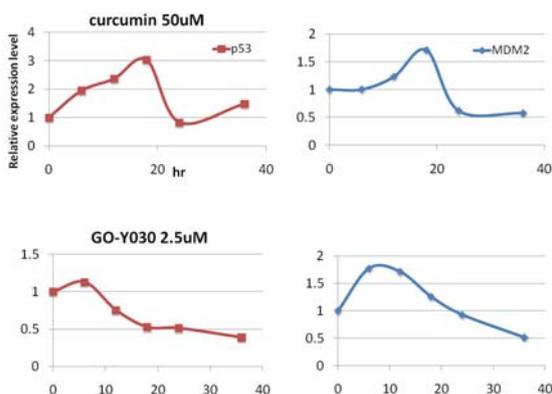
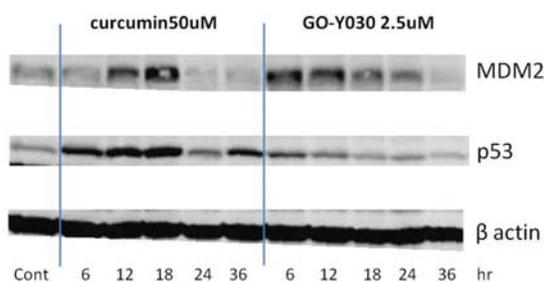


Fig.4



※GO-Y030 処理下での p53 欠失細胞株に対し野生型 p53 導入による細胞増殖抑制効果の増強については今後の課題としたい。

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)

①Shibata H, Yamakoshi H, Sato A, Ohori H, Kakudo Y, Kudo C, Takahashi Y, Watanabe M, Takano H, Ishioka C, Noda T, Iwabuchi Y. Newly synthesized curcumin analog has improved potential to prevent colorectal carcinogenesis in vivo. *Cancer Sci.* 2009 May; 100(5): 956-60 査読有

②Shibata H, Takano H, Ito M, Shioya H, Hirota M, Matsumoto H, Kakudo Y, Ishioka

C, Akiyama T, Kanegae Y, Saito I, Noda T. Alpha-catenin is essential in intestinal adenoma formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 18199-18204 査読有

③Otsuka K, Kato S, Kakudo Y, Mashiko S, Shibata H, Ishioka C. The screening of the second-site suppressor mutations of the common p53 mutants. *Int J Cancer.* 2007 Aug 1; 121(3): 559-66 査読有

[学会発表] (計8件)

①工藤千枝子, 山越博幸, 佐藤温子, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加史, 岩渕好治, 柴田浩行: 新規クルクミン類縁体における抗腫瘍効果. 第2回リトリート大学院生研究会発表会(仙台・川内キャンパス(萩ホール)) 2008年12月6日. ポスター(優秀ポスター賞・優秀質問賞)

②工藤千枝子, 山越博幸, 佐藤温子, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加史, 岩渕好治, 柴田浩行: 新規クルクミンアナログにおける構造機能相関の解析 Analyses of structure-function relationship of new curcumin analogues. 第67回日本癌学会学術総会(名古屋・名古屋国際会議場) 2008年10月29日. ポスター

③柴田浩行, 山越博幸, 佐藤温子, 大堀久詔, 角道祐一, 工藤千枝子, 石岡千加史, 岩渕好治: 新規クルクミン類縁体化合物の担癌マウスにおける抗腫瘍活性 Anti-tumor activity of newly synthesized curcumin analogues in vivo. 第67回日本癌学会学術総会(名古屋・名古屋国際会議場) 2008年10月29日. ポスター

④佐藤温子, 山越博幸, 工藤千枝子, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加史, 岩渕好治, 柴田浩行: 新規クルクミン誘導体によるCOX2発現抑制と抗腫瘍効果に関する検討 More potent reregulation of COX-2 expression with new curcumin analogue. 第67回日本癌学会学術総会(名古屋・名古屋国際会議場) 2008年10月29日. ワークショップ

⑤工藤千枝子, 山越博幸, 佐藤温子, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加史, 岩渕好治, 柴田浩行: 新規クルクミン類縁体における抗腫瘍効果について. 第12回がん分子標的治療研究会総会(東京・学術総合センター) 2008年6月27日. ポスター

⑥大堀久詔, 柴田浩行, 角道祐一, 石岡千加史: 新規curcumin類縁体による大腸がん発

癌予防効果. 2007年度がん若手ワークショップ
（長野・アートランドホテル蓼科）2007年
8月30日. ポスター

⑦柴田浩行, 大堀久詔, 角道祐一, 石岡千加
史: 新規クルクミン類縁体による大腸がん化
学発がん予防効果について. 第11回がん分
子標的治療研究会総会（大阪・大阪国際交流
センター）2007年7月6日. ポスターセッシ
ョン

⑧柴田浩行, 大堀久詔, 角道祐一, 佐藤温子,
岩渕好治, 石岡千加史: 食品に由来する化合
物の新規類縁体を用いた化学発癌予防. 第
13回日本家族性腫瘍学会学術集会（高知・高
知市文化プラザ「カルポート」）2007年6月
15日. シンポジウム(招聘講演演者)

〔図書〕（計1件）

角道祐一, 医学書院 *Medicina* 「日常診療の
中でどこまで悪性疾患の診断にせまれる
か？」2008、1398-1401

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角道 祐一 (KAKUDO YUICHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10396484