

平成22年5月12日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791103
 研究課題名（和文）腎細胞癌及び前立腺癌に対するノスカピンの効果に関する基礎的研究
 研究課題名（英文）Basic research for the anti cancer effect of Noscapine to Renal cell carcinoma and Prostate Cancer
 研究代表者
 宮城 徹（MIYAGI TOHRU）
 金沢大学・附属病院・助教
 研究者番号：60467107

研究成果の概要（和文）：

平成20年度、21年度の本研究により、これまで化学療法に抵抗性であった腎細胞癌及び前立腺癌においても、ノスカピンによる抗腫瘍効果がある程度期待できると推察された。IC50はやや高めの濃度が必要であると考えられるが、これまでの報告によりノスカピンはマウスに投与しても毒性がないことや、人体に対しても大量投与の報告もあるため、今後臨床応用の可能性も考えていく価値があるものと推察された。

研究成果の概要（英文）：

We confirmed the anticancer effect of Noscapine to Renal cell carcinoma cell line and Prostate cancer cell line, they had been thought to be resistant to previous reported chemotherapy. Although IC50 to these cell lines need rather high concentration, still Noscapine was thought to be of great value as one of candidate for chemotherapy to renal cell carcinoma and prostate cancer patients, because there are several reports of safety of high dose Noscapine to human being.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：泌尿器科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：ノスカピン、腎癌、前立腺癌、化学療法

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌・前立腺癌に対しては一般的に化学療法の効果がないとされてきた。

腎細胞癌には手術治療以外に有効な治療法としては、免疫治療のみであり、しかも有効率は15～30%程度と非常に低く、有効

な薬剤の出現が待たれていた。近年脚光を浴びている分子標的治療薬は有効性が証明されてはいるものの、有効期間に限界があることも示唆されており (N Engl J Med. 2007 Jan 11;356(2):125-34) しかも、実際の薬価も非常に高額になることが予想されている。

腎細胞癌の薬剤耐性機序に関しては多剤耐性遺伝子の一つであるMDR-1の発現が臨床的に予後不良因子相関していると報告されている (BMC Cancer. 2006 19 293)。

前立腺癌の臨床においては、転移を有し、手術療法、放射線療法という根治治療を選択できない患者の治療としては、ホルモン治療が選択されている。ホルモン治療自体は非常に有効であり、副作用も少ないが、ホルモン抵抗性となった患者には有効な化学療法がなく、実際の臨床において、ホルモン治療が無効な前立腺癌に対して有効な治療選択肢が驚くほど少ないのが現実である。特に前立腺癌に多く認められる骨転移を有する患者は、早期にホルモンが無効となる可能性が高く、そのホルモン治療が有効な期間も平均約2年とされ非常に短い。その際には、化学療法が唯一の選択肢となり得るものの、前立腺癌に対する化学療法は有効な薬剤がほぼ皆無であるが、臨床的に生存期間の延長効果が認められたものはDocetaxelしかない (Clinical Cancer Res. 2004 10(24) 8147-51)。現在このような微小管をターゲットとし、脱重合を引き起こすビンアルカロイドや過重合させてしまうことを目的としたDocetaxelなどのタキサン系薬剤が臨床的に使用されているが (Nat Rev Cancer. 2004;4:253-265) これらの微小管をターゲットとされた薬剤にも耐性の問題が生じている。その機序としてdrug-efflux pumpの過剰発現、チューブリンのアイソタイプの発現の変化のほか、おそらくチューブリン自体の

mutationもあるだろうと考えられている

(Can Res. 1996;56:2584-2589, J Biol Chem. 1997;272:17118-17125, J Clin Oncol. 1999;17:1786-1793, Bull Cancer 2005;92:E25-E30)。

Docetaxel は微小管に結合し、細胞分裂を妨げがん細胞をアポトーシスへと導くとされている。薬剤今回われわれが使用を試みるノスカピンは、Docetaxel と同様に微小管に結合する性質を持ち、1950年代に開発され咳止めとして使用されていた Opium alkaloid であり、長い間人体に投与されてきた経緯がある。種々の報告で安全性が実証されており、経口投与が可能である。1998年になりこのノスカピンは細胞分裂を阻害し、アポトーシスを誘導する作用があることが報告された (Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Feb 17;95(4):1601-6.)。さらにメカニズムについても研究が進んできており、Jun kinase の活性化、HIF-1alpha の発現の抑制、などが報告されている (J Biol Chem. 2002;277(42):39777-85, Int J Oncol. 2006;28(5):1121-30)。ノスカピンは他の微小管をターゲットとした薬剤とは異なり、たとえ高濃度であったとしても、重合した微小管全体の形態を著明には変化させず、微小管の運動のみを阻害する、その結果として、細胞分裂期において適切な染色体への微小管の結合が阻害され、細胞分裂が阻害される。その結果ノスカピンは、微小管をターゲットとした薬剤の副作用である末梢神経障害・骨髄抑制などを起こすことなく、しかも正常細胞より効果的にがん細胞をアポトーシスに陥れる性質があると考えられ、従来の薬剤より安全でかつ、がん細胞のみをターゲットとした治療を可能にすると考えられている。これまで、ノスカピンを使用して腎癌細胞及びホルモン再燃前立腺癌細胞に *in-vivo* で抗腫

瘍効果を示した報告はない。ノスカピンはすでに臨床で咳止めとして使用されている薬であり、40年にわたる臨床使用経験がある。また人体への安全性も証明されている (Eur J Clin Pharmacol. 1982;22:535-539, Eur J Clin Pharmacol. 1990;39:275-279, Acta Pharm Nor. 1992;4:309-312)。またこれを裏付ける理論的背景として、臨床的に使用されている、ビンアルカロイドやタキサン系抗微小管薬は、細胞分裂時のみならず、微小管を恒久的に形態変化をさせてしまう性質があるため、特に神経の変性をきたしてしまう可能性がある。しかし、今回使用を試みたいと考えているノスカピンは、細胞分裂時の微小管の働きのみを抑制し得るため、これらの副作用がほとんどないと予想される点である。これまでの臨床使用経験、及び安全性の面より考えると、今回の基礎的研究において抗腫瘍効果が証明された場合、臨床応用が速やかに行われる可能性が高いと考えられる。また、経口投与が可能であるため、臨床応用された場合には、予想される副作用の軽減化とあわせて、外来的に治療が可能であることが予想される。現在、外来的に使用でき、効果が期待される化学療法薬の種類が非常に少ないことを考慮すれば、われわれの研究は、大変有意義であると考えられる。薬価もこれまでの免疫賦活剤、分子標的治療薬と比較して大幅に安価になることは間違いなく。医療財政に対する圧迫も少ないこともメリットであると考えられる。

2. 研究の目的

ノスカピンは微小管をターゲットとしており、微小管の運動を妨げることができる。このノスカピンを前立腺癌細胞株、腎癌細胞株に使用し、細胞増殖抑制効果を確認し、さらに動物モデルを使用して抗腫瘍効果を確認

していく。また同時にそのメカニズムについて確認していく。ノスカピン投与により細胞周期に変化が起こると予想されるため、細胞周期の変化を確認するほか、アポトーシスの有無や、その他ノスカピン投与による細胞形態、細胞周期の変化、腎癌に対してはVHL遺伝子異常に起因するHIF-1 α の発現異常をノスカピンで抑制できているかどうかなどの観点から、メカニズムについて研究を進める。

3. 研究の方法

まずは *in vitro* での実験系を確立する。96well plate を使用して、細胞を一定数撒き一晩定着させた後 0-100 μ M のノスカピンを投入し、細胞増殖抑制効果について確認し IC50 を設定する。細胞増殖抑制効果が確認されれば、アポトーシスを起こしているかどうかを確認する。さらにアポトーシスは移行する際のメカニズムを解明する。その後マウス担癌モデルを使用し *in-vivo* の系における抗腫瘍効果を確認し、臨床応用が可能かどうかを調べる。

【細胞株、ノスカピンの準備】

ノスカピンは 97% ノスカピンとして Aldrich 社より購入した。

前立腺癌細胞株としては DU145 PC-3 LNCaP、腎癌細胞株としては caki-1 KMRC-3 KMRC-5 を使用した。JCRB 細胞バンクより入手した。これらの細胞を 10%FCS 付加 RPMI1640 細胞培養液中に播き、37 度 5%CO₂ 含有の条件に保たれたインキュベーター内にて増殖させ、腫瘍細胞のコンディションを一定に保った。

ノスカピンの *in-vitro* での投与方法。

ノスカピンは脂溶性であり、先に述べたように水には溶けにくいいため、DMSO に溶解させストック溶液としたのち、極少量を培養用シヤ

ーレに加え、抗腫瘍効果を測定し IC50 を設定していく必要がある、この際にコントロールとして DMSO を加えた群を加えておくことが必要である。

【動物実験系の準備】

免疫不全ヌードマウス (BALB/C nu/nu チャールズ・リバー社など複数の会社より購入が可能) を使用して、背部皮下腫瘍移植モデルを確立する。

ノスカピンは経口的に投与が可能であるため、経口投与による治療実験を施行予定である。基本的にはノスカピンを蒸留水に溶いたものを注射器にとり、マウス用ゾンデを注射器先端に取り付け、一匹ずつ経口的に服用させていく。誤嚥してしまうと用意にマウスは死に至ってしまうので、経口投与には技術が必要であり、熟練を要するため、同一研究者による投与が望ましいであろう。ノスカピンは溶解しにくい、蒸留水にノスカピン源粉末を加え、根気強く vortex することで溶解させることが可能であり、冬季などには少し暖めたほうが良い場合もある。経口摂取が非常に困難と考えられる場合には、溶媒としてイントラリポスを使用してノスカピンを溶解させ、腹腔内投与を行うことも可能であるので、経口投与が困難であった場合にはこの方法を採用する。

4. 研究成果

In vitro においては前立腺癌・腎細胞癌に対する Noscapine の抗腫瘍効果が確認された。たとえば、ACHN のノスカピンに対する IC50 は前立腺癌細胞株と同様で 30 μ M であった。全体としては既存の抗がん剤と比較すると高めの傾向があった。

また、細胞形態学的にノスカピンによる同細胞株への影響を確認した。細胞骨格を免疫染

色したところ、ノスカピン投与群では細胞分裂時に紡錘糸の運動が阻害され、細胞分裂できずに細胞周期が停止する像が確認され、これまでの報告を裏付けるものであった。FACS を使用して細胞周期を測定したところノスカピン投与24時間にてG2/M期の割合が増加しており、48時間から72時間後にはこれらの細胞分画が減少を示し、hypodiploid (<2N) sub G1の割合が増加しており、これらはDNAのフラグメント化すなわちアポトーシスを誘導しているものと推察された。われわれはこのメカニズムをしらべるためリン酸化Bcl2 (pBcl2) とBaxの発現について確認した。ノスカピンを投与された細胞ではpBcl2の発現がBcl2の発現が増強していないにもかかわらず増強しており、Baxの発現も増強していた。これらの変化は、他の微小管阻害剤でも同様に確認されており、ノスカピンにおいても他の微小管阻害剤と同様な機序で細胞周期を抑制し、さらにアポトーシスへと導いていることが示唆された。動物実験においてはノスカピン投与群にて前立腺癌細胞株の実験系にて腫瘍の増殖速度が低下する所見が得られたがマウスの体重減少は認められず、明らかな副作用は認められなかった。今後はタキソテールなどの抗癌化学療法と同時投与することにて効果を増強させることを検討しても良いと考えられる。平成20年度、21年度の本研究により、これまで化学療法に抵抗性であった腎細胞癌及び前立腺癌においても、ノスカピンによる抗腫瘍効果がある程度期待できると推察された。IC50はやや高めであり、臨床効果を期待するには投与量が多く必要であると考えられるが、これまでの報告によりノスカピンはマウスに投与しても毒性がないことや、人体に対しても大量投与の報告もあるため、今後臨床応用の可能性も考えていく価値があるもの

と推察された。

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)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
宮城 徹 (MIYAGI TOHRU)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号：60467107