

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591686

研究課題名（和文）新規分化誘導剤とラパマイシンによる固形癌細胞の増殖抑制効果の分子機構解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of solid tumor growth inhibition by a new differentiation inducer and rapamycin

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（和文）：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も発揮する可能性があること、およびその分子機構を明らかにし、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。これまでに、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発見している。これら併用効果の分子機構には、rapamycin のネガティブフィードバックによる Akt のリン酸化を cotylenin A が抑制することが少なくとも一部は関連していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We have examined whether a new differentiation inducer of leukemic cells can suppress the proliferation of solid tumor cells. We recently found that cotylenin A and rapamycin synergistically inhibited the growth of human mammary cancer cells *in vitro* and *in vivo*. In this study we found that the abrogation by cotylenin of the rapamycin-induced feedback activation of Akt signaling contributed, at least in part, to the synergistic growth inhibition of mammary cancer cells induced by treatment with cotylenin A and rapamycin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：Cotylenin A、Rapamycin、分化誘導剤、乳癌細胞、増殖抑制、併用効果、Akt リン酸化、mTOR

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、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。さらに、最近、この併用処理に伴って、増殖抑制的に作用すると考えられているサイクリン G2 遺伝子の発現が早期から顕著に誘導されることを見出した。しかし、この併用処理効果の作用機序の研究は緒についたばかりである。

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機構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になっている。現在、日本でも rapamycin 誘導体が進行性腎癌の治療に使用が認められた。さらに、乳癌などの他の癌でも第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として cotylenin A との併用効果をスクリーニングした結果、cotylenin A と rapamycin との併用が最も顕著であることを見出した。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

細胞増殖は MTT assay または trypan blue dye exclusion test で測定した。リン酸化蛋白質は Western blotting で測定した。アポトーシス蛋白質のプロファイリングは Human Apoptosis Array Kit (R&D Systems) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 我々はこれまでに、植物成長制御因子として報告されている cotylenin A および mTOR (mammalian target of rapamycin) 阻害剤である rapamycin が白血病細胞に対する強い分化誘導剤であることを報告している。さらに、cotylenin A と rapamycin がヒト乳癌細胞 MCF-7 の増殖を相乗的に抑制することを見出している。また、MCF-7 細胞をヌードマウスに移植した実験系でも、cotylenin A と rapamycin を併用処理した場合、それぞれ単独処理よりも顕著な抗腫瘍効果を示すことを見出した。しかしながら、これら分化誘導剤の併用による効果のメカニズムは未だ不明である。我々は最近、癌細胞において高頻度に活性化されている Akt/mTOR シグナル経路について検討し、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 (図1)。

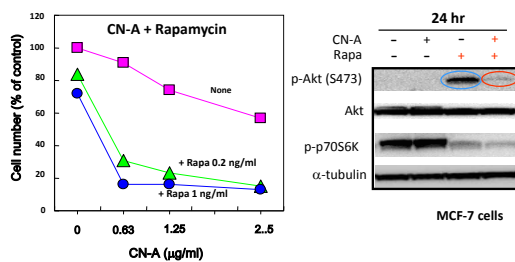


図1 Cotylenin AはrapamycinによるAktのリン酸化を抑制する

この rapamycin による Akt リン酸化の誘導は rapamycin 自身の増殖抑制効果を減弱させるものと考えられている。また、rapamycin との併用効果を示す cotylenin A 類似体は rapamycin 処理で誘導される Akt のリン酸化を顕著に抑制したが、併用効果を示さない cotylenin A 類似体は rapamycin による Akt の活性化の誘導を抑制しなかった。さらに、

Akt siRNA で Akt をノックダウンすると rapamycin の増殖抑制効果が増強した (図 2)。

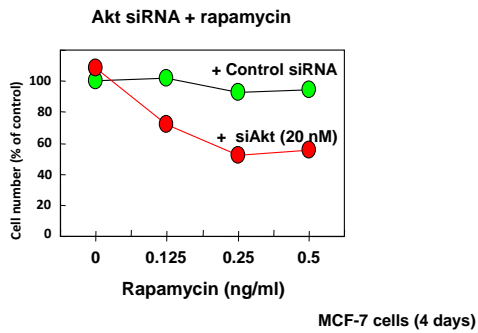


図 2 Akt siRNAとrapamycinによる相乗的増殖抑制効果

これらの結果は、rapamycin が誘導する Akt リン酸化の cotylenin A による阻害が、cotylenin A と rapamycin による相乗的増殖抑制効果と密接に関連していることを示唆する (図 3)。

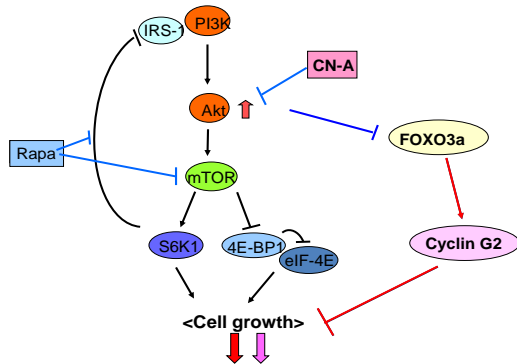


図 3 Cotylenin A と rapamycin による乳癌細胞の増殖抑制効果の作用機序モデル

(2) rapamycin と他の分化誘導剤との併用効果を種々の固形癌細胞を用いてスクリーニングした結果、前骨髄球性白血病 (APL) 細胞に対し低濃度では分化誘導活性を示し高濃度ではアポトーシス誘導活性を示す三酸化ヒ素 (arsenic trioxide, ATO) と rapamycin

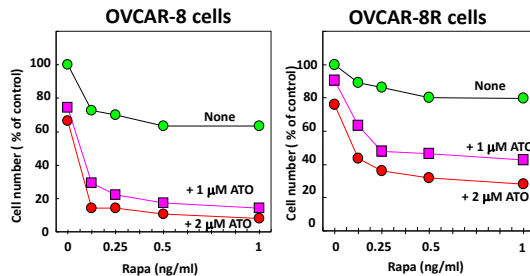


図 4 Rapamycin と三酸化ヒ素(ATO)による卵巣癌細胞の増殖抑制効果

は相乗的にヒト卵巣癌細胞の増殖を阻害することを見出した (図 4)。低濃度 rapamycin と APL の治療に用いられる濃度以下の ATO を卵巣癌細胞 OVCAR-8 に併用

処理すると、増殖は 2 日目以降ほぼ完全に停止し、一部細胞は死滅した。この rapamycin と ATO の顕著な併用効果は他の卵巣癌細胞でも見られた。さらに、このような rapamycin と ATO の併用効果はシスプラチン耐性卵巣癌細胞でも見られた (図 4 右)。Apoptosis array を用いて検討した結果、これらの併用処理によって DR5/TRAIL R2 の発現が強く誘導され、逆に survivin の発現は顕著に低下していることを明らかにした (図 5)。

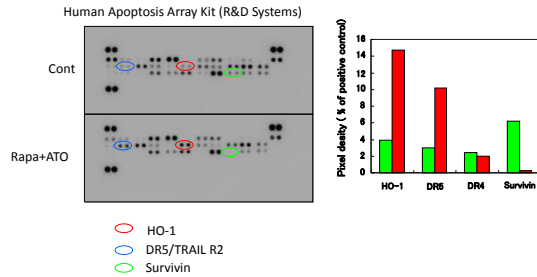


図 5 Rapamycin と三酸化ヒ素(ATO)による卵巣癌細胞のアポトーシス関連蛋白質発現への効果

(3)。最近、白血病細胞を用いて cotylenin A と様々な分化誘導剤との併用効果を検索している中で、低濃度の ATO が前骨髄球性白血病細胞の cotylenin A による分化を顕著に促進することを見出した。そこで、この併用処理が固形癌細胞に対しても有効な抗癌作用を示すことができるかどうかヒト乳癌細胞を用いて検討した。Cotylenin A は ATO によるヒト乳癌細胞 (MCF-7, MDA-MB-231) の増殖抑制を顕著に促進した (図 6)。

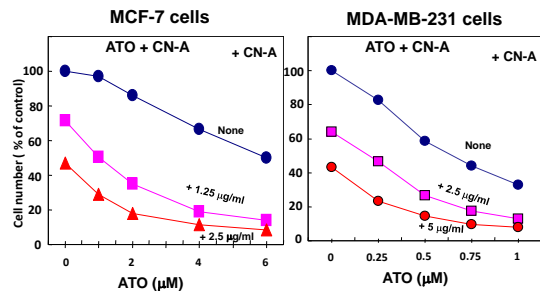


図 6 Cotylenin A と三酸化ヒ素による乳癌細胞の増殖抑制効果

さらに、cotylenin A と ATO の併用処理は足場非依存性の増殖抑制効果も示した。この cotylenin A と ATO の併用効果は、cotylenin A の白血病細胞に対する分化誘導活性と関連していた。分化誘導活性のある cotylenin A およびその合成誘導体は乳癌細胞において ATO との併用効果を示したが、分化誘導活性を示さない cotylenin A 類似体およびその合成誘導体は ATO との併用効果も示さなかった。また、cotylenin A と ATO の併用処理は MCF-7 細胞において、活性化 caspase 7 を顕著に誘導し、逆に、survivin の発現を抑制した (図 7)。

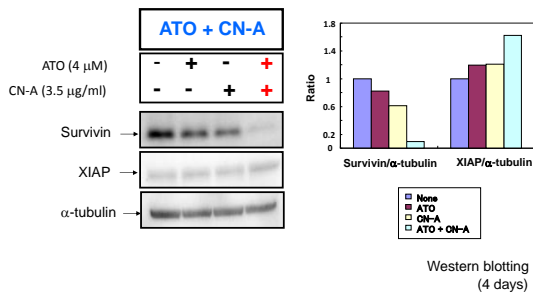


図7 Cotylenin A と三酸化ヒ素による乳癌細胞の survivin発現抑制

これらの結果は、臨床で応用可能な濃度の ATO が cotylenin A と併用することによって乳癌細胞の増殖を制御できる可能性を示唆する。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4件)

- ① Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein as a therapeutic target for hematological malignancy. Adv. Hematol., 2012:879368, 2012. 査読有、DOI:10.1155/2012/87968
- ② Hagiwara, Y., Kasukabe, T., Kaneko, Y., Niitsu, N., Okabe-Kado, J. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells. Int. J. Hematol., 92, 136-143, 2010. 査読有
- ③ Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kobayashi, H., Kaneko, Y. Extracellular NM23 protein promotes the growth and survival of primary cultured human acute myelogenous leukemia cells. Cancer Sci., 100, 1885-1894, 2009. 査読有
- ④ Okabe-Kado, J., Kasukabe, T., Honma, Y., Kobayashi, H., Maseki, N., Kaneko, Y. Int. J. Hematol., 90, 143-152, 2009. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 粕壁 隆、他3名 Rapamycin and arsenic trioxide synergistically induce apoptosis of human ovarian cancer cells. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月2日、横浜
- ② 粕壁 隆、他2名 PI-103 and cotylenin

A synergistically inhibit growth of rapamycin-sensitive and -resistant mammary cancer cells. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪

- ③ 粕壁 隆、他2名 Cotylenin A potentiates arsenic trioxide-induced apoptosis in human breast cancer cells. 第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日、名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：