

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701101

研究課題名(和文) 癌細胞選択的アポトーシス活性化小分子化合物を用いた新規胃癌治療の確立

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for gastric cancer using apoptosis activating small molecule

研究代表者

井手 貴雄 (Ide, Takao)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：40587549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腹膜播種を伴う胃癌は未だ不治の病であり、その分子機構解明及び新規薬剤開発は急務である。PPLGMは、正常細胞へ低毒性でありながら胃癌においても抗腫瘍作用を十分に発揮することが期待できる。今回の研究において、小分子化合物PPLGMは胃癌細胞株においてアポトーシスを誘導し、腫瘍抑制効果を示したことより、PPLGMが新規胃癌治療薬の一つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination from gastric cancer is lethal disease, therefore understanding such molecular mechanism and establishment of new therapeutic strategy is essential. PPLGM, a small molecule which we discovered, has anti-tumor effect in gastric cancer cells through activating apoptosis pathway. Our study suggested the possibility that PPLGM is one of key drug for gastric cancer.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：小分子化合物 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

がん治療に幅広く用いられている既存の抗悪性腫瘍薬は、がんの種類によっては有効な治療法の1つではあるが、DNAや微小管を標的とする為細胞増殖が旺盛な正常組織に副作用が生じやすい欠点がある。一方、近年開発された分子標的治療薬は、従来の抗悪性腫瘍薬より優れた選択性と安全性が期待されているが、予想外の副作用や耐性など新たな課題も明らかとなっている。そのため、標的癌細胞へ最大限の効果を発揮しつつ、正常細胞へは最小限の影響しか与えない新たな治療戦略の構築や分子機構の解明が待たれている。

2. 研究の目的

代表者らは、癌抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子でアポトーシス誘導能を持つ CDIP(Cell Death Involved p53-target) のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを移入した U2OS 骨肉腫細胞株を樹立し、米国 Harvard & MIT Broad Institute にて化合物ライブラリースクリーニングを行い、CDIP プロモーター活性を上昇させる天然化合物 PPLGM を同定した。各種癌細胞株において(p53 変異の有無に関係なく)PPLGM は濃度依存的に細胞死(アポトーシス)を誘導し、アポトーシス関連遺伝子である Puma 及び cleaved-PARP のタンパク発現を増強させた。一方で、線維芽細胞や乳腺上皮細胞等の正常細胞においては、PPLGM は細胞死を誘導せず、アポトーシス関連遺伝子の発現変化も認めなかった。A549 肺癌細胞株、MDA-MB-231 乳癌細胞株及び EJ 膀胱癌細胞株を用いたヌードマウス異所性及び同所性移植実験においても、PPLGM 投与群はコントロール群(DMSO 投与)と比較し、著明な腫瘍抑制効果を示すとともに、腫瘍組織標本を用いた免疫組織学的検討において PPLGM 投与群は Puma 及び Caspase3 タンパク発現の増強を認めた。又、PPLGM 投与群はコントロール群と比較して、肝臓、腎臓等の正常組織において組織形態学的

に変化を認めなかった。

さらに SILAC(stable isotope labeling with amino acids in cell culture)法を用いたスクリーニングにて PPLGM の標的タンパクとして抗酸化作用を持つ GSTP1(glutathione-S-transferase) 遺伝子を同定した。PPLGM は GSTP1 発現を抑制し、細胞内 GSH(glutathione)を低下させることで ROS(活性酸素種)産生を促す。元来癌細胞は正常細胞に比べ相対的に ROS level が高く、強い酸化ストレス下で生存しており、抗酸化能力も著しく低い。それ故、外部からの酸化ストレスへの感受性が高く、細胞死を起こしやすい。これまでの代表者らの解析により、PPLGM の腫瘍抑制メカニズムとして、癌細胞選択的な ROS 産生促進によりアポトーシスを誘導していることが明らかとなり、PPLGM が ROS ストレス応答を標的とした理想的な新薬となる可能性が示唆された。

腹膜播種を伴う胃癌は未だ不治の病であり、その分子機構解明及び新規薬剤開発は急務である。PPLGM は、正常細胞へ低毒性でありながら胃癌においても抗腫瘍作用を十分に発揮することが期待できる。今回の研究において、小分子化合物 PPLGM が新規胃癌治療薬となる可能性を示す。

3. 研究の方法

細胞株(胃癌細胞及び正常胃粘膜細胞)を用いて、PPLGM が癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することを確認した後、ヌードマウスを用いた実験系において、PPLGM 投与による抗腫瘍効果を明らかにする。更に GSTP1 過剰発現及び抑制実験において、PPLGM の腫瘍抑制メカニズムを解析する。

4. 研究成果

野生型及び変異型 p53 をそれぞれ持つ胃癌細胞株に PPLGM(0~50 μ M)を添加すると、crystal violet staining、trypan blue staining において、濃度依存的・時間依存的に細胞死が誘導された。また PI staining による FACS 解析において、PPLGM 投与により胃癌細胞株にアポト

ーシスが誘導された。一方、Western blotting ではアポトーシス関連遺伝子である Puma 及び Caspase 3、cleaved-PARP のタンパク発現上昇を認められた。

これらの結果より PPLGM は、胃癌細胞において抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

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)

[雑誌論文](計 15 件)

- 1 Tanaka T, Nakamura J, Kitajima Y, Kai K, Miyake S, Hiraki M, ide T, Koga Y, Noshiro H. Loss of trefoil factor 1 is regulated by DNA methylation and is an independent predictive factor for poor survival in advanced gastric cancer. INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 42 3 894-902 2013
- 2 Kiyoto Morito, Keita Kai, Atsushi Miyoshi, Hiroshi Kubo, Takao ide, Shinya Azama, Hiroyuki Irie, Yasuo Koga, Kenji Sumi, Osamu Ikeda, Kenji Kitahara, Hirokazu Noshiro Primary squamous cell carcinoma of the liver concomitant with primary colon cancer: report of a case Clinical Journal of Gastroenterology 6 2 134-138 2013
- 3 Miyoshi A, ide T, Kitahara K, Noshiro H. Appraisal of simultaneous laparoscopic splenectomy and hepatic resection in the treatment of hepatocellular carcinoma with hypersplenic thrombocytopenia. Hepatogastroenterology. 2013 Aug 9;60(127). doi: 10.5754/hge13122. [Epub ahead of print] 2013
- 4 Keita kai , Masanori Masuda, Takao ide, Yukari Takase, Atsushi Miyoshi, Kenji Kitahara, Kohji Miyazaki, Hirokazu Noshiro, and Osamu Tokunaga Mitotic count reflects prognosis of gallbladder cancer partlarly among patients with T3 tumor MOLECULAR AND CLINICAL ONCOLOGY 1 633-638 2013
- 5 Kai K, Irie H, ide T, Masuda M, Kitahara K, Miyoshi A, Miyazaki K, Noshiro H, Tokunaga O. Actual status of clinical diagnosis in patients with primary gallbladder cancer associated with adenomyomatosis. Indian J Gastroenterol. 32 6 386-391 2013
- 6 Kai K, ide Y, Miyoshi A, Masuda M, ide T, Kitahara K, Irie H, Nakajima J, Noshiro H, Tokunaga O. A case of mucinous cholangiocarcinoma showing features of hepatocellular carcinoma. Pathology International. 63 8 419-421 2013
- 7 Ide T, Miyoshi A, Kitahara K, Noshiro H. Prediction of postoperative complications in elderly patients with hepatocellular carcinoma. Journal of Surgical Research 185 614-619 2013
- 8 江川紀幸、井手貴雄、甲斐敬太、三好篤、北原賢二、能城浩和 胆嚢腺筋腫症に発生した胆嚢肉腫様癌の1例 日本消化器外科学会雑誌 46 4 275-281 2013

9 三好篤、古賀浩木、中村淳、井手貴雄、
北原賢二、能城浩和、AZE
VirtualPlace を用いた術前肝切除シ
ミュレーションの有用性
INNERVISION 28 1:94-95 2012

10 Keita Kai, Jun Nakamura, Takao ide,
Masanori Masuda, Kenji Kitahara,
Atsushi Miyoshi, Hirokazu Noshiro
and Osamu Tokunaga Hepatoid
carcinoma of the pancreas
penetrating into the gastric cavity:
A case report and literature review
Pathology International 62 : 485-490
2012

11 Keita Kai 、 Naohiko Kohya 、 Kenji
Kitahara 、 Masanori Masuda 、
Atsushi Miyoshi Takao ide ,Osamu
Tokunaga ,Kohji Miyazaki Hirokazu
Noshiro Tumor budding and
dedifferentiation in
gallbladder carcinoma: potential for the
prognostic factors in T2 lesions"
Virchows Arch 459 : 449-456 2011

12 Takao ide Atsushi Miyoshi Kenji
Kitahara Keita Kai, b Hirokazu
Noshiro Spindle and Giant Cell Type
Undifferentiated Carcinoma of the
Proximal Bile Duct Case Reports
in Gastroenterology 6 : 33-39 2012

13 井手貴雄、鮫島隆一郎、酒井正、井久
保丹、田淵正延、湯ノ谷誠二 腹腔鏡下
手術後ドレーン抜去孔に発生した 5mm
ポートサイトヘルニア嵌頓の 1 例
外科 73 11 : 1237-1240 2011

14 Raj L, ide T, Gurkar AU, Foley M,
Schenone M, Li X, Tolliday NJ, Golub
TR, Carr SA, Shamji AF, Stern AM,

Mandinova A, Schreiber SL, Lee SW.
Selective killing of cancer cells
by a small molecule targeting the
stress response to ROS. Nature. 2011
Jul 13;475(7355):231-4 2011

15 Kai K, ide T, Masuda M, Kitahara K,
Miyoshi A, Miyazaki K, Noshiro H,
Tokunaga O. Clinicopathologic features
of advanced gallbladder cancer
associated with adenomyomatosis.
Virchows Arch. 2011 Dec;459(6):573-80.
Epub 2011 Oct 26. 2011

以上、全て査読有り

〔学会発表〕(計 142 件)

井手貴雄、Sam W Lee、古賀靖大、能城浩
和、宮崎耕治 エネルギー代謝制御破綻に
よる大腸癌悪性形質進展機序 第 22 回日
本消化器癌発生学会総会 2011.11.25-26

他

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井手 貴雄 (Ide, Takao)

佐賀大学 医学部 助教

研究者番号：40587549

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：