

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 30 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590225

研究課題名(和文) PPAR 刺激薬による膵臓がん治療法の開発

研究課題名(英文) Research on the therapy for pancreatic cancer by PPARgamma agonists

研究代表者

岡村 昇 (OKAMURA, Noboru)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60379401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト膵臓がん細胞に対するPPAR 刺激薬トログリタゾンの作用を検討したところ、トログリタゾンは濃度依存的に抗腫瘍効果を示した。また、その作用において、PPAR は関与しないことを明らかにした。Panc-1細胞では、重要な経路を見出すことはできなかったが、MIA Paca-2細胞においては、JNK経路がトログリタゾンの作用に一部関与していることを明らかにした。さらにMIA Paca-2細胞を用いて雄性ヌードマウスに移植後、トログリタゾンを経口投与したところ、有意な差はないものの、腫瘍体積並びに重量は低下傾向を示し、in vivoにおいても抗腫瘍効果を示す可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Effect of troglitazone, a PPAR agonist, on human pancreatic cancer cell lines, troglitazone exhibited inhibitory activity on cell proliferation in concentration dependent manner. Also, it was suggested that PPAR did not involved in the activity. Although no important pathway was revealed in Panc-1 cells, the JNK pathway was involved in the activity in MIA Paca-2 cells. In addition, effect of oral administration of troglitazone on tumor progression in tumor-bearing mouse using MIA Paca-2 cells was investigated. Although any significant difference was not observed, tumor volume and weight tended to decrease, suggesting the possibility of troglitazone having anti-tumor effect in in vivo.

研究分野：医療系薬学

キーワード：膵臓がん PPAR アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは、日本では5番目に死亡者数の多いがんであり、5年生存率は5%程度で、最も予後の悪いがんとして知られている。その原因として、早期発見が困難であること、化学療法が限られていることが考えられている。手術可能な症例は10%に過ぎず、手術患者平均生存期間は、2年程度である^{1,2)}。したがって、手術成績の向上のため、新たな補助化学療法が求められている。さらには、転移の認められる膵臓がんのうち、手術不能例では、平均生存率は6カ月以内であり、さらに深刻である。現在の転移性膵臓がんにおける標準療法はゲムシタピンを中心とした化学療法であるが、他の抗がん剤や放射線療法との組み合わせが模索されているものの、いずれもその効果は十分ではない²⁻⁴⁾。したがって、新規化学療法の探索が急務の課題である。そこで、新規化学療法の探索を目的として、PPAR γ に着目し、その刺激薬の抗腫瘍効果を明らかにし、その作用機序を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの抗腫瘍効果の検討

これまで、腎臓がんへの新規創薬ターゲットの探索を目的に、糖尿病治療薬で PPAR γ 刺激薬であるトログリタゾンを用い、その腫瘍効果を明らかにしてきた。すなわち、PPAR γ 非依存的にアポトーシスを示すこと、p38 MAPK 経路が重要であることを明らかにしてきた⁵⁾。そこで、トログリタゾンの膵臓がん細胞に対する効果およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。

(2) ゲムシタピンの抗腫瘍効果に対する糖尿病治療薬の併用効果

膵臓がん患者で、インスリン分泌が低下すると糖尿病症状が発現し、経口糖尿病薬が血糖降下目的で投与されることがある。膵臓がんの標準治療となっているゲムシタピンに対して、作用増強効果がある糖尿病用薬があれば、積極的に併用し、作用減弱効果があれば、併用を避けるべきであることから、適切な経口糖尿病薬の選択に寄与する情報が得られると考えられた。そこで、膵臓がん細胞におけるゲムシタピンの作用に影響を及ぼすかどうかについて検討した。

(3) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

上記(1)の検討において、トログリタゾンの膵臓がん細胞に対する抗腫瘍効果を *in vitro* で明らかにすることができたことから、その作用が *in vivo* においても抗腫瘍効果があるかどうかについて、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの抗腫瘍効果の検討

トログリタゾンの膵臓がん細胞に対する影響は、Panc-1 および MIA Paca-2 細胞を用いて検討した。細胞の生存率には、Cell Quanti-Blue 蛍光試薬を用いた。核形態は、Hoechst 33342 による染色後、蛍光顕微鏡で観察し、クロマチンの凝集を観察した。さらに、PPAR γ 依存性の検討には、PPAR γ 阻害薬の GW9662 を用い、細胞内シグナル伝達経路の検討には、それぞれ特異的な阻害薬を用いて、トログリタゾンとの併用処置により、生存率が回復するかどうかを検討した。さらに、細胞内シグナル伝達等に関わるタンパク発現量の検討は、Western blotting 法により検討した。

(2) ゲムシタピンの抗腫瘍効果に対する糖尿病治療薬の併用効果

ゲムシタピンに対する糖尿病治療薬併用の影響は、Panc-1 細胞を用い、ゲムシタピン(1 ~ 1000 μ M)にグリメピリド、メトホルミン、ミチグリニドおよびトログリタゾンを併用し、その生存率を(1)と同様の方法で検討した。

(3) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

Balb/c 雄性ヌードマウス背部に MIA Paca-2 細胞 (5×10^6 cells/mice) を皮下移植した。移植 14 日後を Day 0 とし、週 3 回トログリタゾンを 200 mg/kg の投与量で 2 週間経口投与した。腫瘍の長径と短径を測定し、(長径 \times 短径²)/2 で体積を評価した。最終投与後、腫瘍を摘出し、重量を測定した。

4. 研究成果

(1) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの抗腫瘍効果の検討

ヒト膵臓がん細胞に対して、トログリタゾンは濃度依存的に増殖抑制効果を示し、Panc-1 および MIA Paca-2 に対する 50%増殖抑制濃度 (IC₅₀ 値) はそれぞれ 51.3 および 49.9 μ M であった (Fig. 1)。また、データは示さないが、同時に比較したピオグリタゾンよりも強い作用を示した。さらに、クロマチンの凝集も認められ、アポトーシスが引き起こされていることが示唆された。

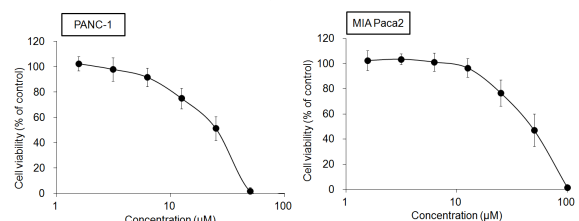


Fig. 1 Cytotoxic effects of troglitazone on pancreatic cancer cells.

そこで、この作用機序について検討を行った。いずれの細胞でも PPAR γ 阻害薬 GW9662 の併用処置でも生存率の回復は認められず、

PPAR γ 非依存的であることが示唆された。いずれの細胞でもリン酸化 JNK がトログリタゾン処置で増加した。MIA Paca-2 細胞では、さらに JNK 阻害薬の SP600125 併用処置で、生存率が回復した (Fig. 2)。しかし、Panc-1 細胞ではこの生存率の回復は認められなかった。したがって、MIA Paca-2 細胞では少なくとも一部は JNK 経路が関与していることが示唆された。

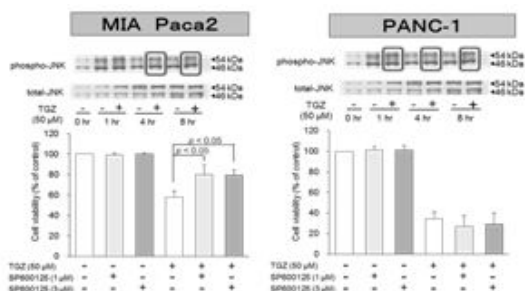


Fig. 2 Involvement of JNK MAPK pathway in TGZ-induced cell death.

さらに ERK のリン酸化レベルの上昇が認められたが、ERK 阻害剤併用処置でも生存率の回復は認められなかったため、関与は小さいものと考えられた。Akt のリン酸化レベルの上昇のならば DNA 修復機構の ERCC1 発現量の低下が認められ、これらの経路に対するトログリタゾンの影響を今後詳細に検討することにより、詳細な作用機序の解明を目指す。

(2) ゲムシタピンの抗腫瘍効果に対する糖尿病治療薬の併用効果

MIA Paca-2 細胞においては、検討したグリメピリド、トログリタゾンおよびメトホルミンは、ゲムシタピンの細胞増殖抑制作用に対して影響を及ぼさないことが示唆されたが、ミチグリニドは、単独では作用を示さない 200 μ M で増強する可能性が考えられた。一方、Panc-1 細胞においては、グリメピリド、ミチグリニドおよびトログリタゾンは、ゲムシタピンの細胞増殖抑制作用に対して、影響を及ぼさないことが示唆された。一方、メトホルミンは単独では作用を示さない 200 μ M で増強する可能性が考えられた。しかし、いずれも顕著な作用ではなかった。少なくともゲムシタピンの作用を減弱させなかったことから、臨床上併用しても特に問題ないことが示唆された。

(3) PPAR γ 刺激薬トログリタゾンの担がんマウスにおける効果の検討

今回の条件で、ヒト膵臓がん細胞である MIA Paca-2 細胞がヌードマウスに生着することが確認できた。したがって、in vivo での影響を検討することが可能となった。次に、2 週間後からの投与により、トログリタゾンの影響を検討した結果、統計学的な有意差は認めら

れないものの、腫瘍体積の減少傾向と最終投与後の腫瘍重量の低下傾向が認められた (Fig. 3)。したがって、トログリタゾンは、in vivo においても抗腫瘍効果を持つ可能性が考えられた。今後、詳細な実験条件を検討し、in vivo における効果の検証を行う予定である。

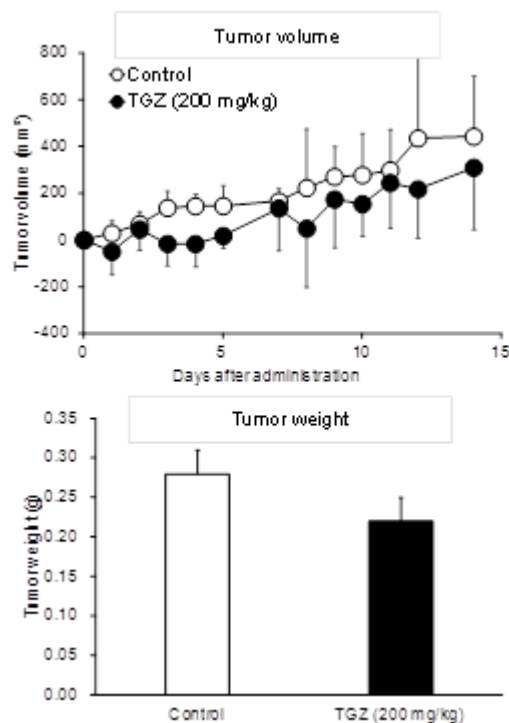


Fig. 3 Antitumor effects of troglitazone on MIA Paca-2 cell xenografts.

< 引用文献 >

1. Cameron et al., One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg* 244: 10-15, 2006.
2. Vincent et al., Pancreatic cancer. *Lancet* 378: 607-620, 2011.
3. Burris et al., Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413, 1997.
4. Storniolo et al., An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 85: 1261-1268, 1999.
5. Fujita et al., Cytotoxicity of troglitazone through PPAR γ -independent pathway and p38 MAPK pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 312: 219-227, 2011.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

Cytotoxicity 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ through PPAR γ -independent pathway and the involvement of the JNK and Akt

pathway in renal cell carcinoma. Fujita M, Tohji C, Honda Y, Yamamoto Y, Nakamura T, Yagami T, Yamamori M, Okamura N. Int J Med Sci 9(7): 555-566, 2012 (査読有)

L-type voltage-dependent calcium channel is involved in the snake venom group IA secretory phospholipase A2-induced neuronal apoptosis. Yagami T, Yamamoto Y, Kohma H, Nakamura T, Takasu N, Okamura N. Neurotoxicology 35: 146-153, 2013 (査読有)

Potential tumor markers of renal cell carcinoma: alpha-enolase for postoperative follow-up and galectin-1 and galectin-3 for primary detection. Kaneko N, Gotoh A, Okamura N, Matsuo E, Terao S, Watanabe M, Yamada Y, Hamami G, Nakamura T, Nishimura O. Int J Urol. 20(5): 530-535, 2013 (査読有)

TNF- α -857C>T genotype is predictive of clinical response after treatment with definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. Omatsu H, Kuwahara A, Yamamori M, Fujita M, Okuno T, Miki I, Tamura T, Nishiguchi K, Okamura N, Nakamura T, Azuma T, Hirano T, Ozawa K, Hirai M. Int J Med Sci. 10(12): 1755-1760, 2013 (査読有)

Genetic polymorphisms in SLC23A2 as predictive biomarkers of severe acute toxicities after treatment with a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma. Minegaki T, Kuwahara A, Yamamori M, Nakamura T, Okuno T, Miki I, Omatsu H, Tamura T, Hirai M, Azuma T, Sakaeda T, Nishiguchi K. Int J Med Sci, 11(4): 321-326, 2014 (査読有)

Serum lactate dehydrogenase levels as a predictive marker of oxaliplatin-induced hypersensitivity reactions in Japanese patients with advanced colorectal cancer. Seki K, Tsuduki Y, Iroi T, Yamane M, Yamauchi H, Shiraishi Y, Ogawa T, Nakata I, Nishiguchi K, Matsubayashi T, Takakubo Y, Yamamori M, Kuwahara A, Okamura N, Sakaeda T. Int J Med Sci. 11(6): 641-645, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

ヒト神経膠芽腫細胞におけるテモゾロミドの効果に及ぼす抗てんかん薬の影響 西口裕子、藤田恵、稲彩乃、本田陽子、山森元博、岡村昇 日本薬学会第 132 年会 (2012) 北海道大学 (北海道・札幌市)

Gefitinib の CYP2D を介した薬物間相互

作用 高須るり、本田陽子、北川恵美子、藤田恵、山森元博、岡村昇 日本薬学会第 132 年会 (2012) 北海道大学 (北海道・札幌市)

5-フルオロウラシルとワルファリンの薬物間相互作用 本田陽子、廣田麻衣子、高須るり、山森元博、岡村昇 日本薬学会第 132 年会 (2012) 北海道大学 (北海道・札幌市)

腎臓がん細胞における 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 の抗腫瘍メカニズムの解明 田路千明、藤田恵、本田陽子、山本泰弘、中村任、矢上達郎、山森元博、岡村昇 日本薬学会第 132 年会 (2012) 北海道大学 (北海道・札幌市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 昇 (OKAMURA Noboru)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号 : 60379401

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山森 元博 (YAMAMORI Motohiro)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号 : 10444613

藤田 恵 (FUJITA Megumi)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号 : 50509966