

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791831

研究課題名(和文)悪性黒色腫に対するトレハロースの増殖抑制作用に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study for the inhibitory effects of trehalose on malignant melanoma cells

研究代表者

工藤 孝志(Kudo, Takashi)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20598718

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)：ヌードラットの結膜下にヒト皮膚由来悪性黒色腫を移植し、各種濃度のトレハロースを点眼し、トレハロースの腫瘍抑制効果を組織計測法にて確認するとともに、悪性黒色腫を各種濃度のトレハロース存在下で培養し、MTTアッセイによる細胞増殖活性の変化とフローサイトメトリーによる細胞周期に関する転写因子の発現量の定量的な観察を行った。その結果トレハロースは濃度依存的に腫瘍細胞増殖を抑制し、かつ細胞周期に関する転写因子を介して腫瘍細胞をアポトーシスに誘導する働きがある事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human cutaneous malignant melanoma cells were implanted in the subconjunctival spaces of nude rats. Various concentrations of trehalose were instilled (in vivo system) and melanoma cells were cultivated under various concentrations of trehalose for analyzing changes of proliferative activities of tumor cells by MTT assay and flow-cytometrically quantifying expressions of some kinds of transcription factors that were known to be important for cell cycle (in vitro system). Trehalose dose-dependently showed inhibition of malignant cell proliferation and through transcription factors and demonstrated to lead tumor cells to apoptosis in association with transcription factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：トレハロース 癌化学療法 外眼部 悪性黒色腫 結膜腫瘍

1. 研究開始当初の背景

最近、研究者が所属する研究グループではトレハロースが結膜下線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖を抑制し、かつ角膜上皮細胞の保護作用を有することを明らかにした。これはトレハロースが間葉系細胞の増殖を抑制する作用をもつことと解釈された。そこで研究者はトレハロースが腫瘍性細胞に対して増殖抑制効果を持つかどうかに興味を持つに至った。

2. 研究の目的

トレハロース点眼が実験動物の眼球結膜下に移植された悪性腫瘍細胞に対して増殖抑制効果を示すかどうか。そしてその効果が腫瘍細胞の細胞サイクルおよび細胞死にどのような影響を与えるのかを明らかにすること。

3. 研究の方法

ヌードラットの眼球結膜下にヒト皮膚悪性黒色腫由来の腫瘍細胞を移植し、トレハロース点眼と基剤点眼との間に腫瘍細胞増殖能に差異が認められるかどうかについて検討した。

悪性黒色腫細胞をトレハロース存在下に培養し、MTT アッセイにて細胞増殖能への影響を解析した。さらに細胞サイクルの回転に影響のある各種転写因子についてフローサイトメトリーにて定量的に解析し、トレハロースの細胞サイクルへの影響を観察した。

4. 研究成果

ヌードラット眼球結膜下に移植された悪性黒色腫細胞は対照基剤に比べて5%以上の濃度のトレハロースでは有意に細胞増殖が抑制された(図1-3)。

図1

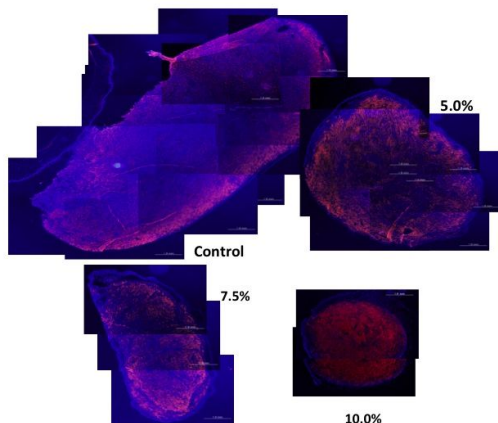
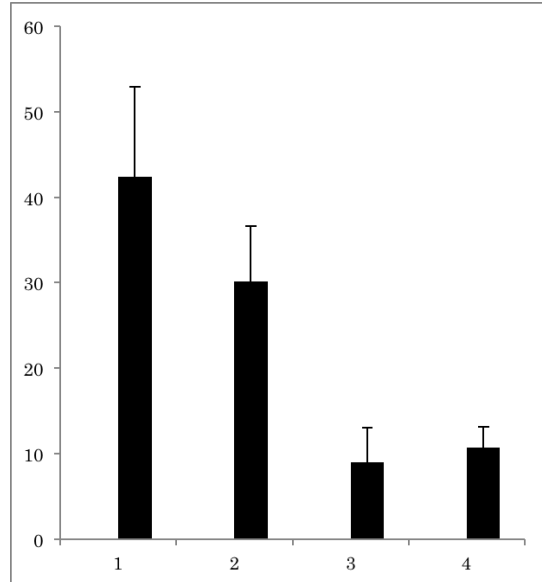


図1の説明

ラット結膜下に移植された悪性黒色腫細胞塊の大きさの比較。左上：control、基剤点眼群、右上：5%トレハロース点眼群、左下7.5%トレハロース点眼群、右下：10%トレハロース点眼群。5%以上の濃度でトレハロ

ース点眼は悪性黒色腫細胞の増殖を抑制しているのが分かる。

図2の説明



腫瘍組織中央部横断面の面積の比較 (単位: mm²)

- 1. 対照基剤群 (n = 3)
- 2. 5%トレハロース点眼群 (n = 3)
- 3. 7.5%トレハロース点眼群 (n = 3)
- 4. 10%トレハロース点眼群 (n = 3)
- 5%以上の濃度のトレハロースはいずれも統計学的に有意に増殖を抑制した。

図3

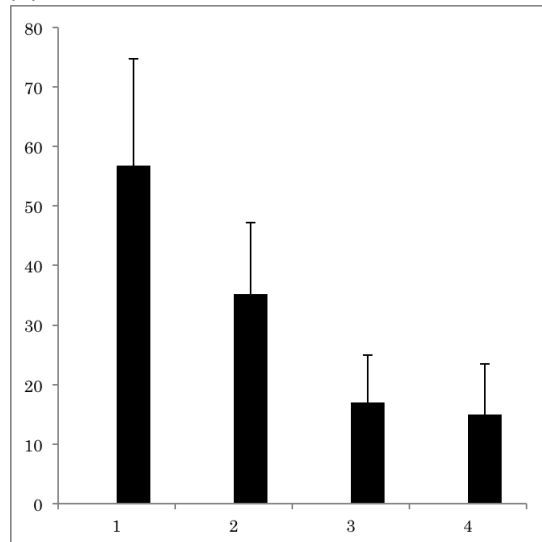


図3の説明

腫瘍組織中央部横断面の面積の比較 (単位: mm²)

- 1. 対照基剤群 (n = 3)
- 2. 5%トレハロース点眼群 (n = 3)
- 3. 7.5%トレハロース点眼群 (n = 3)

4 . 10%トレハロース点眼群 (n=3)
5 %以上の濃度のトレハロースはいずれも統計学的に有意に増殖を抑制した。

培養条件下では5 %トレハロース存在下で悪性黒色腫細胞がMTT アッセイにて有意に増殖が抑制された(図4)。

図4

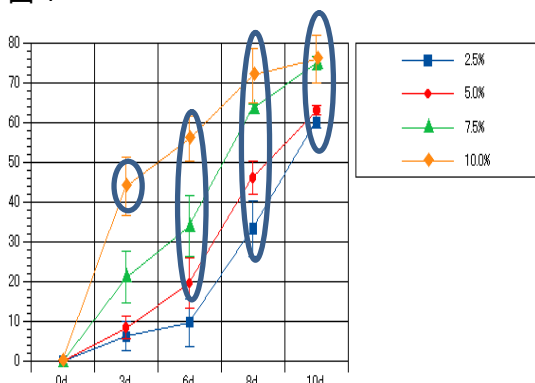


図4の説明

MTT アッセイ。各種濃度のトレハロース含有培養液中の悪性黒色腫の viability。縦軸は正常対照群に対する増殖抑制率を表している。各種濃度のトレハロースにて悪性黒色腫細胞の増殖が有意に抑制された。

フローサイトメトリーの結果、トレハロース存在下では培養細胞の G2/M 期の細胞が有意に増加しており(図5) 細胞サイクルの回転に対して抑制的に働く転写因子やアポトーシスを促進させるシグナル因子の発現が亢進していることが明らかとなった。

以上の結果から、5 %トレハロース点眼は結膜下に発生する悪性黒色腫に対して増殖抑制効果を示し、抗がん効果を持つ点眼療法開発の可能性が開かれた。

図5

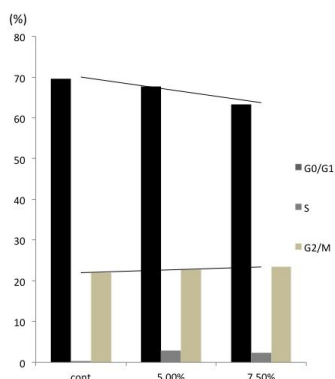


図5の説明

トレハロースの濃度が高くなるにつれ、G0/G1 期の細胞が減少し、G2/M 期の細胞が増加してくるのを示している。

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)

1 . 工藤孝志、鈴木 香、鈴木幸彦、工藤朝香、木村智美、伊藤 忠、片山君予、中澤 満：プロピルチオウラシルにより両球後視神経炎を生じた ANCA 関連血管炎の 1 例。臨床眼科 67(2), 209-213, 2013. 査読あり

2. Kudo T, Takeuchi K, Ebina Y, Nakazawa M. Inhibitory effects of trehalose on malignant melanoma cell growth: Implications for a novel topical anticancer agent on the ocular surface. ISRN Ophthalmology 2012, Article ID 968493, 1-9, doi:10.5402/2012/968493 査読あり

3 .Nakazawa M, Suzuki Y, Ito T, Metoki T, Kudo T, Ohguro H. Long-term effects of nilvadipine against progression of the central visual field defect in retinitis pigmentosa: An extended study. Biomed Res Int 2013; 2013:585729. Doi: 10.1155/585729. Epub 2013 Nov 12. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 工藤孝志、木村智美、安達功武、横井由美子、宮川靖博、鈴木幸彦、中澤 満、工藤香名江、伊藤勝博、大熊洋揮、黒瀬 顕 . 神経膠腫を疑い視神経鞘髄膜腫であることが判明した 1 例 . 第 66 回日本臨床眼科学会、京都、2012.10.25-28.

2. 工藤孝志
診断・治療方針に難儀した強膜・ぶどう膜炎の 1 例 . 第 6 回東北 6 大学眼科 Step Up セミナー、仙台 2012.9.23.

3. 工藤孝志、竹内侯雄、中澤 満 . Trehalose による melanoma 細胞抑制効果について. 第 119 回青森眼科集談会、弘前市、2010.10.31.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤孝志 (Kudo, Takashi)

弘前大学・医学部附属病院

研究者番号：20598718