

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861459

研究課題名(和文)クルクミンを用いた子宮平滑筋肉腫治療法の開発

研究課題名(英文)Development of the treatment for the uterine leiomyosarcoma using curcumin

研究代表者

築地 謙治(Tsuiji, Kenji)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40528155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：子宮平滑筋肉腫はまれな婦人科腫瘍であるが、化学療法が奏効しにくいなどの点から予後の極めて不良な腫瘍の一つである。クルクミンはこれまでも抗腫瘍効果など多彩な生物学的作用が証明されている。本研究では子宮平滑筋肉腫に対しクルクミンが細胞増殖抑制効果を示すか、そしてその機序について検討した。結果、ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株を用いた *in vitro*、*in vivo* の検討においてクルクミンの抗子宮平滑筋肉腫抑制効果が確認された。その機序には mTOR 経路、アポトーシスが関与していることが確認された。また、高吸収性クルクミンを用いることで天然型に比べ、より低濃度で効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Uterine leiomyosarcoma generally has an unfavorable response to standard chemotherapy. The active ingredient derived from the herb *Curcuma longa*, curcumin, shows antitumor properties in a variety of cancer cell lines by altering a number of oncogenetic pathways. To explore the possibility of curcumin as an alternative chemotherapy, we investigated curcumin's antitumor effect on uterine leiomyosarcoma. Human leiomyosarcoma cell lines, SKN and SK-UT-1, were cultured for *in vitro* and *in vivo* experiments. *In vitro* study, curcumin significantly reduced SKN and SK-UT-1 cell proliferation. *In vivo* study, curcumin reduced the volume and mass of uterine leiomyosarcoma significantly with a concordant decrease in mTOR pathway. Cleaved PARP and TUNEL staining increased significantly with curcumin administration, indicating the induction of apoptosis. In a summary, curcumin inhibited uterine leiomyosarcoma *in vitro* and *in vivo* by targeting mTOR pathway and inducing apoptosis.

研究分野：産婦人科

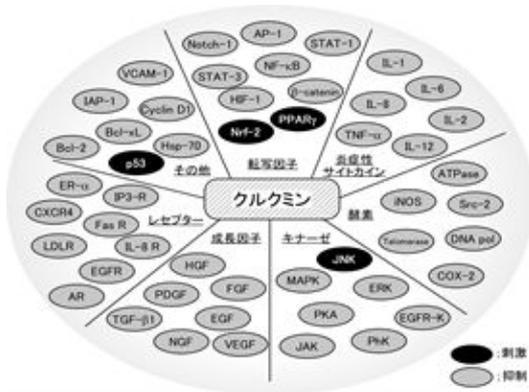
キーワード：子宮平滑筋肉腫 クルクミン モデルマウス mTOR

1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫はまれな婦人科腫瘍であり、子宮から発生した悪性腫瘍の約 1%を占めると言われている。子宮平滑筋肉腫は局所再発率が極めて高く、血行性遠隔転移も高率に認められる。また、標準的化学療法が奏効しにくいという特徴を持っているため、予後の極めて不良な腫瘍の一つである。具体的には、他の悪性腫瘍で汎用される抗癌剤であるシスプラチンの子宮平滑筋肉腫に対する奏効率は 3%と極めて低い。現在、子宮平滑筋肉腫に対する最も一般的な薬物治療はドキソルビシンを用いた治療であり、最大奏効率は 19~30%と言われている。ドキソルビシンとその他の抗癌剤を組み合わせた様々な臨床試験が行われたが、抗癌剤による毒性のみが増加し、治療効果が改善されない結果となった。従来の標準的化学療法による子宮平滑筋肉腫に対する治療はもはや限界に達しており、腫瘍発生、増殖における分子生物学的メカニズムを考慮した新たな分子標的療法の導入が切望される。

漢方治療をはじめとする伝統医学の中では、西洋医学では用いられない生薬由来成分が多数存在する。これらのなかには現代医学の中で応用可能なものも存在し、新たな創薬への可能性を秘めた物質の宝庫ともいえる。これまでの研究成果の中でも動物実験や分子生物学的手法により生薬成分の有効性を科学的に証明してきた[1, 2]。

クルクミンは香辛料(ターメリック)・生薬(ウコン)中の有効成分として単離された物質であり、抗腫瘍効果、抗酸化効果、抗炎症効果等の多彩な生物学的作用が証明されている。特に癌治療に対する多数の基礎的・臨床的報告がされており、癌細胞増殖における複数の重要なシグナル伝達経路を抑制することが *in vitro*・*in vivo* の実験系で証明されている[3]。細胞内情報伝達系の解析では、下図に示すようにクルクミンは多くの転写因子、キナーゼ、レセプター等に作用し、抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。また、クルクミンは通常の化学療法と比較し、ヒトへの投与でほとんど毒性を示さない。



子宮平滑筋肉腫では 10 番染色体長腕の欠損が認められている。10 番染色体の遺伝子座

は癌抑制遺伝子 PTEN を含み、PTEN はチロシンキナーゼのリン酸化標的である PIP3 (phosphatidylinositol-triphosphate) を脱リン酸化することにより細胞増殖を抑制する。一方、インスリン等の増殖因子によりチロシンキナーゼ受容体が活性化されると、mTOR (mammalian target of rapamycin) の上流に位置する AKT (RAC-alpha serine-threonine-protein kinase) がリン酸化され活性化される。また、平滑筋肉腫モデルマウスとして、平滑筋肉腫特異的 PTEN 遺伝子のノックアウトマウスにおける平滑筋肉腫の発生促進が報告されている。さらに、このマウスに対する mTOR 特異的阻害薬ラパマイシンアナログのエペロリムス投与による寿命延長を認め、平滑筋肉腫発生における mTOR シグナルの重要性が考えられる[4]。我々は、子宮平滑筋肉腫に対するクルクミンの効果について子宮平滑筋肉腫細胞株を用いた *in vitro* での細胞増殖抑制効果を報告した[5]。その検討においてクルクミンは AKT-mTOR シグナルを抑制することにより子宮平滑筋肉腫細胞の増殖を抑制した。

クルクミンをヒトに投与する際には腸管からの低吸収性という問題が存在する。そこで、我々は株式会社セラバリュースとの共同研究で、血中濃度を 30 倍に高めることが可能とされる高吸収性クルクミンの供給を受け、血中濃度や腫瘍組織の組織学的検討を用いて天然型クルクミンと違いが生じるかを検討する。当初の計画では高活性型クルクミンも検討課題としていたが、動物実験において毒性が確認されたため、本研究では高吸収性クルクミンに絞って成果を報告する。

2. 研究の目的

天然型クルクミンと高吸収性クルクミンの抑制効果の検討を *in vitro*、および子宮平滑筋肉腫細胞移植モデルマウスを用いた *in vivo* で検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 (SKN および SK-UT-1) を用いた天然型および高吸収性クルクミンの細胞増殖抑制効果の検討 (*in vitro*)。

5,000 細胞/well で播種した SKN 細胞株および、10,000 細胞/well で播種した SK-UT-1 細胞株に対し、播種から 24 時間後に天然型クルクミンもしくは高吸収性クルクミンを 0、10、20、50、100 μ M の濃度で添加し、72 時間後に細胞増殖試験を行った。細胞増殖試験は MTS assay および Cell count にて評価した。

(2) 子宮平滑筋肉腫細胞移植モデルマウスに対する天然型クルクミンの細胞増殖抑制効果の検討 (*in vivo*)。

in vivo の検討では、ヒト子宮平滑筋腫細胞株のうち、SK-UT-1 を用いることとした。日本クレアより 5~6 週齢の BALB/cAJC 雌性ヌードマウスを購入し、1 週間の予備飼育を行った。10⁷ の SK-UT-1 細胞株をマウスの背部 2 ヶ所に移植した。7 日間生着させ、移植 8 日目より 250 mg/kg/day の天然型クルクミンを 2 週間投与した。コントロール群には同量のコーンオイルを投与した。投与開始から連日生着組織のサイズを計測した。2 週間の投与後、マウスを解剖し、腫瘍組織の重量および組織の組織学的検討を行った。組織学的検討は、クルクミンの作用として注目している mTOR のリン酸化およびトータル、S6 のリン酸化の免疫染色を行った。さらにアポトーシスの評価として C-PARP の免疫染色および TUNEL 染色を行った。細胞増殖の指標として Ki-67 の免疫染色も行った。

(3) 子宮平滑筋腫細胞移植モデルマウスに対する天然型クルクミンおよび高吸収性クルクミンの細胞増殖抑制効果の比較検討 (in vivo)。

前述の研究の方法(2)と同様の方法でヒト子宮平滑筋腫細胞移植モデルマウスを作成した。同様の期間において今回は天然型クルクミンおよび高吸収性クルクミンを 50 もしくは 250 mg/kg/day で連日経口投与した。コントロールは前述同様である。2 週間の投与の後、腫瘍組織のサイズ、重量を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト子宮平滑筋腫細胞株 (SKN および SK-UT-1) を用いた天然型および高吸収性クルクミンの細胞増殖抑制効果の検討 (in vitro)。

SKN 細胞および SK-UT-1 細胞において、クルクミンおよび高吸収性クルクミン共に 20 μM より濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示した(図 1A, B, C, D)。よって、in vitro において高吸収性クルクミンにも天然型クルクミンと同等の子宮平滑筋腫細胞増殖抑制能を有することが確認された。

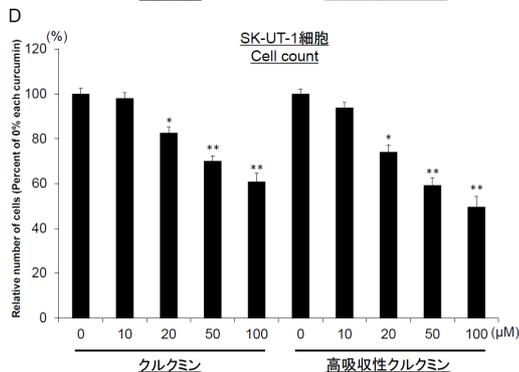
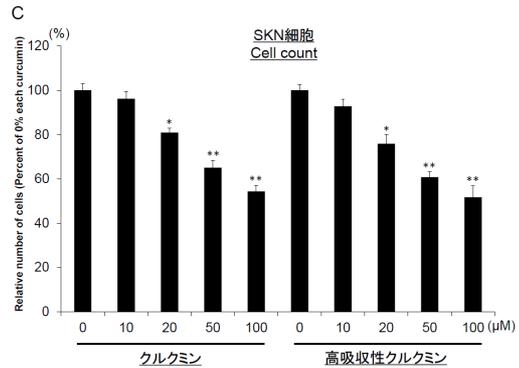
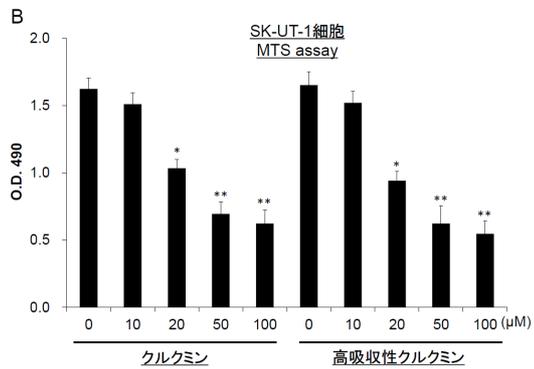
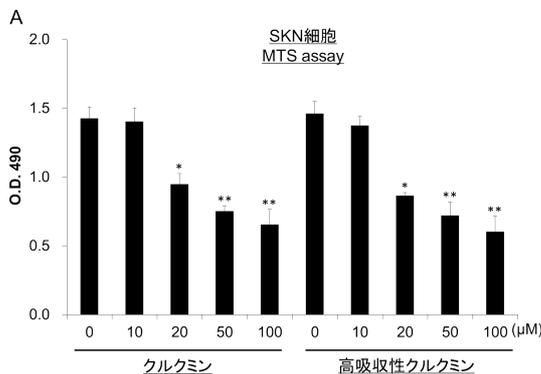
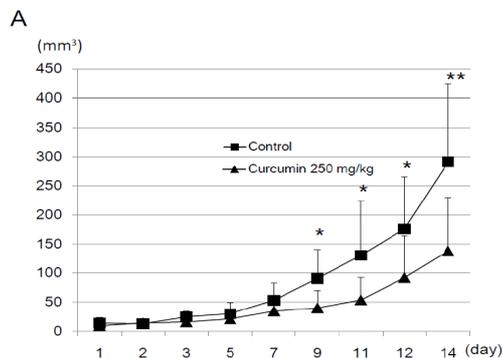


図 1 天然型および高吸収性クルクミンの子宮平滑筋腫細胞増殖抑制効果

(2) 子宮平滑筋腫細胞移植モデルマウスに対する天然型クルクミンの細胞増殖抑制効果の検討 (in vivo)。

天然型クルクミン 250 mg/kg/day 投与により移植後 9 日目よりコントロールと比べ、有意に腫瘍組織サイズの増大が減弱した(図 2A)。移植 14 日目に摘出した腫瘍重量も天然型クルクミン投与群で有意に低かった(図 2B)。よって、in vivo においても天然型クルクミンが in vitro の結果同様、子宮平滑筋腫細胞増殖抑制能を有することが確認された。



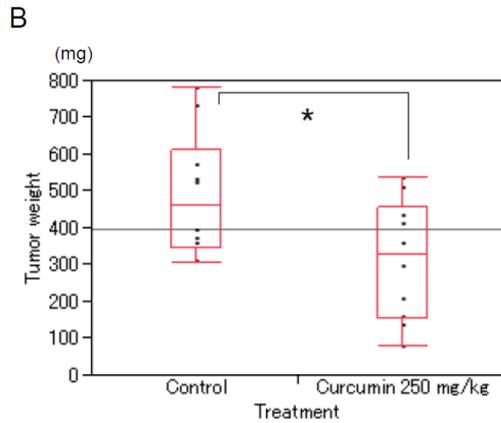


図 2 クルクミン投与による移植組織のサイズおよび重量変化

摘出した腫瘍組織の組織学的検討では、クルクミンの投与により、リン酸化 mTOR の発現が有意に減少したが(図 3A)、トータルの mTOR 発現は変化しなかった(図 3B)。また、リン酸化 S6 の発現もクルクミン投与により有意に減少した(図 3C)。

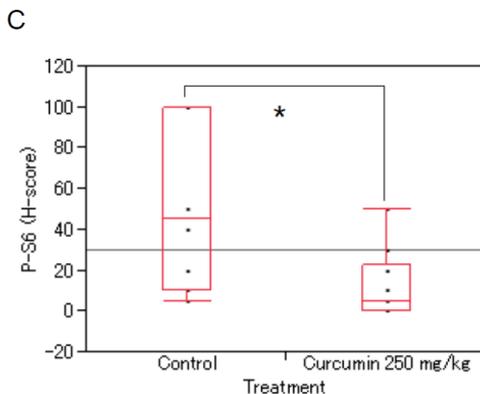
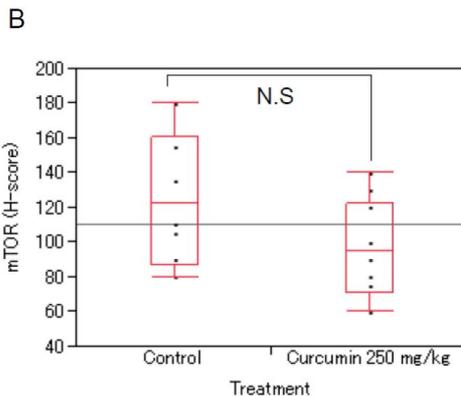
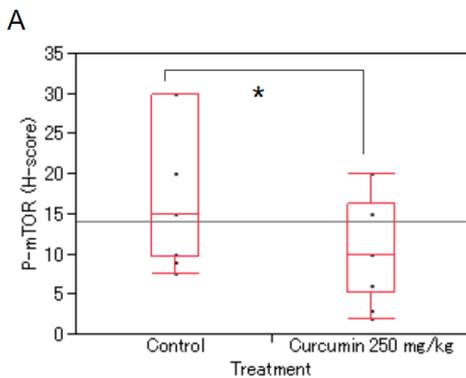


図 3 クルクミン投与による mTOR 経路の蛋白発現の組織学的検討。A:リン酸化 mTOR、B:トータル mTOR、C:リン酸化 S6

さらに、アポトーシスの評価となる C-PARP の発現および TUNEL 染色の結果、クルクミンの投与により C-PARP の発現が増加し(図 4A)、TUNEL 陽性細胞が増加した(図 4B)。細胞増殖を評価する Ki-67 の免疫染色では、クルクミン投与により有意に発現が減少した(図 4C)。

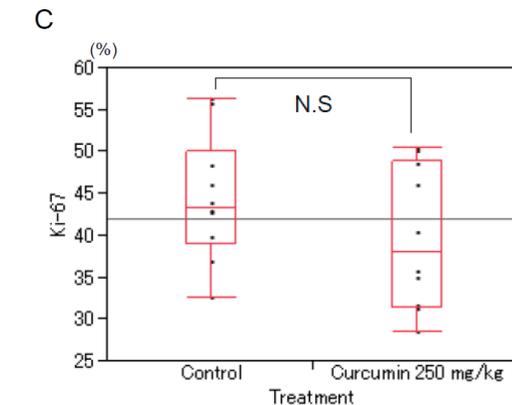
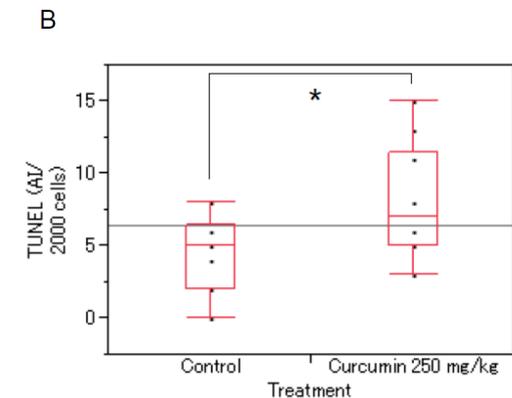
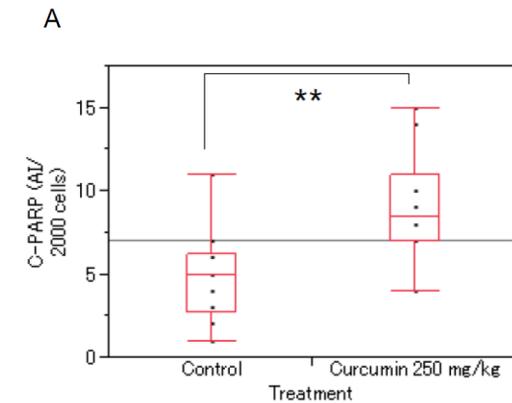


図 4 クルクミン投与によるアポトーシスおよび細胞増殖の組織学的検討。A:C-PARP、B:TUNEL 染色、C:Ki-67

(3) 子宮平滑筋肉腫細胞移植モデルマウスに対する天然型クルクミンおよび高吸収性クルクミンの細胞増殖抑制効果の比較検討(in vivo)。天然型クルクミンおよび高吸収性クルクミンを各 50 mg もしくは 250 mg/kg/day で投与し、腫瘍サイズおよび重量を比較検討した。

結果、2週間の投与後における摘出腫瘍のサイズは天然型クルクミンでは250 mg 投与でのみサイズが減少したが、高吸収性クルクミンでは50 mg 投与から減少が確認された(図5A)。重量に関しても同様の結果であった(図5B)。

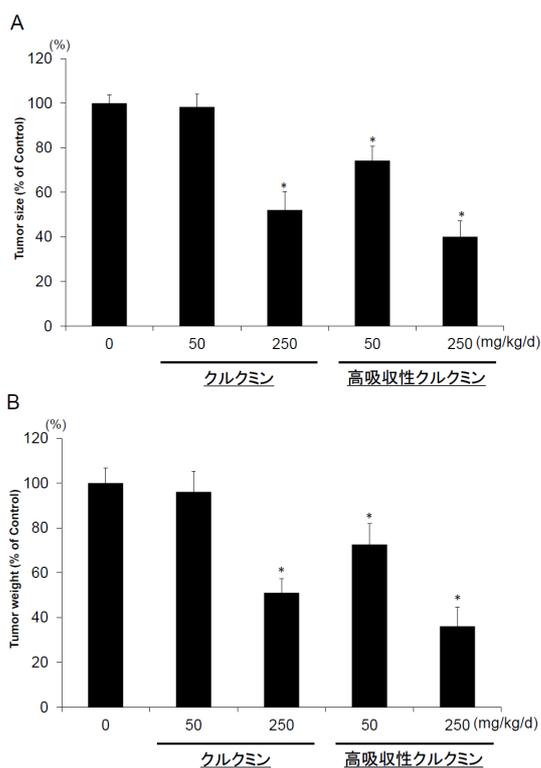


図5 天然型クルクミンおよび高吸収性クルクミン投与による移植組織のサイズおよび重量変化

以上の結果より、クルクミンは mTOR 経路に働きかけることで子宮平滑筋肉腫細胞の細胞増殖抑制を誘導し、かつアポトーシスも誘導させることが確認された。また、高吸収性クルクミンを用いることで、より低用量で高い腫瘍抑制効果を得られることも確認された。クルクミンの今後の臨床応用が大いに期待される。

<引用文献>

Yamaguchi R, Yamamoto M, Imoto S, Nagasaki M, Yoshida R, Tsuiji K, Ishige A, Asou H, Watanabe K, Miyano S. Identification of activated transcription factors from microarray gene expression data of Kampo medicine-treated mice. *Genome Inform.* 2007;18:119-29.

Imazu Y, Tsuiji K, Toda T, Ishige A, Sugiyama K, Benno Y, Watanabe K, Kitajima M. Juzentaihoto reduces post-partial hepatectomy hyperammonemia by stabilizing intestinal microbiota. *J Tradition Med.* 2006 23:208-215

Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal

BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008 Feb 15;75(4):787-809.

Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, Socci ND, Behrendt N, Ma L, Maki RG, Pandolfi PP, Cordon-Cardo C. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nat Med.* 2007 Jun;13(6):748-53.

Wong TF, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Kitamura M, Kondo A, Yaegashi N. Curcumin disrupts uterine leiomyosarcoma cells through AKT-mTOR pathway inhibition. *Gynecol Oncol.* 2011 Jul;122(1):141-8.

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1件)

Wong TF, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Kondo A, Tadakawa M, Nagase S, Yaegashi N. Curcumin targets the AKT-mTOR pathway for uterine leiomyosarcoma tumor growth suppression. *Int J Clin Oncol.* 2014 Apr; 19(2):354-63.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

築地 謙治 (Tsuiji, Kenji)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40528155

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：