

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460496

研究課題名(和文) KPCマウスを用いた膵癌微小環境を標的とした新薬の同定

研究課題名(英文) Identification of new anti-cancer drug for microenvironment in pancreatic cancer using KPC mouse

研究代表者

佐野 誠 (SANO, Makoto)

日本大学・医学部・兼任講師

研究者番号：70339323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インディルビン誘導体のライブラリーから、線維芽細胞のスフェロイド形成には影響を示さないが、膵管癌細胞と線維芽細胞との共培養におけるスフェロイド形成と細胞増殖を阻害する2種類のインディルビン誘導体(Indoxと5MeOIndox)を同定した。また膵管癌の皮下移植モデルにおいても同様に、Indoxと5MeOIndoxの抗腫瘍効果が認められた。さらに、5MeOIndoxはIndoxに比べてp-CDK1/Cyclin B1レベルの低下からG2/M arrestを引き起こし、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。膵管癌の自然発症モデルを用いた同化合物の抗腫瘍効果は、現在英文誌へ投稿準備中である。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive cancer. To identify effective anti-cancer drugs for PDAC, we established a screening system based on spheroid formation. We found that indirubin 3'-oxime (Indox) and 5-methoxyindirubin 3'-oxime (5MeOIndox) inhibited PDAC cell proliferation. Furthermore, PDAC xenograft growth was also inhibited in BALB/c nu/nu mice after administration of Indox and 5MeOIndox. Both phosphorylated CDK1 and cyclin B1 levels in PDAC cells were significantly reduced by treatment with Indox and 5MeOIndox in vitro and in vivo. Cell cycle analysis revealed that 5MeOIndox, but not Indox, induced G2/M arrest. Annexin V-propidium iodide double-staining analysis demonstrated that Indox induced abundant non-apoptotic cell death of PDAC cells, while 5MeOIndox predominantly induced early apoptosis. These results suggest that one mechanism of 5MeOIndox is to induce G2/M arrest of PDAC cells via inhibition of CDK1/cyclin B1 levels, thereby leading to apoptosis.

研究分野：実験病理学

キーワード：膵管癌 トランスジェニックマウス 新薬開発 トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵管癌は未だに早期診断・治療が困難な悪性腫瘍である。術後再発例を含む切除不能膵癌においては、ゲムシタピン (GEM) を中心とした化学療法が行われてきたが、GEM 単独あるいは TS-1 などその他の抗癌剤との併用においても2年生存率は10%前後と予後不良である。したがって、従来の抗癌剤とは作用メカニズムの異なる新薬の開発が必要であると考えられる。

インディルピンは古くから藍染や漢方薬に含まれる成分の一つとして知られるインドール誘導体の二量体であり、サイクリン依存性キナーゼ (CDKs) の ATP 結合領域に作用し、G2/M 期アレストを誘導することで注目されるようになった。その後、様々なインディルピン誘導体において Kras シグナル経路の阻害や TGF- β 経路の阻害、GSK-3 β を介した Wnt/ β -カテニン経路、Src, Akt, STAT3 のリン酸化の阻害による癌の遊走浸潤ならびに転移の抑制が示唆されている。一方、浸潤性膵管癌に対するインディルピン誘導体の抗腫瘍効果はよく知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究においては、膵管癌と間質の相互作用 (微小環境) を標的とするインディルピン誘導体の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 膵管癌特異的インディルピン誘導体の *in vitro* 一次スクリーニング

膵管癌細胞株と間質細胞 (線維芽細胞) を混合あるいは単独で三次元培養し、インディルピン誘導体を添加した。スフェロイド形成ならびに増殖阻害を示す化合物を、スフェロイド体積の減少とアラマー青試薬による細胞活性の低下によりスクリーニングした。次に、スクリーニングしたインディルピン誘導体に関しては、濃度依存的な細胞障害が生じる化合物のみを選択した。

(2) 膵管癌の移植モデルにおけるインディルピン誘導体の *in vivo* 抗腫瘍効果の判定

膵管癌細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成を確認した後、一次スクリーニングで得られた2種類のインディルピン誘導体を腹腔内に投与した。エンドポイントにおいて皮下腫瘍を採取し、病理組織学的に同薬剤の抗腫瘍効果を解析した。細胞増殖の指標として細胞分裂数と p-ToPo II α 陽性 (M 期) の細胞数で評価した。また細胞周期に関わる p-CDK1 と Cyclin B1 の発現を免疫染色により解析を行った。壊死とアポトーシスの範囲を HE 染色ならびに Caspase 3 の免疫染色により検討した。

(3) インディルピン誘導体の抗腫瘍メカニズ

ムの解析

膵管癌細胞株に対してインディルピン誘導体を *in vitro* で添加した後、p-CDK1 と Cyclin B1 の発現を経時的にウェスタンブロッティング法により解析した。次に、インディルピン誘導体投与後の細胞周期の変化をフローサイトメーターにより解析した。さらに、インディルピン誘導体投与とアポトーシス誘導との関連をより詳細に解析するために、アネキシン V-PI 染色後にフローサイトメーターで検討した。

(4) 膵癌自然発症モデルマウスにおけるインディルピン誘導体の抗腫瘍効果判定

膵管癌を自然発症するトランスジェニックマウス (LSL-Kras^{G12D}, Trp53^{flox/+}, Pdx1-cre マウス) をまず作製した。次に皮下移植モデルと同様に、2種類のインディルピン誘導体を腹腔内に投与し、コントロール (DMSO/PEG400) 投与群との生存率の比較を行った。エンドポイントで膵腫瘍を採取し、同化合物の抗腫瘍効果を病理組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) Indox と 5MeOIndox は膵管癌特異的なスフェロイド形成と増殖を抑制する

インディルピン誘導体のライブラリーのなかから、線維芽細胞のスフェロイド形成には影響を示さないが、膵管癌細胞ならびに膵管癌細胞と線維芽細胞との共培養におけるスフェロイド形成と細胞増殖を有意に阻害するインディルピン誘導体 8 種類を見出した。さらに、8 種類のインディルピン誘導体から、濃度依存的なスフェロイド形成ならびに増殖抑制をする2種類のインディルピン誘導体のインディルピン 3'-オキシム (図 1; Indox) と 5-メトキシインディルピン 3'-オキシム (図 2; 5MeOIndox) に絞り込んだ (図 3)。

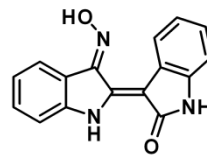


図 1. indirubin 3'-oxime (Indox)

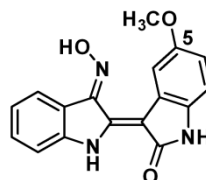


図 2. 5-methoxyindirubin 3'-oxime (5MeOIndox)

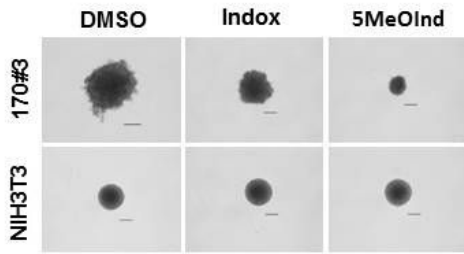


図3) Indoxと5MeOIndoxの抗腫瘍効果
線維芽細胞NIH/3T3細胞には影響を示さないが、
マウス膵管癌細胞株170#3のスフェロイド形成
を有意に抑制している。

(2) Indox と 5MeOIndox は膵管癌の *in vivo* 移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示す

Indox と 5MeOIndox は膵管癌細胞の皮下移植モデルにおいても有意な抗腫瘍効果が認められた。Indox と 5MeOIndox を投与した移植腫瘍においては、コントロール群に比べて細胞分裂数 (図 4) と p-ToPoII α 陽性 (M 期) 細胞の減少 (図 5) を認めた。さらに Indox と 5MeOIndox を投与した移植腫瘍においては、p-CDK1 (図 6) と Cyclin B1 陽性細胞の減少 (図 7) が有意に認められた。また一方で、同インディルピン誘導体を投与した群においては、細胞死領域全体に占める Caspase 3 陽性アポトーシスの割合が増加することが明らかとなった (図 8)。

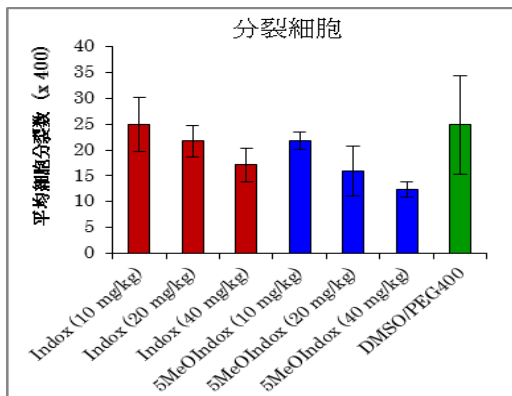


図 4. 移植腫瘍組織における分裂細胞数

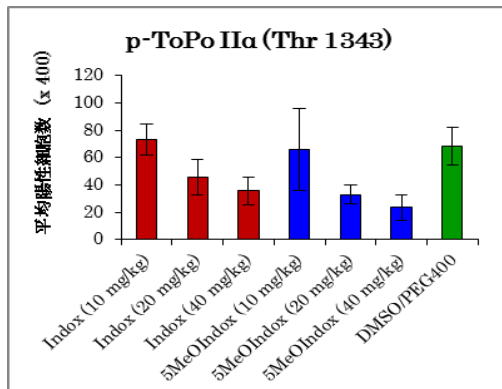


図 5. 移植腫瘍における P-ToPoII α 陽性細胞

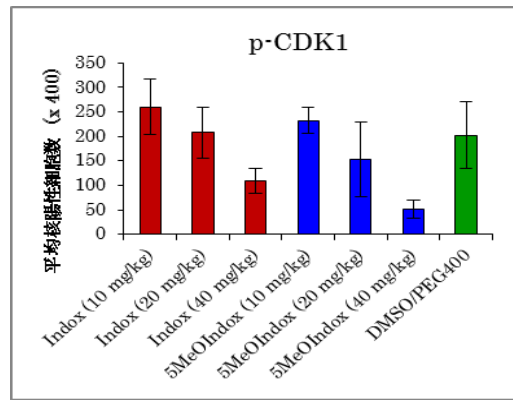


図 6. 移植腫瘍における p-CDK1 陽性細胞数

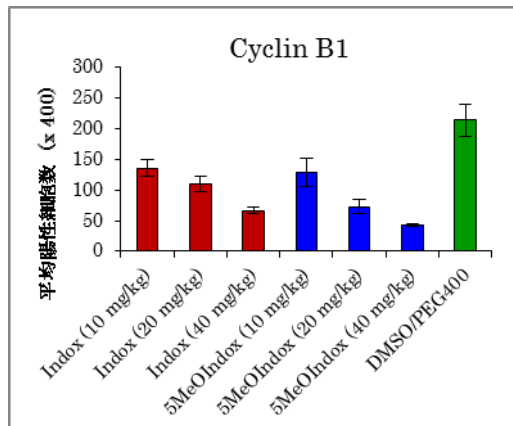


図 7. 移植腫瘍における cyclin B1 陽性細胞数

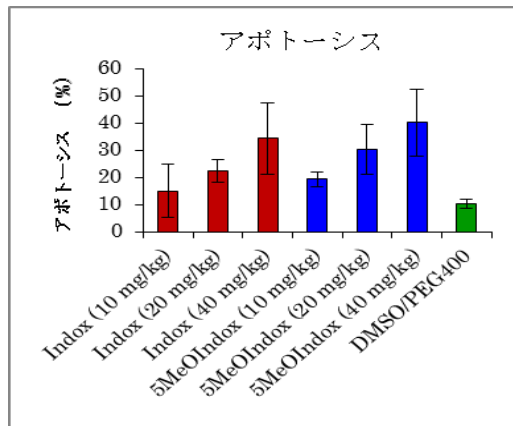


図 8. 移植腫瘍におけるアポトーシス

(3) 5MeOIndox は p-CDK1/Cyclin B1 低下, G2/M 期アレスト, アポトーシスを誘導する

Indox と 5MeOIndox は膵癌細胞株における p-CDK1 と Cyclin B1 の発現を濃度依存的に低下させることが明らかとなった。さらに膵癌細胞株に対して 5MeOIndox を添加した場合には G2/M 期アレストを引き起こし、アポトーシスへ至る sub-G1 期の割合が上昇した (図 9)。また、アネキシン V-PI 染色後のフローサイトメーター解析においても同様に、5MeOIndox が膵管癌細胞のアポトーシスを有意に誘導することが明らかとなった。

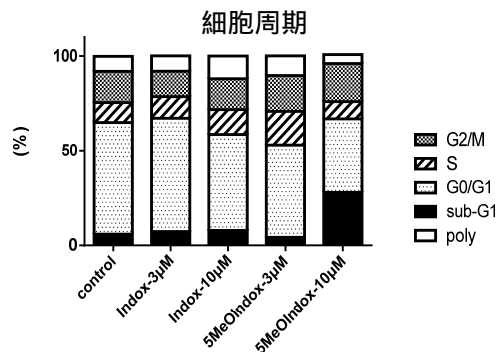


図9. 誘導体投与後の細胞周期変化

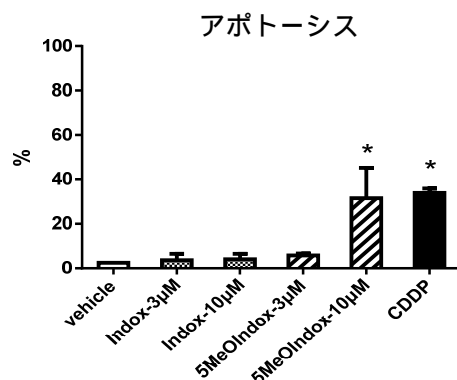


図10. 膵癌細胞におけるアポトーシスの誘導

(4) Indox と 5MeOIndox は膵癌自然発症モデルマウスの生存を延長する

膵管癌の自然発症 KPC マウス (LSL-Kras^{G12D}, Trp53^{fllox/+}, Pdx1-cre マウス) に対して, Indox と 5MeOIndox を投与した群はコントロール群に比べて生存期間を延長させることが明らかとなった. 現在, そのメカニズムも含めて英文誌へ投稿準備中である.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sano M, Ichimaru Y, Kurita M, Hayashi E, Homma T, Saito H, Masuda S, Nemoto N, Hemmi A, Suzuki T, Miyairi S, Hao H: Induction of cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma by indirubin 3'-oxime and 5-methoxyindirubin 3'-oxime in vitro and in vivo, Cancer Letters, 397: 72-82, 2017. 査読有
doi: 10.1016/j.canlet.2017.03.031.

〔学会発表〕(計3件)

佐野 誠, 市丸 嘉, 林 恵美子, 齋藤弘明, 本間 琢, 廣谷ゆかり, 根本則道, 増田しのぶ, 逸見明博, 宮入伸一, 羽尾裕之: 膵癌移植モデルにおけるインディルビン誘導体の抗腫瘍効果. 第106回日本病理学会総会 2017年4月27日, 新宿京王プラザホテル(東京都新宿区)

市丸 嘉, 佐野 誠, 齋藤弘明, 飯島洋, 宮入伸一: 5-Methoxyindirubin 3'-oxime の抗腫瘍作用: 腫瘍細胞選択的スフェロイド形成阻害活性と実験治療. 第60回日本薬学会関東支部大会 2016年9月17日, 東京大学(東京都文京区)

佐野 誠, 市丸 嘉, 林 恵美子, 齋藤弘明, 本間 琢, 廣谷ゆかり, 勝沼真由美, 根本則道, 増田しのぶ, 逸見明博, 宮入伸一, 羽尾裕之: 膵管癌に対するインディルビン誘導体の抗腫瘍効果. 第57回日本組織細胞化学会総会 2016年9月3日, 杏林大学井の頭キャンパス(東京都三鷹市)

〔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〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 誠 (SANO, Makoto)
日本大学・医学部・兼任講師
研究者番号: 70339323

(2) 研究分担者

宮入 伸一 (MIYAIRI, Sinichi)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号: 50209855

(3) 連携研究者

本間 琢 (HOMMA, Taku)
日本大学・医学部・准教授
研究者番号: 00307852

齋藤 弘明 (SAITO, Hiroki)

日本大学・薬学部・助教
研究者番号: 30385976

(4) 研究協力者

ルイス ブライアン (LEWIS, Brian)

市丸 嘉 (ICHIMARU, Yoshimi)

廣谷 ゆかり (HIROTANI, Yukari)

内田 圭 (UCHIDA, Kei)

ベゼハ マリナ; ナガタニ ユキエ
(BEZEHA, Marina; NAGATANI, Yukie)

渡辺 麻裕 (WATANABE, Mayu)