

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592327

研究課題名(和文)ノスカピン誘導体EM011の腎細胞癌に対する抗腫瘍効果及びそのメカニズムの検討

研究課題名(英文)Effect of Noscapine and its derivative, EM101, on renal cell cancer and their mechanisms

研究代表者

宮城 徹(MIYAGI, Toru)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60467107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ノスカピンは臨床的に使用可能な安全な薬であり、MDR発現癌にも抗腫瘍作用が認められている。腎癌の薬剤耐性にMDR高発現が関与すると考えられているため、腎癌細胞ACHNにノスカピンを加え、*in vitro*、*in vivo*において抗腫瘍効果を確認した。前立腺癌細胞株においても抗腫瘍効果を確認し、MDR高発現しているパクリタキセル耐性前立腺癌細胞株DU145-TxRでも同様の抗腫瘍効果を観察した。さらに、前立腺癌においてノスカピンと植物フラボノイドによる相乗的効果を期待する目的で、植物フラボノイドのアンドロゲン応答性に対する抑制効果を調査し、ナリンゲニンが強い抑制作用のあることを観察した。

研究成果の概要(英文)：Noscapine is clinically available safe medicine, and antitumor action is found in MDR-overexpressing cancer. Because it was considered that MDR overexpression was involved in drug resistance of the renal carcinoma, we added Noscapine to renal carcinoma cells ACHN and confirmed antitumor effect in *in vitro* and *in vivo*. We confirmed antitumor effect in the prostate cancer cell line. Noscapine inhibited the proliferation of not only androgen-independent prostate cancer cells DU145 but also DU145-TxR which is resistant for paclitaxel and docetaxel. DU145-TxR overexpressed MDR mRNA and p-glycoprotein that stimulate. For the purpose of expecting a synergistic effect with noscapine and flavonoids in prostate cancer, we investigated the effect of flavonoids on the androgen responsiveness. After LNCaP cells were transfected with PSA promoter-driven Luciferase reporter, cells were treated with DHT with flavonoids. Then naringenin showed the strong suppression of androgen responsiveness.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：Noscapine renal cell cancer prostate cancer flavonoids docetaxel

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌には、薬剤耐性遺伝子(MDR)からコードされるP糖タンパクの発現が亢進しているため、抗癌剤が細胞外に容易に排出されるため、有効な化学療法剤がないのが現状である。このためTKIやmTOR阻害薬などの分子標的治療薬が使用されているが、根治は期待できず、治療が困難な状況である。ノスカピンは臨床的に使用可能な安全で安価な薬であり、MDR発現癌にも抗腫瘍作用が認められている。しかし、その作用機序についてはまだ不明な点が多い。一方で前立腺癌は初期にはホルモン治療が著効するがそのホルモン治療に抵抗性となった場合にはタキソテルが使用されるが副作用もあり投与量が限られることや前立腺癌細胞自体の耐性化などから難治性となることが知られている。

2. 研究の目的

ノスカピンの抗腫瘍効果を増強した誘導体(EM011)の腎細胞癌細胞株および我々が作成した化学療法抵抗性前立腺癌細胞株、さらには分子標的治療薬抵抗性腎細胞癌細胞株に対する有効性を確認し、化学療法抵抗性前立腺癌や腎細胞癌に対して有効な治療薬となりえるのかを検討し、さらにその薬剤耐性の回避機序についても検討する。腎細胞癌に対する安全で、安価な治療手段の確立とともに、化学療法抵抗性前立腺癌・さらには分子標的治療薬抵抗性腎細胞癌など難治性泌尿器癌種にたいする新たな治療選択として使用可能性をさぐるとともに、さらに他癌腫の多剤耐性遺伝子発現株に対する治療戦略の開発にも寄与すると考えられる。

3. 研究の方法

まずは*in-vitro*での実験系を確立する。まず腎癌細胞株はcaki-1 KMRC-3 KMRC-5 ACHNなどから細胞株の増殖スピード、シャーレへの接着性などより、扱いやすい細胞株であるかどうかを判断し研究に使用する。化学療法抵抗性前立腺がん細胞株は当教室にて作成された細胞株を使用予定である。その次のステップとして96well plateを使用し、細胞を一定数(500-1000個/well)播き、一晚定着させた後、0-100uMまでの濃度に調整したノスカピンを投入し、2~3日培養後、細胞活性をWST-1 assayにて測定し、IC50を設定していく。

その後、*In-vivo*の動物実験系を完成させる。これは先に述べたような方法により進めていく、一つの動物実験が終了するまでに2ヶ月程度を見込んでいく。(細胞が定着するのに2-3週間、その後治療を一月ほど継続し、効果があるのかを確認していく。)この一連の実験を複数回(それぞれの腎癌細胞株について)検証していく必要があり、

これには半年以上かかるのではないかと予想している。また副作用の検証としてマウスの体重測定を行い経時的変化を確認していく予定であり、さらにsacrifice時には腫瘍臓器を摘出しH/E染色を行い、組織学的に変化がないかを確認していく。

In-vitro, *In-vivo*において一定の効果が確認できた場合には、抗腫瘍効果のメカニズムについて研究を進めていく予定である。具体的には、抗腫瘍効果のメカニズムとして、アポトーシスが起きているのかどうかを確認する。さらに可能であれば、ノスカピンやEM011が有効な細胞株と無効な細胞株が存在するのであれば、それぞれの細胞株によってp21/p53の発現の変化が起きているのかどうか等についても検討を行う。

また多剤耐性の細胞株にもEM011が有効であるのかどうかを調べるため、化学療法抵抗性前立腺癌細胞株にEM011の抗腫瘍効果が認められるのかを確認する。

分子標的治療薬抵抗性腎細胞癌細胞株を作成し、これらにもEM011の治療効果が認められるのかを検討する。また分子標的治療薬抵抗性細胞株に有効な場合にはそのメカニズムについて検討を行う。

腎細胞癌・前立腺癌細胞にたいしてもノスカピンとEM011はROSを発生させ結果的にautophagyと成るのかを確認する。正常腎細胞にも同様にautophagyが起こるのかを確認し、がん細胞と正常細胞とでノスカピンの作用が違ってくるのかを微小管に対する蛍光染色を施行し蛍光顕微鏡にて形態的に確認する。

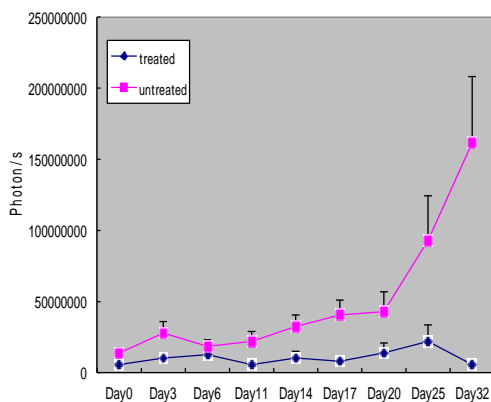
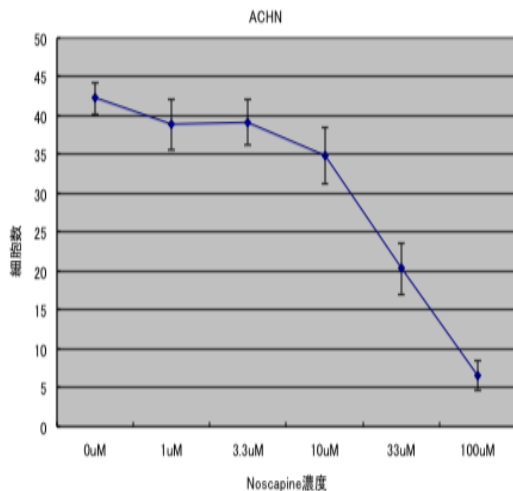
4. 研究成果

当初使用する予定であったノスカピンの抗腫瘍効果を増強した誘導体(EM011)の入手が困難となったため、ノスカピンそのものを使用しての研究を行った。

まず、細胞測定系の確率であるが、我々は腎癌細胞株ACHNを使用して、ノスカピンの抗腫瘍効果の確認を行った。当初は簡便な測定系としてWST-1 assayやMTT assayで抗腫瘍効果を試みたが、実際の細胞数カウントと同じ結果とならず、明らかな誤差が生じる結果となっていた。このため、実際に細胞のカウントを行い、抗腫瘍効果を判定することとした。

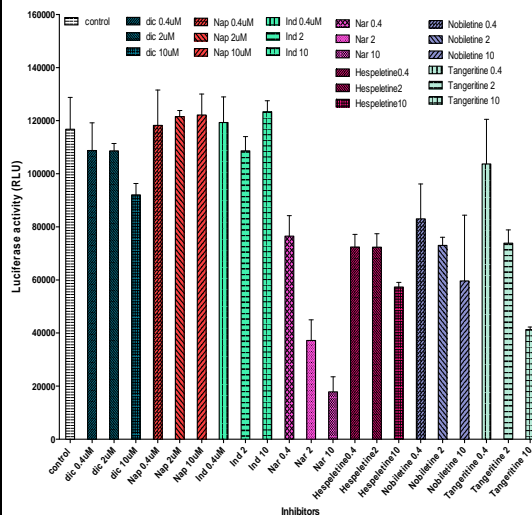
動物実験系では手技の確立も狙い、ノスカピンの毒性を確認することから始めた。マウスにノスカピンを溶解させた水をゾンデで強制経口法にて投与した。しかし、投与後に突然呼吸困難となり死亡するマウスが確認された。誤嚥による呼吸困難の可能性があると考えているが、明らかに投与後体重減少を

起こして痩せていくマウスも認めため、おそらく投与時に消化管穿孔を起こしたものと思われた。一部のマウスでは器官をH/E染色して臓器障害のないことを確認した。最終的に腎癌細胞株ACHNをSCID mouseの皮下に移植し、強制経口法によりノスカピンを投与して、抗腫瘍効果を確認した。



腎癌細胞株とともに前立腺癌細胞株においてもノスカピンの抗腫瘍効果をあらためて確認した。アンドロゲン依存性細胞株LNCaPとアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株PC-3のノスカピンに対するIC50はそれぞれ7.7 microM, 5.5 microMであった。次に、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株PC-3とDU145を用いて、よりドセタキセル耐性株の樹立を試み、その耐性株を用いてノスカピンの抗腫瘍効果を試みる予定であった。まず、ドセタキセルのIC50の濃度で細胞を培養し、その濃度にて2週間耐え、増殖するようになった細胞を回収。さらにその細胞でIC50を決定して、その濃度で増殖するようになった細胞を回収していった。このようにして徐々にドセタキセルの濃度を上げていき、耐性株が樹立できる予定であったが、2回IC50を決定したところで細胞増殖が停止して、ドセタキセル耐性株の樹立に手間取り、最終的には樹立に失敗した。このため、以前当教室で樹立していた

パクリタキセル耐性前立腺癌細胞株に対して、ノスカピンがどのように抗腫瘍効果を持つのかを研究した。ノスカピンは親株と同様にドセタキセル耐性株に対しても in vitroにおいて抗腫瘍効果を示した。当教室で樹立したパクリタキセル耐性前立腺癌培養細胞株PC-3-TxRとDU145-TxRを用いてノスカピンの抗腫瘍効果を確認した。PC-3-TxRとDU145-TxRはドセタキセルに対しても交差耐性を示している。親株であるアンドロゲン非依存性細胞株PC-3とDU145に対してノスカピンを投与して、抗腫瘍効果を観察したが、耐性株においても同程度の抗腫瘍効果を示した。ドセタキセル、パクリタキセル耐性にはMDR-1からコードされるP-glycoproteinが発現を亢進して薬剤を細胞外に排出させるはたらきがあるが、ノスカピンはP-glycoproteinと親和性があまりないと考えられた。このノスカピンの作用に対して、抗腫瘍作用を持ち天然に存在している植物フラボノイドとの相乗的作用を検討する目的で、NSAIDであるIndomethacinやNaproxenや様々な植物フラボノイド(Tangeritin, Nobiretine, Hesperitin, Naringenin)を用いて前立腺癌細胞LNCaPに対するアンドロゲン応答能への影響をまず明らかにした。IndomethacinやNaproxenはほとんどアンドロゲン応答性を変濁せなかったが、植物フラボノイドはすべて濃度依存的にアンドロゲン応答性を減弱させた。特にNaringeninの作用が最も強く10 μMの濃度で、アンドロゲン応答性を1/5以下に低下させた。



5. 主な発表論文等 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮城 徹 (MIYAGI Toru)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60467107

(2) 研究分担者

溝上 敦 (MIZOMAMI Atsushi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：50248580

小中 弘之 (KONAKA Hiroyuki)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：40334768

重原 一慶 (SHIGEHARA Kazuyoshi)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20595459