

主論文の要旨

**Cyclodextrin Conjugated α -Bisabolol Suppresses
FAK Phosphorylation and Induces Apoptosis in
Pancreatic Cancer**

膵臓癌に対するシクロデキストリン抱合化ビスアボロールによる
FAKリン酸化抑制とアポトーシス誘導について

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：江畑 智希 教授)

加納 三喜子

【緒言】

ビスボロールはカモミールなどの植物から抽出される精油成分であり、難溶性の化合物である。グリオーマや肺小細胞癌などに対する抗腫瘍効果について報告されており、我々もこれまで膵臓癌に対するビスボロールの増殖能、浸潤能および運動能の抑制など抗腫瘍効果について報告している。膵臓癌はいまだに難治性悪性腫瘍の一つであり、患者予後改善のために新規治療薬が期待されている。ビスボロールは候補化合物の一つと考えられるが、その難溶性のため、臨床応用が困難であり、可溶化およびその検討が必要である。

シクロデキストリンは D-グルコースが結合により環状構造をとった環状オリゴ糖で溶媒として広く用いられている。シクロデキストリン抱合化 α ビサボロール (CD-BSB) の開発によりビスボロールの溶解性を改善し、静脈内投与が可能となった。しかし、シクロデキストリンの抱合化による α ビサボロールへの影響や CD-BSB の有効性については不明である。

本研究の目的は、膵臓癌に対する CD-BSB の効果とビスボロールに関連するシグナル経路を明らかにすることである。

【方法】

膵癌細胞株 KLM1、Pancl、KP4 に対して、未治療群 (Control)、シクロデキストリン投与群 (CD)、CD-BSB 投与群の 3 群間での投与 24 時間後と 72 時間後の細胞形態変化およびアポトーシス誘導効果を Muse AnnexinV and Dead Cell Kit を用いて検討した。KLM1 での Control/CD/CD-BSB 投与後 24 時間での細胞骨格の変化を Cytoskeleton Kit を用いて検討した。また、ビスボロールによるリン酸化タンパクの発現を Human RKT Phosphorylation Antibody Array を用いて網羅的に検討した。KLM1、Pancl、KP4 におけるビスボロールのリン酸化シグナル抑制効果について、ウエスタンブロッティング法にて検討した。

動物実験として 7 週齢の雄の BALB/c ノードマウスの大腿皮下に膵癌細胞株 KLM1 cells (5×10^6 cells/100 μ l) を投与し、マウス皮下発癌モデルを作成した。7 日後、無作為に生理食塩水腹腔内投与群 (Control 群、N=5)、CD-BSB 経静脈投与群 (CD-BSB 群、N=5)、ゲムシタピン腹腔内投与群 (GEM 群、N=5) の 3 群に振り分けた。CD-BSB 群に対して静脈投与可能な皮下ポートを用いて 2 週間持続投与を行い、Control 群と GEM 群に対しては 2 回/週の腹腔内投与を 2 週連続投与した。薬剤投与開始から 22 日後にすべてのマウスから皮下腫瘍を採取し、その抗腫瘍効果 (腫瘍体積、腫瘍内 Ki67 発現) について検討した。

【結果】

膵癌細胞株 KLM1、Pancl、KP4 のいずれにおいても CD-BSB 投与 24 時間後および 72 時間後の細胞生存率は低下し、有意なアポトーシスの誘導を認めた (Figure.1a.b)。また、KLM1 では、CD-BSB 投与 24 時間後で細胞が縮小し、アクチン繊維の破裂と細胞

胞内の不均衡な蓄積、チューブリンの細胞表面への蓄積を認めた(Figure.2)。この結果より、CD-BSB にアクチンやチューブリンの細胞骨格重合阻害作用があることが考えられた。

71 種類のキナーゼタンパクのうち、CD-BSB 投与により局所接着キナーゼ(FAK)のリン酸化抑制を認めた(Figure.3a.b)。KLM1、Pancl、KP4 において、FAK のリン酸化部位 397 の CD-BSB による濃度依存的な抑制を認めたが、リン酸化部位 577、925 については細胞株により抑制効果が異なっていた(Figure.3c)。

マウス皮下発癌モデルに対する CD-BSB 群と GEM 群において、有意な腫瘍体積の縮小効果を認め、CD-BSB は GEM と同等の効果であった。腫瘍内 FAK のリン酸化抑制については 3 群間で有意差を認めなかったが、腫瘍内 Ki67 発現は CD-BSB 群および GEM 群で有意な発現低下を認め、CD-BSB 群において GEM 群より有意に Ki67 発現が低下していた(Figure. 4a.b.c.d)。

【考察】

本研究では、難溶性化合物であるビスボロールをシクロデキストリン抱合化 α ビサボロール(CD-BSB)とすることで経静脈投与を可能とし、担癌マウスモデルに対する CD-BSB の有効性を明らかにした。現在、膵臓癌の抗癌剤として広く使用されている GEM に対して CD-BSB の抗腫瘍効果の非劣性および腫瘍内 Ki67 発現の有意な抑制効果を認めた。CD-BSB 投与による腫瘍内 FAK のリン酸化抑制に差がなかった原因として、最終薬剤投与からマウスの腫瘍摘出までの期間が 1 週間と長かった影響が考えられた。

CD-BSB は FAK のリン酸化を抑制しており、FAK は非受容体細胞質タンパクキナーゼであり幅広い細胞プロセスに関与している。FAK はマトリックスを分解するマトリックスプロテナーゼの生産に関与しており、これは癌細胞の浸潤と転移の最初のステップである。FAK シグナル伝達が癌細胞における重要なアクチンリモデリングの制御機構の 1 つとされており、BSB が FAK リン酸化を抑制し、細胞骨格重合を阻害することを明らかにした。これらの結果は、われわれがこれまで報告してきた BSB が膵臓癌の侵襲能と運動能を抑制するとした研究結果と一致していた。

FAK のリン酸化部位 397 が重要であることを明らかにしたが、リン酸化部位 577、925 の抑制効果が、細胞株により異なっており、この点について検討が必要と考えられた。

【結語】

我々は膵臓癌に対する CD-BSB の有効性を *in vitro* および *in vivo* で明らかにした。CD-BSB を新規の抗癌剤とするためには、詳細な抗腫瘍効果カニズムの解明など、さらなる検証をする必要である。しかし、CD-BSB は新規癌治療薬としての可能性を有しており、癌患者の予後改善への寄与が可能と考えられた。

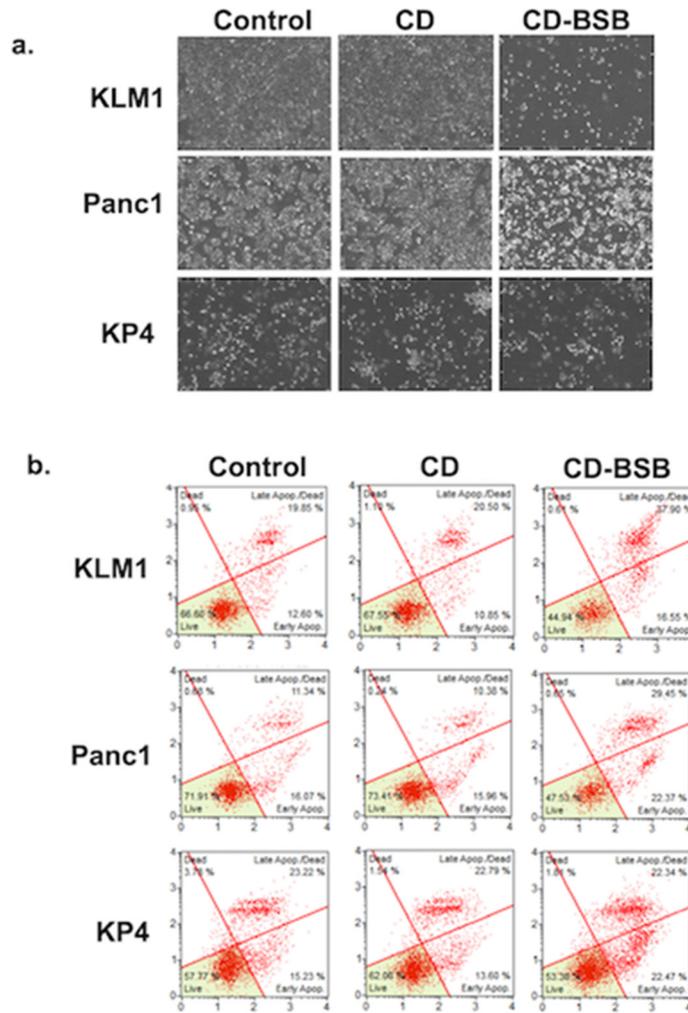


Figure 1. CD-BSB induced apoptosis in pancreatic cancer cells. (a) Images depicting the morphology of KLM1, Panc1 and KP4 cells that were untreated (Control) or treated with cyclodextrin (CD) or cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB). (b) Apoptosis was analyzed in KLM1, Panc1 and KP4 cells that were untreated (Control) or treated with cyclodextrin (CD) or cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB) using the Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit. Cells were classified into 4 groups: dead cells, late apoptotic/dead cells, live cells, and early apoptotic cells. A representative of 3 independent experiments is shown.

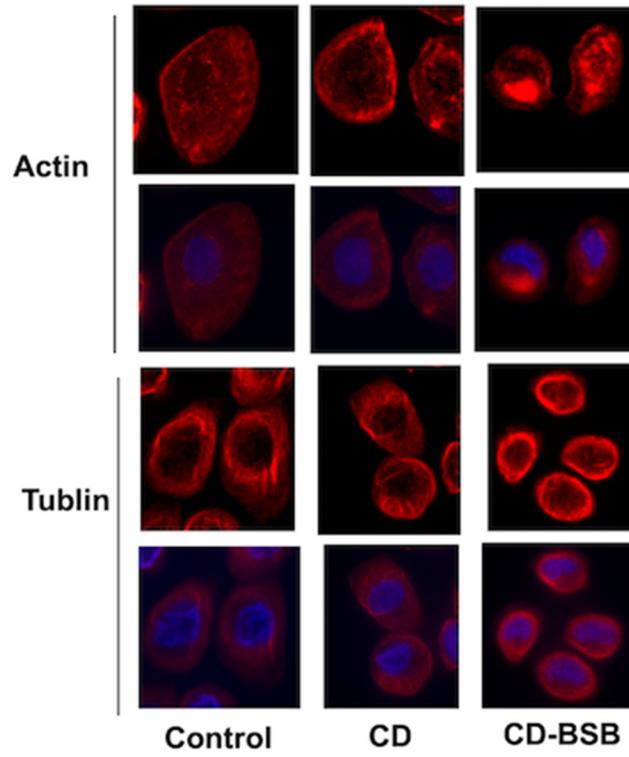


Figure 2. CD-BSB inhibited the cytoskeleton maintenance. Immunocytochemistry for actin and tubulin in KLM1 cells that were untreated (Control) or treated with cyclodextrin (CD) or cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB).

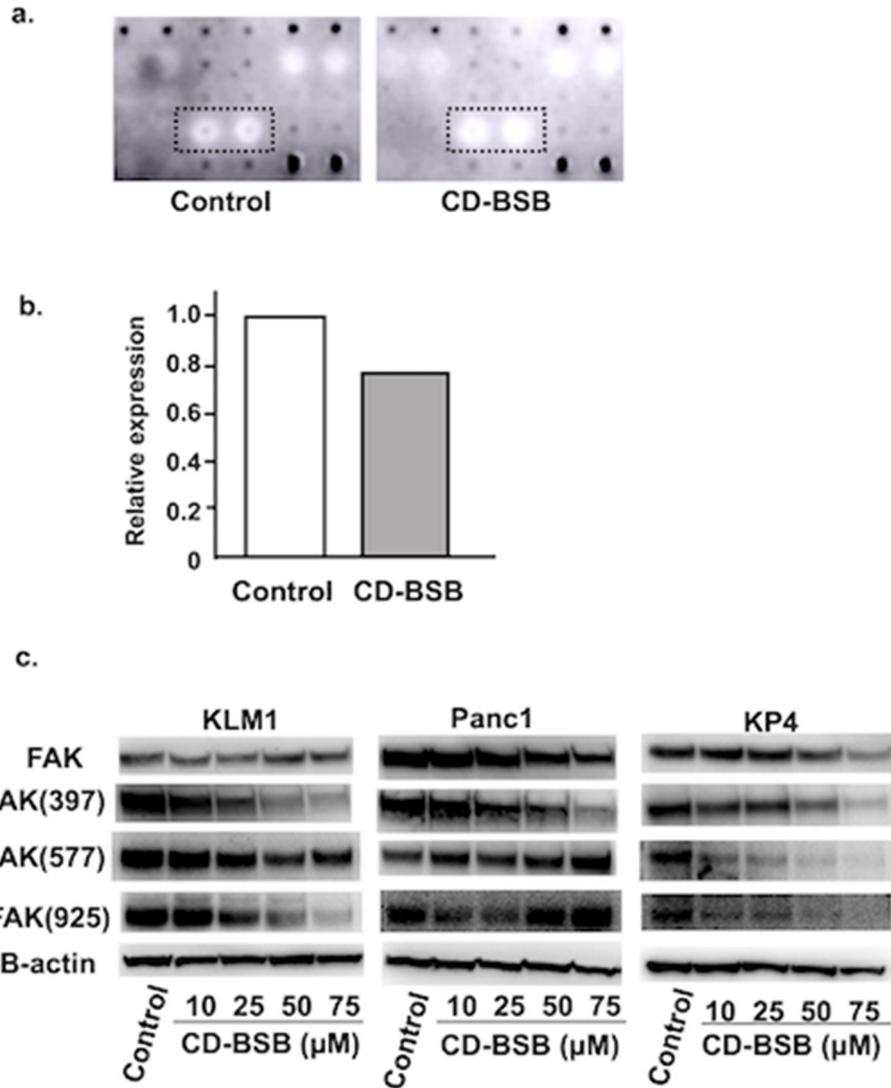


Figure 3. Comprehensive protein phosphorylation in pancreatic cancer cells after CD-BSB. (a) Comprehensive protein phosphorylation using the Human RTK Phosphorylation Antibody Array in KLM1 cells with Control (Untreated) or cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB). (b) Level of phosphorylated FAK were analyzed in in KLM1 cells with Control (Untreated) or cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB). (c) The expression of FAK, pFAK1 (397), pFAK1 (577), and pFAK1 (925) was detected in KLM1, Panc1 and KP4 cells that were untreated (Control) or treated with cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB) by Western blot analysis. β -actin was used as an internal loading control. THD: Thioridazine.

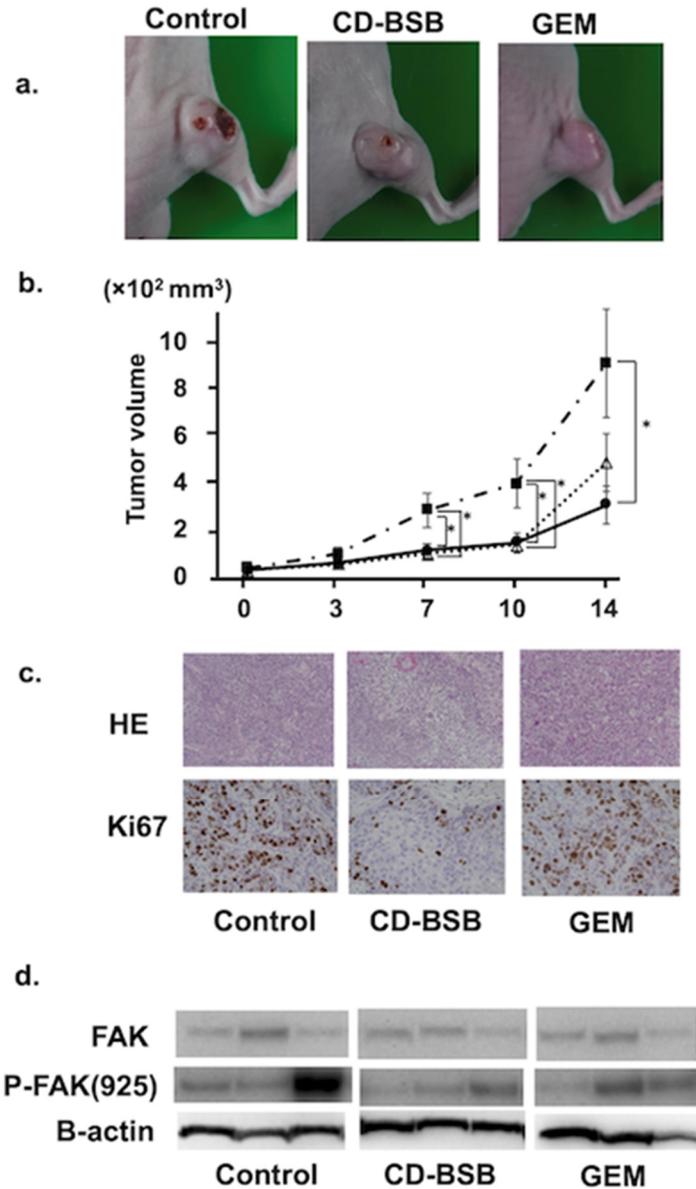


Figure 4. Antitumor effects of CD-BSB in xenograft nude mice. (a) Representative images of KLM1 xenograft tumors untreated (Control) and treated with cyclodextrin conjugated α -bisabolol (CD-BSB) or Gemcitabine (GEM). $n=5$ for each group. (b) The graphs show the average volume of the xenograft tumors in each experimental group. Control: ■, CD-BSB: ▲, GEM: ●. $*p < 0.05$. (c) Histological analysis of the xenograft tumors of each experimental group was performed by hematoxylin-eosin staining. Ki-67 expression in the xenograft tumors of each experimental group was determined by immunohistochemistry. (d) The expression of FAK and pFAK1 (925) was detected of the xenograft tumors of each experimental group was performed by Western blot analysis. β -actin was used as an internal loading control.