

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14411

研究課題名(和文) ホップ由来プレニル化フラボノイドによるがん転移抑制と創薬展開

研究課題名(英文) Suppression of cancer metastases by hop-derived prenylflavonoids and drug discovery research

研究代表者

瀧田 守親 (Morichika, Takita)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、キサントモール(Xh)などのプレニル化フラボノイドには様々な生理活性が報告されているが、がんの全身性転移と骨転移に伴う骨破壊へのXhの有効性は不明である。本研究ではプレニル化フラボノイドに着目し、がんの全身転移ならびに骨転移による骨破壊抑制作用の有効性について検証した。その結果、Xhは転移性がん細胞に直接作用して、カスパーゼ-3の活性化を介してアポトーシスを亢進し、がん細胞増殖を抑制することや、がん細胞との細胞間相互作用による破骨細胞形成とそれに伴う骨破壊を抑制することを見出した。さらに、がんの全身転移系へのXhの投与実験により、がんの肺転移と骨転移に対するXhの有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hop-derived prenylflavonoids, exemplified as xanthohumol (Xh), have various biological activities. However, effectiveness of Xh for systemic cancer metastases and osteolysis accompanied by bone metastasis is not clear. In this study, anti-metastatic and anti-osteolytic potentials of Xh have been investigated. In vitro, Xh promoted apoptosis via caspase-3 activation and inhibited cell growth in metastatic cancer cells. Xh inhibited osteoclast formation induced by the cell-to-cell contact between metastatic cancer cells and host osteoblasts, and attenuated osteolysis induced by co-culture with metastatic cancer cells in the mouse calvarial organ culture system. Furthermore, Xh also attenuated both lung and bone metastases in the mouse systemic cancer metastases model which was made by intravenous injection of the metastatic B16 melanoma cell line in vivo.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：プレニル化フラボノイド 抗腫瘍活性 アポトーシス カスパーゼ-3 破骨細胞 骨破壊 肺転移 骨転移

1. 研究開始当初の背景

(1) ホップ (*Humulus lupulus* L.) はその特有の苦みや芳香、殺菌効果を期待して主にビール飲料などの保存剤として添加されている。近年、ホップ抽出物であるキサントフモール (Xh)をはじめとするプレニル化フラボノイドは、がん細胞の増殖を抑制してアポトーシスを誘導することやがん細胞の遊走と浸潤を抑制すること、さらには破骨細胞分化を阻害して骨吸収を抑制することが報告されている。しかし、プレニル化フラボノイドのがんの全身性転移とがんの骨転移に伴う骨破壊への有効性は全く明らかにされていない。

(2) 近年、がんの遠隔臓器への転移において、がん細胞が転移標的臓器に到達する前に、CD11b⁺Gr-1⁺の骨髄由来細胞が転移標的臓器に動員され、がん細胞の生存や増殖に適した炎症性変化が生じていることが報告されており、がんの転移における転移前ニッチの形成の重要性が示唆されている。我々は、これまでにがん細胞をマウスの背部皮下に移入して皮下腫瘍を形成させる事により、転移前モデルを作製し、原発巣のがん細胞から分泌された TNF- α が肺に集積した骨髄由来細胞や血管内皮細胞に作用して、S100A8 の産生を促進すること、さらに産生された S100A8 が傍分泌で作用して SAA3 (serum amyloid A3) の産生を亢進すること、さらに S100A8 及び SAA3 は TLR4 (toll-like receptor 4) の内因性リガンドであることを見出し、がん細胞に発現する TLR4 に結合することにより、がん細胞における NF- κ B シグナルが活性化されて、がん細胞の遊走が促進されることを明らかにした ()。

(3) がんはしばしば骨へ転移し、骨転移に伴い、破骨細胞形成が亢進して、骨破壊が進行する。これまでにマウス悪性黒色腫 B16メラノーマ細胞のがんの骨転移系を用い、プロスタグランジン E (PGE) 受容体サブタイプのうち、EP4 アンタゴニストががんの骨転移と骨破壊を抑制することを見出した ()。さらに、B16 細胞をマウスの尾静脈より移入するがんの全身転移系において、膜型 PGE 合成酵素-1 遺伝子欠損マウス (mPGES-1KO) では骨のみならず、肺、肝臓、腎臓への転移がいずれも野生型マウス (WT) に比べ抑制されること、B16 細胞をマウスの背部皮下に移入するがんの腫瘍形成系において、mPGES-1KO では WT に比べ、血管新生の低下に伴い、腫瘍形成が著しく遅延することを見出し、これらの現象はいずれも宿主の間質細胞にお

ける PGE₂ の EP4 を介した自己分泌シグナルが関与することを明らかとした ()。

2. 研究の目的

本研究はホップ抽出物のプレニル化フラボノイドに着目し、がんの全身転移や骨転移による骨破壊に対する有効性を検討することを目的とする。さらに、プレニル化フラボノイドの抗がん転移ならびに骨転移による骨破壊抑制作用の有効性の立証と薬効基盤を確立し、がん転移を阻止する抗転移薬や転移予防サプリメントとしての応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究では転移性がん細胞として、マウス悪性黒色腫 B16メラノーマ細胞およびマウス Lewis 肺がん LLC 細胞を使用し、これらがん細胞の増殖に対するプレニル化フラボノイドの影響は WST-8 アッセイ法により、生細胞の細胞内脱水素酵素によって生成する水溶性のホルマゼンを 450 nm における吸光度を測定することによって細胞増殖活性を調べた。

(2) 転移性がん細胞の細胞死に対する Xh の影響は臭化プロピジウム (PI) とアネキシン V の二重染色を行い、フローサイトメトリーにより解析した。

(3) 転移性がん細胞のカスパーゼ-3 活性化に対する Xh の影響は FLICA660-DEVD-FMK 蛍光プローブを用いたフローサイトメトリーにより解析した。

(4) がん細胞と宿主細胞との細胞間相互作用により亢進する破骨細胞形成に対する Xh の影響は 4% パラホルムアルデヒドで固定した B16 細胞上に、2 日齢 C57BL/6 系マウスの頭頂骨より採取した骨芽細胞と 5 週齢 C57BL/6 系マウスより採取した骨髄細胞を播種して、10 pM の活性型ビタミン D₃ 存在下で 7 日間共存培養を行い、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP; tartrate resistant acid phosphatase) 染色を行い、破骨細胞を検出した。

(5) 転移性がん細胞により誘導される骨破壊に対する Xh の影響は 5 日齢 C57BL/6 系マウスより採取した頭頂骨と B16 細胞を 6 日間共存培養し、培養上清中の遊離カルシウム濃度を測定することにより、骨吸収活性を算出した。

(6) がんの全身転移に対する Xh の影響は B16 細胞を尾移入より移入した 6 週齢 C57BL/6 系雄性マウスに Xh を隔日でゾンデを用い、経口投与 (2 日に 1 回、体重 1kg 当たり 10 mg) した。なお、対照群には 2.5% エタ

ノールを含有する生理食塩水を投与した。B16細胞の移入から18日後に肺、肝臓、腎臓、大腿骨および脛骨を摘出し、軟組織においては臓器表面の黒色の転移結節を計数することにより転移を定量化し、硬組織の骨では黒色の転移結節の大きさの比較を行った。

4. 研究成果

(1) 転移性がん細胞の細胞増殖に対するプレニル化フラボノイドの影響

B16細胞あるいはLLC細胞の培養系にXhあるいはIXhを終濃度10~40 μMで添加して3日間培養したところ、いずれの細胞においてもXhあるいはIXhの用量依存的に細胞増殖が抑制され(**P*<0.01, ***P*<0.001 vs 対照)、その作用強度はXhの方がIXhに比べ強かった(図1)。

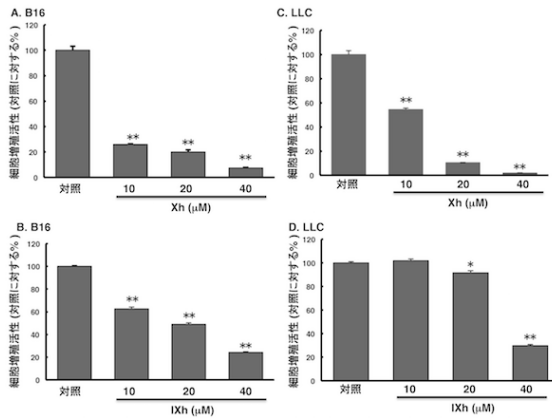


図1. 転移性がん細胞の細胞増殖に対するプレニル化フラボノイドの影響

(2) 転移性がん細胞の細胞死に対するXhの影響

B16細胞あるいはLLC細胞の培養系にXhを終濃度10~40 μMで添加して1日間培養後、PI/アネキシンVの蛍光2重染色を行い、フローサイトメトリーにより細胞死の解析を行ったところ、いずれの細胞においてもXhの用量依存的にPI⁺アネキシンV⁺の細胞集団の

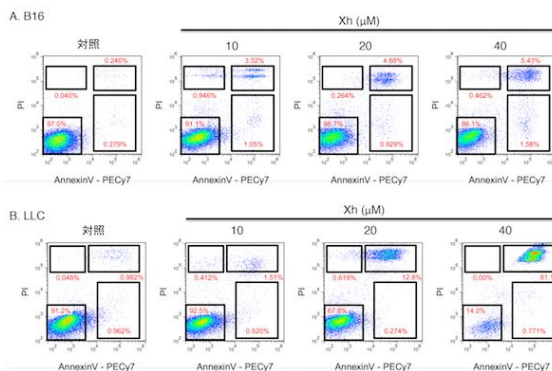


図2. 転移性がん細胞の細胞死に対するXhの影響

増加が認められ、後期アポトーシスの亢進が示唆された(図2)。

(3) 転移性がん細胞のカスパーゼ-3活性化に対するXhの影響

B16細胞あるいはLLC細胞の培養系にXhを終濃度10~40 μMで添加して1日間培養後、活性化カスパーゼ-3に特異的な蛍光プローブであるFLICA660-DEVD-FMKによる染色を行い、フローサイトメトリーによりカスパーゼ-3の活性化の解析を行ったところ、いずれの細胞においてもXhの用量依存的に活性化カスパーゼ-3を発現する細胞集団の増加が認められ、Xh誘導性のカスパーゼ-3の活性化に伴うアポトーシスの亢進が示唆された(図3)。

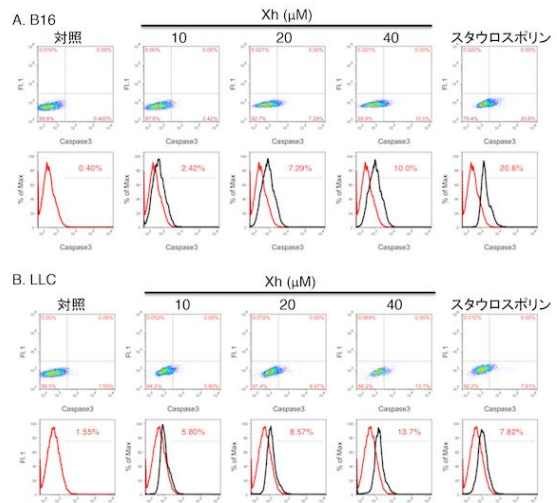


図3. 転移性がん細胞のカスパーゼ-3活性化に対するXhの影響

(4) 転移性がん細胞と宿主細胞との細胞間相互作用により亢進する破骨細胞形成に対するXhの影響

がんの骨転移に伴う、骨破壊にはがん細胞と宿主骨芽細胞との細胞間相互作用による破骨細胞形成の亢進が必須である。そこで、破骨細胞形成に対するXhの影響を調べるため、固定したB16細胞上でマウス骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養を行い、破骨細胞形成実験を行った。その結果、培養系にXhを1~10 μMで添加するとXhの用量依存的にTRAP陽性の多核の破骨細胞形成が抑制された(図4)。一方、マウス骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)存在下で3日間培養して骨髄マクロファージに分化させた後、さらにM-CSFに加えて可溶性の破骨細胞分化因子RANKL(receptor activator of NF-κB ligand)組換えタンパク質を添加して3日間培養する破骨細胞形成系ではXh(5 μM)は破骨

細胞形成に全く影響しなかった。従って、破骨細胞形成系における Xh の宿主細胞側への作用点は破骨細胞前駆細胞の単球・マクロファージ系細胞ではなく、骨芽細胞である可能性が示唆された。

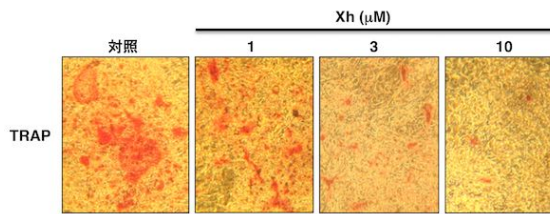


図 4. 転移性がん細胞と宿主細胞との細胞間相互作用により亢進する破骨細胞形成に対する Xh の影響

(5) 転移性がん細胞により誘導される骨破壊に対する Xh の影響

Xh ががん細胞と宿主細胞の細胞間相互作用による破骨細胞形成を抑制することが示されたことから、転移性がん細胞により誘導される骨破壊に対する Xh の有効性について、マウス頭頂骨と B16 細胞を共存させた器官培養系を用いて検討した。培養上清中の遊離カルシウム濃度を測定して骨吸収活性を評価したところ、B16 細胞との共存培養により対照に比べ骨吸収活性の著しい亢進が認められたが、Xh (20 μM) の添加により骨吸収活性の亢進は有意に減弱化した(* $P < 0.001$) (図 5)。従って、Xh はがんの骨転移に伴う骨破壊を抑制できる可能性が示された。

(6) がんの全身転移に対する Xh の影響

がんの全身転移に対する Xh の有効性について検証するため、B16 細胞の全身転移系を用い、Xh の経口投与と実験を行った。その結

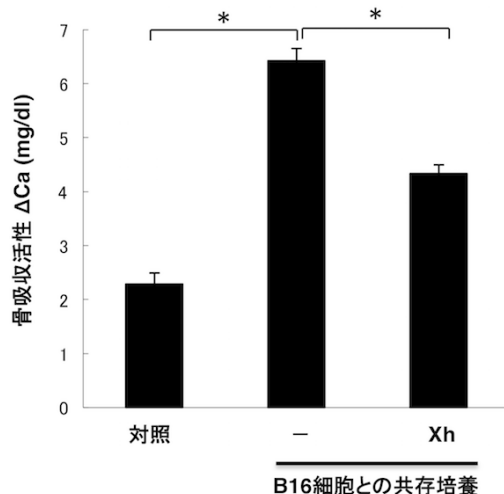


図 5. 転移性がん細胞により誘導される骨破壊に対する Xh の影響

果、Xh 投与群ではがんの肺への転移が対照群と比べ、有意に抑制されたが (* $P < 0.05$)、肝臓、腎臓への転移は全く影響されなかった (図 6A)。さらに、Xh 投与群の 5 匹中 1 匹のみではあるものの、がんの大腿骨および脛骨への骨転移が抑制された (図 6B)。従って、がんの肺および骨転移に対する Xh の有用性の可能性が示唆されたが、投与量と投与頻度の最適化を行い、再度追試を行う必要があると考えている。

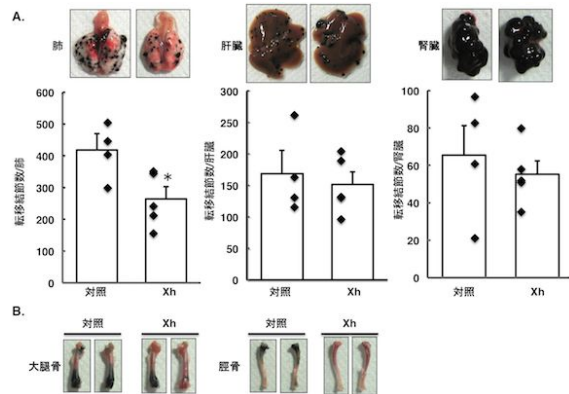


図 6. がんの全身転移に対する Xh の影響

< 引用文献 >

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., Maru, Y., The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol.*, 10, 2008, 1349-1355

Takita, M., Inada, M., Maruyama, T., Miyaura, C., Prostaglandin E receptor EP4 antagonist suppresses osteolysis due to bone metastasis of mouse malignant melanoma cells. *FEBS Lett.*, 581, 2007, 565-571

Inada, M., Takita, M., Yokoyama, S., Watanabe, K., Tominari, T., Matsumoto, C., Hirata, M., Maru, Y., Maruyama, T., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Uematsu, S., Akira, S., Murphy, G., Nagase, H., Miyaura, C., Direct melanoma cell contact induces stromal cell autocrine prostaglandin E2-EP4 receptor signaling that drives tumor growth, angiogenesis and metastasis. *J. Biol. Chem.*, 290, 2015, 29781-29793

5. 主な発表論文等

〔図書〕(計1件)

瀧田守親、丸義朗、医歯薬出版、医学の
あゆみ がんの臓器特異的転移を決定す
る転移ニツチ、2016、258 巻1号 47-56
頁

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀧田 守親 (TAKITA, Morichika)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：80533455

(2)研究協力者

丸 義朗 (MARU, Yoshiro)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：00251447