

平成 21 年 3 月 19 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790101  
 研究課題名（和文）新規生物活性物質メチルコーディセピンによるがん転移抑制機構の  
 解明と治療戦略  
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism for antimetastatic action by  
 methylcordycepin, a novel biological active compound, and its  
 treatment strategy

## 研究代表者

吉川 紀子 (YOSHIKAWA NORIKO)  
 武庫川女子大学・薬学部・助手  
 研究者番号：40373120

研究成果の概要：古来より中国において滋養強壯作用を有する生薬として使用されてきた冬虫夏草の有効成分であるコーディセピンをリード化合物として合成したメチルコーディセピンは、コーディセピンよりも持続的な抗がん活性を示した。その作用機序としてアデノシンキナーゼの活性化を介している可能性が示唆された。また、種々のがん細胞（マウスメラノーマ細胞、マウス肺がん細胞、ヒト大腸がん細胞およびヒト白血病細胞）に対して有用であったが、特に、転移能の高いヒト線維肉腫細胞に対して強い抗がん活性を示し、*in vivo* でヒト線維肉腫細胞に対する影響をマウスの生存日数を指標に検討したところ、メチルコーディセピンを投与したマウスはコントロールマウスと比較して有意に生存日数が延長した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	300,000	2,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：メチルコーディセピン、アデノシンデアミナーゼ、アデノシンキナーゼ、ヒト線維肉腫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*) は古来より中国において滋養強壯薬として用いられており、また、その特有の成分として コーディセピン (3'-deoxyadenosine) を含有している。申請者は、これまでに冬虫夏草の水抽出物およびコーディセピンが、*in vivo* および *in vitro* においてがん細胞増殖抑制作用およびがん転移抑制作用を有することを

報告してきた。一方、コーディセピンは、生体内でアデノシンデアミナーゼによって代謝されやすいことから、薬効の持続性低下を引き起こし、実用化の障壁となる可能性を提示してきた。

そこで、アデノシンデアミナーゼによる代謝分解を受けにくいコーディセピン誘導体であるメチルコーディセピンを用いて、その抗がん活性およびその機序を検討した。

## 2. 研究の目的

コーディセピンよりも安定な誘導体であるメチルコーディセピンを用いて、より実用的ながん転移抑制作用を開発するために以下の点を明らかにする実験を行った。

- (1) がん細胞増殖に対するメチルコーディセピンの影響
- (2) メチルコーディセピンのがん細胞増殖抑制作用機序の解明
- (3) メチルコーディセピンのがん転移に対する影響
- (4) メチルコーディセピンの *in vivo* での有効性

## 3. 研究の方法

- (1) がん細胞増殖に対するメチルコーディセピンの影響

実験には、ヒトがん細胞として HT1080 fibrosarcoma (HT1080) 細胞、CW-2 colon carcinoma (CW-2) 細胞、Caco-2 colon carcinoma (Caco-2) 細胞および HL60 promyelocytic leukemia (HL-60) 細胞、マウスがん細胞としては B16-BL6 細胞および Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞を用いた。これらのがん細胞にメチルコーディセピンを処置し、24、48 および 72 時間後の生細胞数をコールターカウンターを用いて測定した。ただし、HL-60 細胞の生細胞数は methylthiazole tetrazolium (MTT) assay にて測定した。

- (2) メチルコーディセピンのがん細胞増殖抑制作用機序の解明

メチルコーディセピンのがん細胞増殖抑制作用機序を追究する目的で、メチルコーディセピンと各種アデノシン受容体選択的アンタゴニスト、アデノシンキナーゼ阻害剤、アデノシンデアミナーゼ阻害剤およびアデノシントランスポーター阻害剤を併用した。実験方法は (1) と同様に行い、アンタゴニストおよび阻害剤はメチルコーディセピンを添加する 30 分前から処置した。

- (3) メチルコーディセピンのがん転移に対する影響

メチルコーディセピンのがん転移に対する影響を検討するために、がん転移過程において重要である①血小板凝集過程、②がん細胞浸潤過程および③血管新生過程に対する影響を検討した。

- ①血小板凝集過程

ウサギ多血小板血漿 (platelet rich plasma : PRP) を用いて adenosine diphosphate (ADP) の惹起する血小板凝集に対するメチルコーディセピンの影響を比濁法にてアグリゴメーターを用いて検討した。

- ②がん細胞浸潤過程

がん細胞の浸潤能を、chemoinvasion assay を用いて検討した。

- ③血管新生過程

がん細胞が分泌する血管新生因子のうち肝細胞増殖因子である hepatocyte growth factor (HGF) と血管内皮細胞増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) の影響を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて検討した。

- (4) メチルコーディセピンの *in vivo* での有効性

- ①ヒト白血病細胞を用いた検討

8 週齢の雌性 C.B.-17/Icr-scld/scld Jcl マウスの尾静脈にヒト白血病細胞である HL-60 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells / 0.2 mL PBS(-) / mouse) を接種し、がん細胞接種日から、メチルコーディセピン (5 および 15 mg/kg) を 1 日 1 回 5 週間連続経口投与し、マウスの生存日数を測定した。メチルコーディセピンは、0.5% carboxymethylcellulose (CMC) に懸濁させた。

- ②ヒト線維肉腫細胞を用いた検討

8 週齢の雌性 C.B.-17/Icr-scld/scld Jcl マウスの足蹠皮下に HT1080 細胞 ( $1 \times 10^6$  cells / 0.05 mL PBS(+)) / mouse) を接種し、がん細胞接種日からメチルコーディセピン (1, 5 および 15 mg/kg) を 1 日 1 回 12 日間腹腔内投与し、マウスの生存日数を測定した。メチルコーディセピンは、10% polysorbтан 80 に溶解させた。

## 4. 研究成果

- (1) がん細胞増殖に対するメチルコーディセピンの影響

メチルコーディセピンはコーディセピンと同様にいずれのがん細胞 (HT1080, CW-2, Caco-2, HL-60, B16-BL6 および LLC) に対しても細胞増殖抑制作用を示した。特に、高い転移能を持つがん細胞である B16-BL6 細胞と HT1080 細胞に対して強力な抑制作用を示した。また、メチルコーディセピンの

細胞増殖抑制効果は、コーディセピンと比較して持続的であり、120 時間後においては、両者の抗がん活性の差は歴然であり、メチルコーディセピンのみが細胞増殖を抑制し続けた。

#### (2) メチルコーディセピンのがん細胞増殖抑制作用機序の解明

*in vitro* で薬理的にメチルコーディセピンの代謝機構並びに抗がん作用機序を検討したところ、メチルコーディセピンは、コーディセピンの代謝分解酵素であるアデノシンデアミナーゼによって分解されないこと、およびメチルコーディセピンの抗がん作用は、一部、アデノシントランスポーターを介したものであるが、大部分はアデノシンキナーゼを介していることが示唆された。

コーディセピンはアデノシン A<sub>3</sub> 受容体を介してがん細胞増殖抑制作用を示すことを我々は、明らかにしているが、メチルコーディセピンのがん細胞増殖抑制作用はアデノシン A<sub>3</sub> 受容体アンタゴニストによって影響を受けなかった。

#### (3) メチルコーディセピンのがん転移に対する影響

##### ①血小板凝集過程

メチルコーディセピンは ADP により惹起された血小板凝集に対して影響を与えなかった。

##### ②がん細胞浸潤過程

メチルコーディセピンはがん細胞の浸潤能に対して影響を与えなかった。

##### ③血管新生過程

メチルコーディセピンはがん細胞の分泌する HGF 量に対して影響を与えなかったが、VEGF 量は有意に抑制した。

以上の結果より、メチルコーディセピンは、がん細胞の分泌する VEGF 量を低下させることにより、血管新生を抑制する可能性が示唆された。

#### (4) メチルコーディセピンの *in vivo* での有効性

##### ①ヒト白血病細胞を用いた検討

メチルコーディセピン 15 mg/kg を経口投与した群で、コントロール群と比較して、生存日数の延長傾向が見られた。また、薬物投与によるマウスの体重減少や脱毛などの副作用は観察されなかった。

##### ②ヒト線維肉腫細胞を用いた検討

メチルコーディセピンの抗がん作用は経口投与では弱かったため、次に、メチルコーディセピンを polysorbitan 80 に溶解させ、腹腔内投与にて検討した。その結果、メチルコーディセピン 15 mg/kg 投与群の生存日数は、コントロール群と比較して有意に延長された。また、①の実験と同様に、薬物投与によるマウスの体重減少や脱毛などの副作用は観察されなかった。

上記①②の結果より、メチルコーディセピンはヒト線維肉腫に対する抗がん薬として有用であること、また、投与経路としては、経口投与ではなく、腹腔内投与が有用であることが示唆された。

#### (5) 総括

以上の結果より、メチルコーディセピンはヒト線維肉腫に対する抗がん薬として有用であること、および、その作用機序としてアデノシンキナーゼを介していることが示唆された。

#### 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 3 件)

① Noriko Yoshikawa, “Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A<sub>3</sub> receptor followed by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activation and cyclin D<sub>1</sub> suppression” *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (377) 591-595, 2008, 査読有り

② Namie Nejime, Noriko Yoshikawa “Effect of P<sub>2</sub> receptor on the intracellular calcium increase by cancer cells in human umbilical vein endothelial cells” *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* (377) 429-436, 2008, 査読有り

③ Noriko Yoshikawa, “Cordycepin and *Cordyceps sinensis* reduce the growth of human promyelocytic leukemia cells through the Wnt signaling pathway” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* (34) 61-63, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

①久保えり香, “肝細胞増殖因子 (HGF) により増強されたがん細胞浸潤能に対する冬虫夏草水抽出物の影響” 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 18 日, 横浜

②吉川紀子, “ヒドロキシウレアは冬虫夏草水抽出物のがん転移抑制作用を増強する” 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 16 日, 横浜

③久保えり香 “肝転移モデルマウスに対する冬虫夏草水抽出物のがん転移抑制効果” 第 114 回日本薬理学会近畿部会, 2008 年 11 月 14 日, 神戸

④Noriko Yoshikawa, “Effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous metastatic model mice” 8<sup>th</sup> International Conference of Anticancer Research, October 18, 2008, Kos, Greece

⑤吉川紀子, “冬虫夏草水抽出物の血小板凝集抑制を介するがん転移抑制作用” 第 113 回日本薬理学会近畿部会, 2008 年 6 月 20 日, 岡山

⑥瀬占奈美江, “癌細胞による血管内皮細胞内カルシウム上昇に P2Y 受容体が関与する” 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 19 日, 横浜

⑦久保えり香, “4 種のマウスメラノーマ細胞における転移先臓器指向性の違いについて” 第 81 回日本薬理学会年会, 2008 年 3 月 17 日, 横浜

⑧Namie Nejime, “Cancer cells effect on intracellular calcium ion levels of vascular endothelial cells via P2Y receptors” 5<sup>th</sup> International Receptor Symposium, May 10, 2007, Shizuoka, Japan

⑨ Kazuki Nakamura, “Cordycepin (3'-deoxyadenosine) reduces the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the adenosine A<sub>3</sub> receptor followed by Wnt signaling pathway” 5<sup>th</sup> International Receptor Symposium, May 10, 2007, Shizuoka, Japan

[その他]

ホームページ

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~yakuril/achievements.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 紀子 (YOSHIKAWA NORIKO)

武庫川女子大学・薬学部・助手

研究者番号: 40373120

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: