

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10585

研究課題名(和文) 抗炎症薬によるがん発生および悪性化の抑制機構の解明と戦略的がん化学予防

研究課題名(英文) Glycyrrhizin Attenuates Carcinogenesis by Inhibiting the Inflammatory Response in a Murine Model of Colorectal Cancer

研究代表者

川西 正祐 (Kawanishi, Shosuke)

鈴鹿医療科学大学・なし・客員教授

研究者番号：10025637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：甘草成分であるグリチルリチンはHMGB1と結合することで炎症を抑制することが知られている。本研究では炎症性大腸がんモデルを用い、GLが発がん性の抑制を明らかにした。また皮膚がんの一つで悪性黒色腫(メラノーマ)をマウスに静注し、がん転移で最も重要な過程である管外遊出過程におけるグリチルリチン効果を検討した。特に肺は毛細血管に富み転移しやすいので、肺へのがん転移を検討した。グリチルリチンはHMGB1を抑制することにより、標的細部のRAGEおよびTLR4の発現を抑え炎症性サイトカインの分泌やEMT誘導、VAGF発現を減少させることでメラノーマの肺へのがんの転移・増殖を阻害することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甘草は臨床でよく使われる漢方薬の一つである。甘草の主成分であるグリチルリチンは抗炎症作用、抗がん作用、抗ウイルス作用、抗アレルギー作用などの薬理作用を有する。本研究ではグリチルリチンが炎症性大腸がんを抑制することが判明し、がんの発生の予防することが明らかになった。また、グリチルリチンはメラノーマの肺転移を抑制する事が判明し、がんの転移を阻止することを明らかにした。これらの研究成果はがんの予防や治療に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Glycyrrhizin (GL), an active ingredient of licorice root, which binds with high-mobility group box 1 (HMGB1) and weakens its proinflammatory effects. We demonstrated that GL could suppress carcinogenesis in an azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced murine model of colorectal cancer. We also studied the mechanism through which glycyrrhizin ameliorates the extravasation of melanoma cells into mouse lungs. Our study demonstrates that glycyrrhizin ameliorates melanoma metastasis by regulating the HMGB1/RAGE and HMGB1/TLR-4 signal transduction pathways.

研究分野：衛生学

キーワード：グリチルグリチン HMGB1 AOM/DSS DNA損傷 炎症 大腸がん予防 がん転移予防 TLR2/4

## 1. 研究開始当初の背景

炎症・感染は、極めて重要な発がん要因である。

我々は、炎症関連発がんには炎症により生成する活性酸素・窒素種を介した DNA 損傷が重要な役割を果たし、特に DNA 中のグアニンが損傷された 8-ニトログアニンが遺伝子変異誘発に重要な役割を果たすことを解明した (Pinlaor S. et al. Carcinogenesis 2004)。また非常に興味深いことに、8-ニトログアニンはがん発生過程の重要なバイオマーカーになることも明らかにした (Kawanishi S. et al. Antioxid Redox Signal 2006)。がん細胞の集団において活性酸素・窒素種を介した炎症関連 DNA 損傷が遺伝子変異や細胞死を誘発し、がんの発生のみならず悪性化にも関与していることを明らかにしている (Pinlaor S. et al. World J. Gastroenterol. 2005; Hoki Y. et al. Cancer Sci. 2007; Thana R. et al. Free Radic. Biol. Med. 2013)。がんの悪性化は転移能やがん幹細胞生成を引き起こし、臨床的には予後と相関する。その過程では、がん細胞死が誘発された時に、細胞から炎症シグナル HMGB1 が放出され、腫瘍・がん組織の周辺に炎症性微小環境が形成される。その微小環境中で炎症細胞 (マクロファージなど) が生成したサイトカインにより、がん細胞で誘導性 NO 合成酵素 (iNOS) などを介して活性酸素や窒素種が生成される。この結果生じた炎症関連 DNA 損傷が、さらに変異の蓄積や細胞死を誘導し、その繰り返しが悪性度の高いがん細胞を形成していくことを明らかにした (Kawanishi S. et al. Int. J. Mol. Sci. 2017)。さらに最近、HMGB1 が、直接転移能獲得に関与する可能性も報告されている (Zhang J. et al. Int J Oncol 2018)。

非常に興味深いことに、HMGB1 の特異的阻害剤で抗炎症作用を示す生薬甘草成分、グリチルリチンが、C 型肝炎から肝臓がんへの進展を抑制するとのコホート研究が報告された (Ikeda K. et al. Oncology, 2014)。グリチルリチンのがん抑制の分子機序は不明である。

以上のことから、本研究の学術的「問い」は、炎症関連発がんにおける炎症性微小環境中で、アスピリンやグリチルリチンが、DNA 損傷による遺伝子変異や細胞死を繰り返す悪循環を抑制する分子機構を HMGB1 カスケードに注目し明らかにすることである。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症関連がんの発生と悪性化の両過程において、抗炎症薬によるがん抑制の分子機序を解明し、グリチルリチンなどの抗炎症薬をがん化学予防薬として実用化させるための分子予防医学的根拠を示すことである。

## 3. 研究の方法

各種炎症関連がん患者における HMGB1、COX2、8-ニトログアニンなどの変動と予後の相関解析

ICR 雌性マウスに AOM (azoxymethane 10mg/kg) を腹腔投与し、一週間後、2% DSS (dextran sodium sulfate) 溶液を一週間飲用として与え大腸がんを誘発した。その後、通常の飲用に変え 18 週間飼育した。この間、マウスにグリチルリチンを二日毎投与する。実験開始後 20 週目にマウスを解剖して大腸がんの状態を観察する。グリチルリチンのがん抑制効果は、腫瘍径と 8-ニトログアニン、HMGB1、COX2 などの変動で評価した。

マウスを用いた腫瘍転移抑制における抗炎症薬の効果と分子機構の解明

C57BL/6 雌性マウスに B16 メラノーマ細胞を一匹当たり  $2 \times 10^5$  cells 静注を行う。二週間マウスを飼育し、その間二日毎グリチルリチンを投与した。二週間後、マウスを解剖しメラノーマの肺転移を確認する。なおメラノーマは黒いメラニンを産生するので転移の確認は容易に行える。次いでグリチルリチンの転移抑制効果を評価した。さらに、HMGB1 阻害を介した転移抑制機序を、がん転移に重要な役割を果たしている E-セクレチンと VE-カドヘリンに注目し、解析した。

## 4. 研究成果

グリチルリチンを AOM(発がん物質)+ DSS(大腸炎誘導物質)誘導性大腸がんモデルマウスに投与した。AOM + DSS による大腸がんでは IL-6、TNF- $\alpha$  および ROS が有意に増加し、グリチルリチン投与によってそれらが有意に減少し、がんの発症を抑制したことを再確認できた。グリチルリチンのターゲットである HMGB1 は、障害を受けて壊死に陥った細胞から放出される約 30 kDa の核タンパク質である。細胞外に放出された HMGB1 は TLR2/4 受容体と結合することで MyD88 や NEMO のシグナルが活性化され、NF- $\kappa$ B 因子を介して、IL-6 と TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを放出と同時に COX-2 も誘導し、PGE2 を生成され、EP2 受容体と結合するによって炎症性サイトカインも放出する。それによりがん細胞で Nox を介して活性酸素 ( $O_2$ ) や NF- $\kappa$ B で誘導された NO 合成酵素 (iNOS) により合成されるペルオキシナイトライト (ONOO) が形成し、8-NitroG と 8-oxodG を生成され DNA 損傷を起こす。修復不全によって細胞死に至る。また DNA が突然変異および遺伝的不安定化によってがんの発生に繋がることを我々は提唱していた。

我々はこの経路の元にある HMGB1(炎症誘導因子)と COX-2(炎症マーカー)および 8-NitroG・8-oxodG(DNA 損傷マーカー)について免疫組織化学による染色性について検証したところ、AOM + DSS で誘導された大腸がんでも強く染色されたが、グリチルリチン投与後、すべての染色性が抑制されていることが確認できた。グリチルリチンがこれらを抑制することから、グリチルリチンが HMGB1 を阻害し、炎症を抑え、DNA 損傷によるがん発生を抑制する可能性を示唆するものと考えられる。

メラノーマを静注したマウスでは各組織に色素沈着が起こり転移が認められた。その中でも肺において最も色素沈着が強かった。グリチルリチン投与したメラノーマ投与マウスではメラノーマ投与マウスに比べ色素沈着が少なくなり、メラノーマの改善が見られた。グリチルリチンの B16 メラノーマに対する改善効果は以前に報告されていたが、本研究により再実験に成功した。さらに、本研究では HMGB1 を介したがん転移阻害の作用メカニズムについても解明した。グリチルリチンの標的遺伝子は HMGB1 である。HMGB1 は障害を受けて壊死に陥った細胞から放出、あるいは刺激を受けて活性化した単球、樹状細胞、マクロファージから細胞外に分泌される。本研究において、RAGE と TLR4 受容体の発現の増加がグリチルリチン投与によって抑制されることが認められ、グリチルリチンがこれらの受容体を介する反応に関わっていると考えられた。RAGE は下流のシグナル(RAS, ERK および NF- $\kappa$ B)を活性化し、その結果、炎症系サイトカインを放出し、がんの悪化を導くことが知られている。我々の実験ではグリチルリチンは RAGE の発現の抑制を行い、RAGE の刺激により起こるシグナル伝達系を抑制していることが示された。さらに RAGE は上皮間葉転換(EMT)誘導し、この誘導もメラノーマの転移を導くと考えられるが、グリチルリチンは、その EMT 抑制している可能性が示された。また、TLR4 においては、VEGFA の発現を抑えており TLR4/VEGFA の経路を抑えている可能性が示された。以上のことからグリチルリチンは HMGB1 を抑制することにより、標的細部の RAGE および TLR4 の発現を抑え炎症性サイトカインの分泌や EMT 誘導、VAGF 発現を減少させることでメラノーマの肺へのがんの転移・増殖を阻害すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Guifeng Wang, Keiichi Hiramoto, Ning Ma, Nobuji Yoshikawa, Shiho Ohnishi, Mariko Murata,*,* and Shosuke Kawanishi,*
2. 発表標題 Glycyrrhizin Attenuates Carcinogenesis by Inhibiting the Inflammatory Response in a Murine Model of Colorectal Cancer
3. 学会等名 International Journal of Molecular Sciences
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王 桂鳳、平本恵一、有馬 寧、大西 志保、村田 真理子、川西正祐
2. 発表標題 甘草の主成分グリチルリチンは AOM+DSS誘導性大腸がんを抑制する
3. 学会等名 日本衛生学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榎屋 友幸  (Enokiya Tomoyuki)  (60803260)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授   (34104)	
研究分担者	大西 志保  (Ohnishi Shiho)  (80511914)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教   (34104)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	平本 恵一  (Keiichi Hiramoto)  (90251793)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教     (34104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関