

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07804

研究課題名(和文) 伝統薬物成分、合成成分の発癌と癌増殖に及ぼす免疫機能活性化・制御と環境制御作用

研究課題名(英文) Effects of synthetic and natural compounds on carcinogenesis and cancer growth in the activation and/or regulation of immune systems in cancer microenvironments

研究代表者

木村 善行(Kimura, Yoshiyuki)

大阪医科薬科大学・薬学部・その他

研究者番号：20294796

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)：伝統薬物成分Resveratrol関連の4種類のStilbene類(2,3-, 3,4-, 4,4'-Dihydroxystilbene)およびPiceatannol、漢方薬「オウゴン」の2種類のTetra-およびPentahydroxyflavanone、「サトウカエデ」中のAcertannin、および「山梔子」中のGeniposideは、Azoxymethane (AOM)とDextran Sulfate Sodium (DSS)処理したマウスの大腸癌増殖を抑制し、COX-2やTOX/TOX2 (CD8+T細胞の疲弊)発現抑制を介したサイトカイン類増加の抑制によ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

大腸癌に罹患率が増加している状況で、癌死亡率の上位を占めている。潰瘍性大腸炎やクローン病は難病指定され、大腸癌発生のリスクファクターである。「サトウカエデ」中のAcertanninのデキストラン硫酸Na誘発大腸炎を結腸中IL-23およびTNF- α の上昇の阻害を介して大腸炎を抑制した。Azoxymethane (AOM)およびDextran Sulfate Sodium (DSS)誘発大腸癌は、Hydroxystilbene類、Hydroxyflavanone、GeniposideやAcertanninの経口投与によって抑制された。以上の成果は、新たな大腸癌の治療薬候補となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Traditional drug compound Resveratrol-related four stilbenes (2,3-, 3,4-, 4,4'-Dihydroxystilbene and Piceatannol(3,5,3',4'-Tetrahydroxystilbene), Tetra- and Penta-hydroxyflavanone isolated from Scutellariae Radix, Acertannin isolated from Acer species, and Geniposide isolated from Gardeniae Fructus were inhibited the colon tumor growth by inhibiting colonic IL-1 β , PD-1 via down-regulated expression of COX-2 and TOX/TOX2 (CD8 T cell exhaustion) through the inhibition of Phospho-STAT3 expression in azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS)-treated C57BL/6J mice.

研究分野：薬理学

キーワード：癌 伝統薬物成分 薬理学 生理活性 免疫機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近の癌治療は、癌化学療法剤(5-FU 製剤、シスプラチン系製剤等)と共に、分子標的治療剤や免疫チェックポイント阻害剤が注目されている。長期間の制癌剤の使用は、癌耐性の出現、白血球や骨髄細胞の減少、消化器障害や免疫チェックポイント阻害薬も自己免疫性腸炎、自己免疫性肝炎や間質性肺炎などの副作用が指摘されている。

(2) 近年、食生活の影響で、大腸癌に罹患する人が増加し、癌死亡率の上位を占めつつある。難病指定されている潰瘍性大腸炎もまた、大腸癌のリスクファクターとなっている。

(3) 最近、腫瘍組織の増大は、腫瘍組織周辺に集積する免疫 CD8⁺T 細胞やマクロファージが癌増殖を抑制せず、免疫逃避機構(CD8⁺T 細胞の疲弊や M2 マクロファージの増加)によって免疫機能が機能せず、逆に癌の増殖の関与が明らかになっている。

(4) 伝統薬物には、免疫機能活性化による抗腫瘍効果や副作用が少ない点、むしろ副作用防止効果が期待できる。本研究では、①*Polygonum cuspidatum* 根(虎杖根)から単離した Resveratrol 関連化合物 3 種類の Dihydroxystilbene 類および Tetrahydroxystilbene の Piceatannol、*Gardenia jasminoides* 実(山梔子)から単離したイリドイド配糖体 Geniposide、*Scutellaria baicalensis*(黄芩)から単離した 2 種類の Tetrahydroxyflavanone と Pentahydroxyflavanone、Maple シロップを産する *Acer* 属植物から単離した Acertannin の Azoxymetane(AOM)および Dextran Sulfate Sodium(DSS)による大腸癌の増殖、②Acertannin の DSS 誘導潰瘍性大腸炎、および③*Perilla frutescens* var. *crispa* 葉(紫蘇)中の精油成分および Caffeetannin の 1 種 Rosmarinic acid の胃腸運動機能に及ぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍の増殖に関わる Tumor-associated Macrophage (TAM)の M2 マクロファージからの PD-1 発現抑制や脾臓から調整したリンパ球と癌細胞の共培養での殺細胞効果を高める成分を伝統薬物成分および関連化合物から探索する(In Vitro)。

(2) 大腸癌の発生には、潰瘍性大腸炎がリスクファクターであると報告されている。また、ストレス等による胃腸の運動機能の低下もまた、消化器癌発生のリスクファクターと考えられている。①DSS 誘導による潰瘍性大腸炎を抑制する伝統薬物成分を探索する(In Vivo)、②セロトニン誘発や Dopamin 誘発の胃腸運動機能低下を改善する伝統薬物成分を探索する(In Vivo)。

(3) 以上の実験結果に基づいて、AOM と DSS 誘発による大腸癌発生・増殖での伝統薬物成分の抑制効果を明確にし、腫瘍組織周辺のサイトカイン類、ケモカイン、PD-1 産生および癌増殖周辺組織中の免疫染色法による Cyclooxygenase(COX)-2 や癌細胞による CD8⁺T 細胞の疲弊マーカー蛋白 TOX/TOX2 の発現を測定し、その作用機構を明確にする。

3. 研究の方法

(1) ストレス等による胃腸の運動機能の低下もまた、消化器癌発生のリスクファクターと考えられている。そこで、ストレス負荷時のセロトニン誘発による胃腸機能低下に及ぼす紫蘇エキス、精油成分および Rosmarinic Acid の影響を検討する。

(2) DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでの、*Acer* 属植物中の Acertannin の影響を検討し、大腸炎組織中の病理観察による結腸組織の絨毛組織の損傷度や結腸組織中の Cytokine 類、TNF- α および IL-23 の役割を検討する。

(3) 前回の科研課題(17K09301)において、Resveratrol 関連化合物 4 種の Stilbene 類の AOM および DSS 誘導による大腸癌増殖に対する影響を検討し、大腸癌周辺組織中からの Cytokine 類、Chemokine、PD-1 産生および COX-2 発現(Immunohistochemistry, IHC)を測定し、これらの Stilbene 類の作用機構を明らかにする。

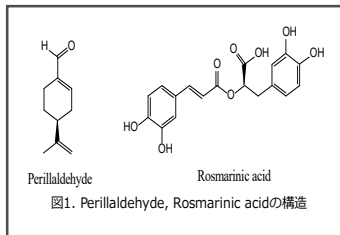
(4) 「黄芩」から単離した 2 種類の Hydroxyflavanone、「山梔子」から単離した Geniposide、*Acer* 属植物中から単離した Acertannin の AOM/DSS 誘発大腸癌の増殖に及ぼす影響を検討し、大腸癌周辺組織中の Cytokine 類、Chemokine、PD-1、COX-2 発現、CD8⁺T 細胞疲弊時に発現する TOX/TOX2、および STAT3 のリン酸化の発現を測定し、これらの化合物の作用機構を明らかにする。

4. 研究成果

伝統薬物には「癌や腫瘍」に効果があると伝承されているが、その有効性や有効成分が不明確である。現在、大腸癌の罹患者が増加しつつ、大腸癌の死亡率も増加している。食生活、難病指定のクローン病の潰瘍性大腸炎の増加およびストレス負荷による胃腸機能の低下にも起因している。本研究では、①ストレス負荷時の胃腸運動機能低下に及ぼす「紫蘇葉」中の Perillaldehyde(精油成分)や Caffeetannin の 1 種である Rosmarinic acid の影響を検討した。②*Acer* 属植物から単離した Acertannin の DSS 誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす影響を検討した。③Resveratrol 関連化合物 2,3-dihydroxystilbene, 3,4-dihydroxystilbene, 4,4'-dihydroxystilbene および 3,4,3',5'-tetrahydroxystilbene、「山梔子」から単離した Geniposide、*Acer* 属植物の Acertannin、「黄芩」から単離した 2(S)-2,5,6',7-tetrahydroxyflavanone および 2(R), 3(R)-pentahydroxyflavanone の AOM/DSS 誘発大腸癌の発生・増殖に対する影響を検討し、M2 マクロファージに関与する PD-1 および癌増殖によって疲弊する CD8⁺T 細胞に発現する TOX/TOX2 発現や STAT3 発現や STAT3 のリン酸化を検討した。以下に、その研究成果を順次報告する。

(1) 紫蘇葉(*Perilla frutescens* var. *crispa* herb)の精油成分 Perillaldehyde および Caffeetannin Rosmarinic acid のマウス胃腸運動機能に及ぼす影響

紫蘇葉エキス(200 mg/kg, 500 mg/kg)、Rosmarinic acid (図 1) (20mg/kg and/or 50 mg/kg) および



Perillaldehyde (図 1) (50 mg/kg and/or 100mg/kg)、陽性 Control 化合物 Ipride HCl (Dopamine D₂ receptor inhibitor)(50 mg/kg)の経口投与は Dopamine (1mg/kg, 腹腔内投与 ip)による胃排出能および小腸運動機能の低下を有意に抑制した(図 2)。一方、5-HT(5 mg/kg, ip)による胃排出能の低下は、紫蘇葉エキス (500 mg/kg)および Perillaldehyde(50mg/kg, 100 mg/kg)によって有意に抑制されたが、Rosmarinic Acid は効果を示さなかった(Data not shown)。

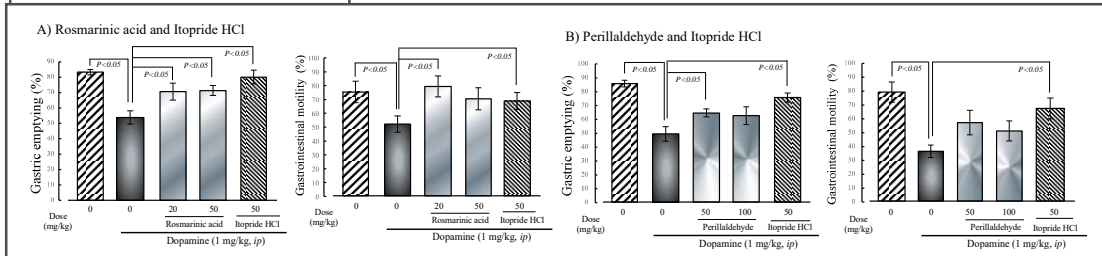


図 2

(2) DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでの *Acer* 属植物中の Acertannin の影響

2%(w/v)DSS 飲料水の 1 週間の自由摂取し、Acertannin (図 3) (30 mg/kg および 100 mg/kg)を 1 日 2 回経口投与した。その結果、2%DSS 飲水によって、結腸粘膜は障害し、Acertannin および潰瘍性大腸炎の治療薬 5-aminosalicylic acid は結腸粘膜障害を阻止した(図 4)。

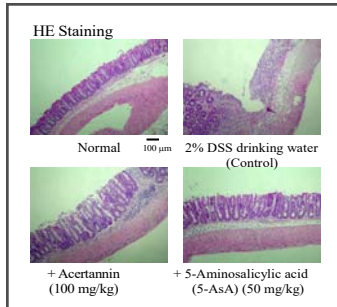
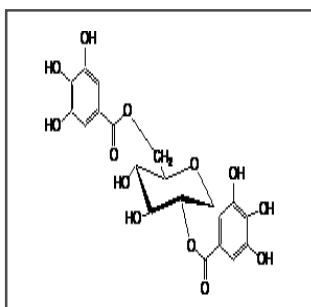


図 4. DSS 誘発結腸粘膜障害

その結果、図 5 に示すように、Acertannin は、結腸短縮および結腸重量の増加を抑制した。結腸中のサイトカイン類 IL-1β、IL-6 およびケモカイン MCP-1 の産生の増加を抑制したが、潰瘍性大腸炎の治療薬 5-Aminosalicylic Acid は上記 3 種類の IL-1β、IL-6 および MCP-1 に対して抑制効果を示さなかった(data not shown)。

図 3. Acertannin の構造

Acertannin および潰瘍性大腸炎の治療薬 5-Aminosalicylic Acid は、結腸中の IL-23 および TNF-α の産生の増加を抑制した(図 6)。

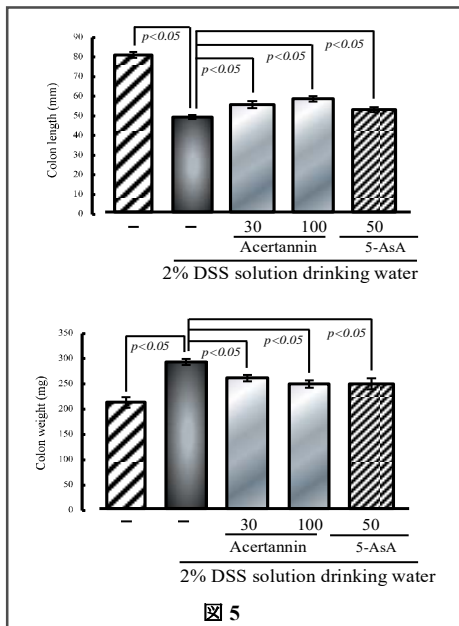


図 5

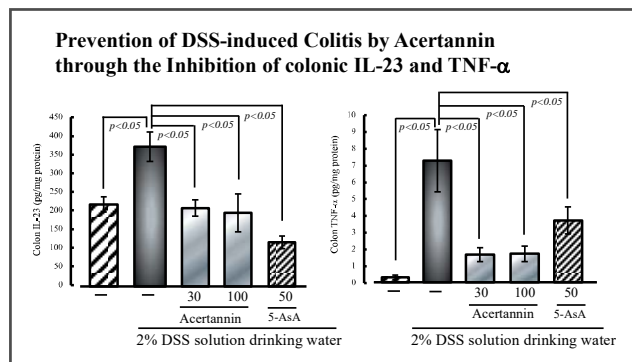
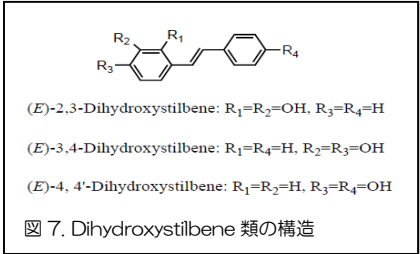


図 6

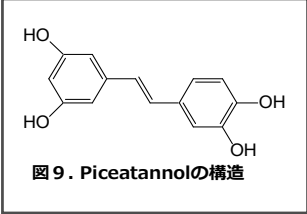
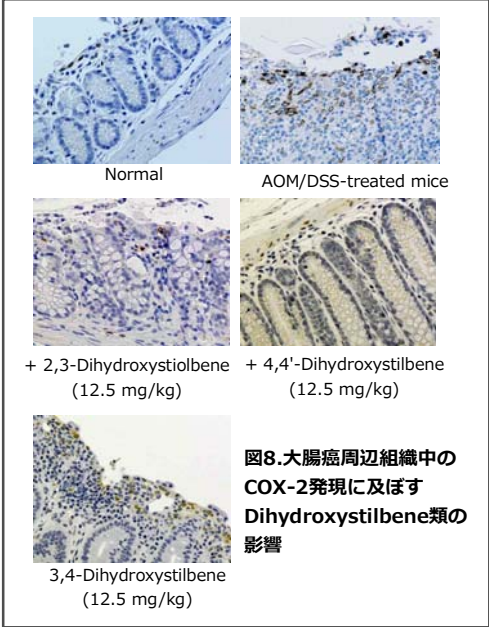
最近、潰瘍性大腸炎には TNF-α および IL-23 が関与していることが報告され、臨床的にも抗 TNF-α 抗体で効果が無い患者も、抗 IL-23 抗体の投薬で効果があると報告され、IL-23 の潰瘍性大腸炎の関与が示されている。Acertannin は DSS 誘発潰瘍性大腸炎を 5-Aminosalicylic Acid と共に抑制し、結腸中の TNF-α および IL-23 の発現を抑制した。実験的な潰瘍性大腸炎での結腸 IL-23 発現に対する Acertannin の抑制作用は初めてである。

(3) Stilbene 化合物の AOM/DSS 誘発結腸癌に及ぼす影響

a) 3 種類の Dihydroxystilbene および Tetrahydroxystilbene Piceatannol について



3 種類の Dihydroxystilbene 類は、結腸の重量、腫瘍面積、腫瘍数および腫瘍周辺組織中の COX-2 陽性細胞数の増加を抑制した(図 8)。さらに、結腸 MCP-1 および PD-1 の上昇を抑制した(Data not shown)。

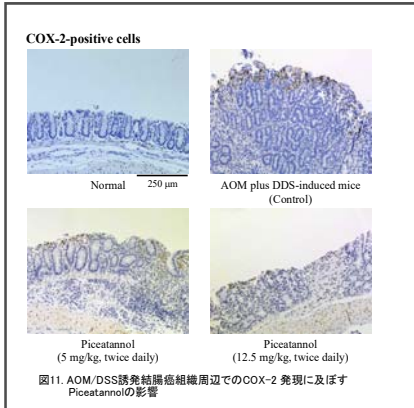
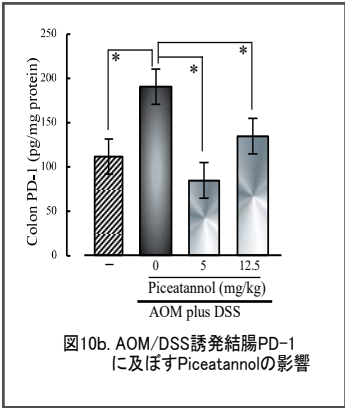
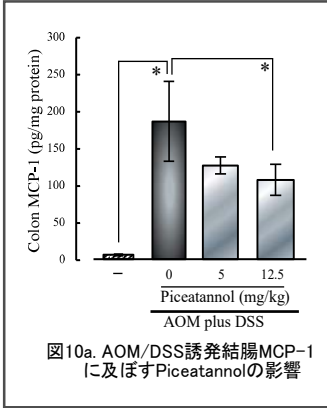


① Picetannol (図 9)は、AOM/DSS による結腸の重量増加は抑制したが、結腸の長さの短縮には影響を与えなかった(Data not shown)。

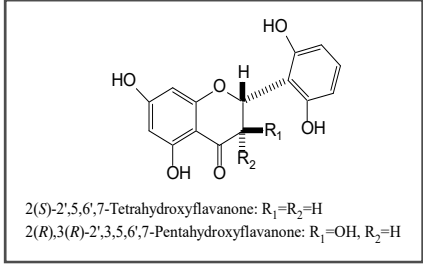
- ② Picetannol は AOM/DSS 誘発による結腸癌の増殖を抑制した(Data not shown)。
- ③ Picetannol は AOM/DSS 誘発による結腸癌の増殖を抑制した(Data not shown)。
- ④ Picetannol は癌組織周辺での MCP-1 および PD-1 発現の増加(図 10a, 10b)を抑制し、COX-2 発現を抑制した(図 11)

【結論】

Picetannol の AOM/DSS 誘発結腸癌の増殖は、3 種類の Dihydroxystilbene と同様に、M2 型 Macrophage からの PD-1 発現および COX-2 発現の抑制を介して、結腸癌の増殖抑制に関与している可能性が示唆された。



(4) 黄芩中の 2 種の Tetra-および Penta-Hydroxyflavanone の AOM/DSS 誘発結腸癌に及ぼす影響

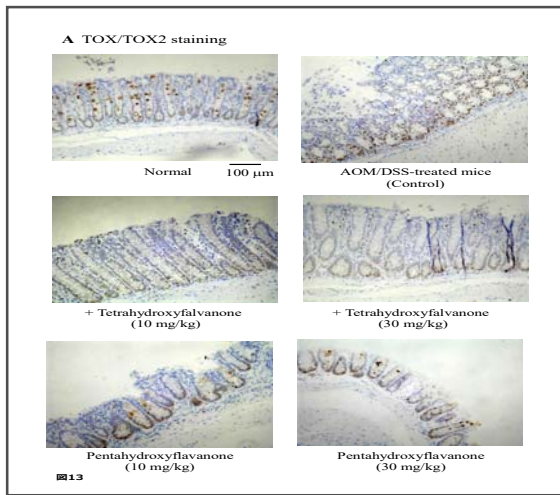


黄芩(*Scutellaria baicalensis* Roots)中の主成分 Baicalein や Wogonin の AOM/DSS 誘発結腸癌に対する抗腫瘍効果は既に報告されている。上記以外の成分 Tetra-, Penta-Hydroxyflavanone (図 12)の AOM/DSS 誘発結腸癌に及ぼす影響を検討した。

- ① 2 種の Tetra-, Penta-Hydroxyflavanone は、AOM/DSS 誘発による結腸癌の増殖や結腸癌組織中の PD-1 および IL-10 の発現を抑制した(Data not shown)。

図 12. 2 種類の Hydroxyflavanone の構造

- ② Pentahydroxyflavanone は、30mg/kg の用量において、結腸癌組織中のサイトカイン類 IL-1β、VEGF、MCP-1 産生の増加を抑制した(Data not shown)。
- ③ 結腸組織の Immunohistochemistry による分析から、2 種類の Tetra-, Penta-Hydroxyflavanone は COX-2 発現の増加を抑制した(Data not shown)。
- ④ 結腸組織の Immunohistochemistry による分析から、Tetra-, Penta-Hydroxyflavanone は TOX/TOX2 発現の増加を抑制した(図 13 および図 14)。



誘発における結腸組織での TOX/TOX2 発現の増加すなわち癌増殖の際に引き起こされる CD8⁺T 細胞の疲弊を起すことを抑制した。

(5) Acertannin および山梔子から単離した Geniposide の AOM/DSS 誘発結腸癌に対する影響

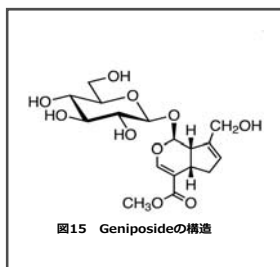


図15 Geniposideの構造

DSS 誘発炎症性大腸炎に効果のあった Acertannin および Geniposide (図 15)は、AOM/DSS 誘発結腸癌に対する影響を検討した。その結果、①Acertannin(100mg/kg)および Geniposide(100mg/kg)は AOM/DSS による結腸癌の増殖を抑制し、②両成分は、結腸組織中の IL-1β、IL-10、MCP-1、PD-1 発現の増加を抑制した(Data not shown)。③両成分は、結腸組織中の COX-2、TOX/TOX2(CD8⁺T 細胞の疲弊)の発現を抑制した(Data not shown)。④ Acertannin および Geniposide は Immunohistochemical 分析から結腸組織中の STAT3 のリン酸化の発現を抑制した(図 16、図 17)。

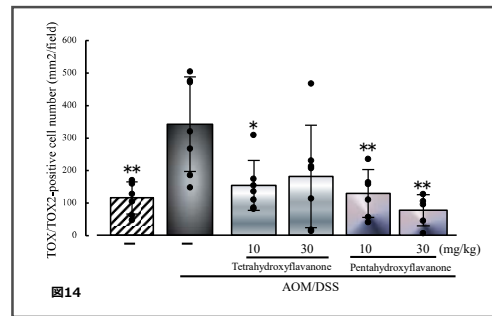


図14

【結論】 黄芩から単離した Tetra-および Penta-hydroxyflavanone による AOM/DSS 誘発結腸癌の増殖抑制は、COX-2 発現抑制を介する IL-10 および PD-1 の発現抑制を介していることが推察された。その一方、2種の Flavanone は、AOM/DSS

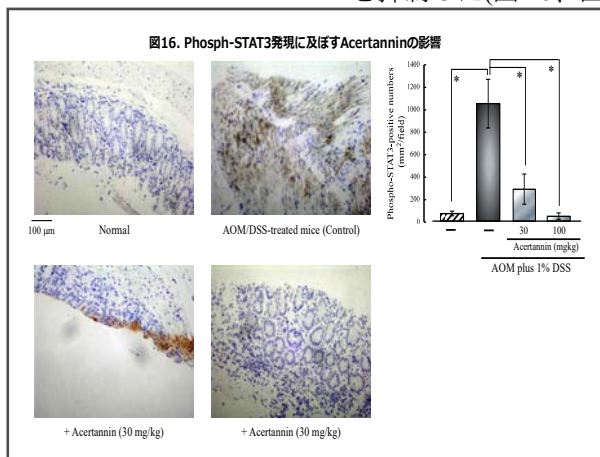


図16. Phospho-STAT3発現に及ぼすAcertanninの影響

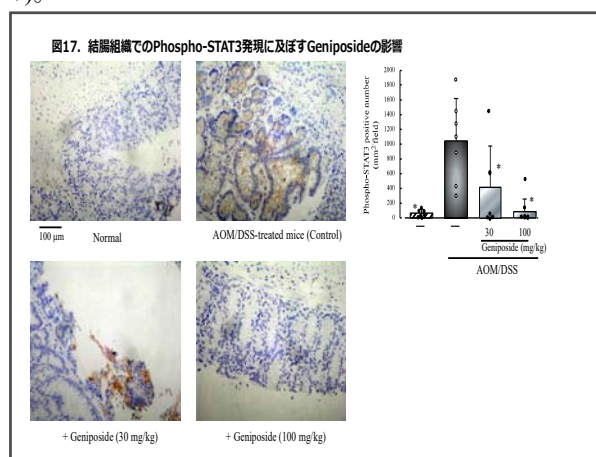


図17. 結腸組織でのPhospho-STAT3発現に及ぼすGeniposideの影響

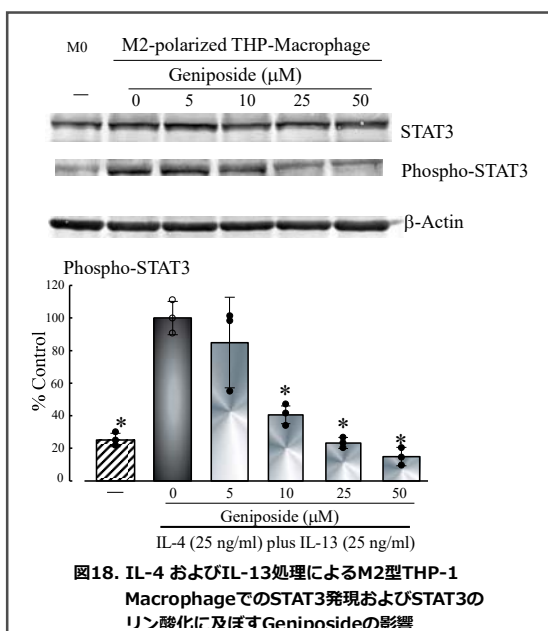


図18. IL-4 およびIL-13処理によるM2型THP-1 MacrophageでのSTAT3発現およびSTAT3のリン酸化に及ぼすGeniposideの影響

⑤ Geniposide は、IL-4 と IL-13 誘導による M2 型 Macrophage 分化過程での STAT3 のリン酸化を抑制した(In Vitro)(図 18)。

【結論】

マウスでの AOM/DSS 誘発結腸癌に及ぼす Acertannin および Geniposide は結腸癌の増殖を抑制した。その作用機構に関して、

- ① Acertannin および Geniposide による結腸癌組織中の IL-1β、IL-10、MCP-1 および PD-1 の発現阻止は、COX-2 発現の増加の抑制および結腸癌組織での CD8⁺T 細胞の疲弊 (TOX/TOX2 発現)の抑制によるものである。
- ② 更に、Acertannin、Geniposide は、癌組織周辺の M2 型 Macrophage 分化過程での STAT3 のリン酸化の抑制を通して、TOX/TOX2、COX2 発現の低下によるサイトカイン類 IL-1β、IL-10、MCP-1、PD-1 量の低下によって抗腫瘍効果をもたらしたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Kimura	4. 巻 74
2. 論文標題 Long-term oral administration of piceatannol (3,5,3',4'-Tetrahydroxystilbene) attenuates colon tumor growth induced by azoxymethane plus dextran sulfate sodium in C57BL/6J mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition and Cancer	6. 最初と最後の頁 2184-2195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01635581.2021.1985532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Kimura, M. Sumiyoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Two hydroxyflavonones isolated from <i>Scutellaria baicalensis</i> roots prevent colitis-associated colon cancer in C57BL/6J mice by inhibiting programmed cell death-1, interleukin 10, and thymocyte selection-associated high mobility group box proteins TOX/TOX2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytomedicine	6. 最初と最後の頁 154076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phymed.2022.154076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Y. Kimura, M. Sumiyoshi, T. Kiyoi, K. Baba	4. 巻 886
2. 論文標題 Dihydroxystilbene prevent azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer by inhibiting colon cytokines, a chemokine, and programmed cell death-1 in C57BL/6J mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.173445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Y. Kimura, M. Taniguchi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects <i>Perilla frutescens</i> var. <i>crispa</i> herb extract, the essential oil perillaldehyde, and the caffeetannin rosmarinic acid on gastric emptying and gastrointestinal motility in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 194-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kimura, M. Taniguchi, T. Okuda	4. 巻 89
2. 論文標題 Acertannin Prevented Dextran Sulfate Sodium-induced Colitis by Inhibiting the Colonic Expression of IL-23 and TNF- α in C57BL/6J Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Planta Medica	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-2037-2995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kimura, M. Taniguchi, T. Okuda	4. 巻 947
2. 論文標題 Acertannin prevents azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer growth by inhibiting the colonic expression of interleukin-1 beta, monocyte chemoattractant protein-1, cyclooxygenase-2, and thymocyte selection-associated high mobility group box proteins (TOX)/TOX2 in C57BL/6J mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 175680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2023.175680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kimura, M. Sumiyoshi, M. Taniguchi	4. 巻 118
2. 論文標題 Geniposide prevents tumor growth by inhibiting colonic interleukin-1 beta and monocyte chemoattractant protein-1 via down-regulated expression of cyclooxygenase-2 and thymocyte selection-associated high mobility box proteins TOX/TOX2 in azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 110077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2023.110077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------