

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590461

研究課題名(和文)炎症発癌に実効する阻害化合物探索

研究課題名(英文)Detection of effective compounds for inhibiting inflammation-related carcinogenesis

研究代表者

岡田 太(OKADA, Futoshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00250423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：炎症発癌に対する予防化合物探索を目的として研究を施行した。炎症発癌の起始は炎症細胞の局所浸出に端を発することから、この浸出過程を遮断する化合物を見出すために、培養スクリーニング系を確立した。多くの化合物の中から、候補化合物を選択した。それは、in vivoにおける炎症誘発モデルを抑制した。さらにマウス炎症発癌モデルの癌化を抑制した。DNAマイクロアレイ解析の結果、その化合物の作用はNF- $\kappa$ B発現の活性化を抑制することを見出した。加えて、その作用を担う最小骨格を決定した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify chemopreventive compounds that inhibit inflammation-related carcinogenesis. Inflammation-related carcinogenesis is initiated by massive infiltration of inflammatory cells into an inflamed lesion. I found several compounds that inhibit the infiltration by using in vitro screening model. Among them, I found that a compound had the strongest inhibitory effects on the inflammatory cell infiltration, and that it inhibited foreign body-induced inflammation-related carcinogenesis in a mouse model. DNA array revealed that expressions of inflammation-related molecules such as NF- $\kappa$ B-related molecules were inhibited. Then, I determined minimum structure of the compound that will be responsible for the inhibition of inflammation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：炎症発癌 化合物

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は炎症細胞の浸出を契機として癌化する“炎症発癌”の動物モデルを開発し、この原因に浸出好中球が第一義的に関わることを証明した (Am J Pathol 163: 2221-2232, 2003). すなわち、異物 (ゼラチンスポンジ) 移入により誘発される炎症に対し、抗マウス好中球枯渇抗体 (RB6) 投与や、インテグリン 2 (好中球の炎症局所血管内皮への接着因子) 遺伝子欠失マウスを用いると、好中球浸出は抑制され癌化が完全に阻止される。さらに、gp91phox 遺伝子欠失マウスを用いることで、浸出好中球の生成する活性酸素 (NADPH oxidase 由来) が、炎症発癌に伴う遺伝子異常の主因となることを先駆けて報告してきた (Am J Pathol 169: 294-302, 2006)。これらの成果より、炎症細胞の浸出に端を発する炎症発癌の阻止には、炎症細胞の浸出阻害を標的とする治療法の開発により達成されるという着想に至った。

これまでの国内外の研究においては、炎症細胞の浸出の際のローリング、接着、経内皮遊走・浸潤に関わる接着分子リガンド結合部に焦点をあてたペプチド等の添加培養による阻害実験は多数報告されている。しかしながら、これらはあくまでも試験管内における成績であり、生体内における実証は殆どなされていない。

申請者は上記の着想と現状の問題点を鑑み、炎症細胞の浸出を再現し、低分子阻害化合物を添加した際の浸出阻害能を定量解析できるスクリーニング系を開発した (Nitric Oxide 25: 183-194, 2011)。これまでに研究室に現有する 400 種超に及ぶ既存の化合物 (炎症関連分子、癌組織環境、代謝、細胞内器官、遺伝子・酵素、フリーラジカル、チャネル、シグナル伝達経路等) を解析し、22 種の化合物に炎症細胞の血管内皮細胞への接着・浸出の阻害作用を見いだしてきた。

本研究は、選択された 22 種の阻害化合物の中から“炎症発癌”制御に実効する化合物を決定する。この炎症発癌過程を遮断する化合物の作用分子を包括的に探索するのと併行して、分子間結合能シミュレーション等を施行し、“炎症発癌”抑制に必要な最小結合骨格の同定を最終到達点とする。

## 2. 研究の目的

“炎症発癌”の起始は、炎症細胞の浸出に始めることから、その予防や治療は、炎症細胞浸出を阻害・遮断することで達成される。そこで、炎症細胞浸出を定量できる *in vitro* スクリーニング系を開発

し、これまでに 400 種超に及ぶ阻害化合物を評価してきた。その中から既存の抗炎症剤とは異なる作用を有する 22 種を選択してきた。本研究の目的は、1) 炎症発癌に実効する低分子化合物の決定 (順位付け) と、作用分子を同定すること。さらに、2) 分子間結合能シミュレーション等による“炎症発癌”の抑制に必要な最小構造骨格を決定することで、これまでに提唱されていない炎症発癌の分子標的を提示することにある。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症細胞の生体内浸出阻害を指標とした候補化合物の絞り込み (*in vivo* 機能解析)

炎症細胞浸出を *in vitro* で再現し、低分子化合物の浸出阻害を定量解析できるアッセイ系を用いた化合物のスクリーニングをこれまでにほぼ終え、22 種の候補化合物を選定している。そこで、候補化合物の *in vivo* における実効性を評価し、候補順位を付すことで化合物を数個レベルまで絞り込む。

ゼラチンスポンジをマウス背部皮下に移入する。この異物の移入を契機として、スポンジ内に炎症細胞が浸出する系を使用する (Br J Cancer 94: 854-862, 2006)。

移入と同時に阻害剤を連日投与する。投与量・経路は既報文献に準拠にする。なお、対照群は DMSO 等の投与を行う。

5 日目にスポンジを摘出し、これを 0.2% コラゲナーゼ溶液中で溶解する。スポンジ内に浸出する炎症細胞総数を数えることで浸出阻害活性を比較する。

回収した細胞は、May-Grünwald, Giemsa 染色をして浸出阻害を受ける細胞種を決定する。

(2) 炎症発癌の阻止を指標とした化合物の決定 (*in vivo* 機能解析)

申請者の確立した炎症発癌マウスモデル (Am J Pathol 2003; Int J Cancer 2007) を用いて、化合物の *in vivo* での効果を評価する。この段階で化合物の持つ炎症発癌の阻止活性に順位が付き、以降の研究計画 (3) では本研究項目で決定される最上位の化合物を対象として解析する。

ゼラチンスポンジ (3x5x10mm) を C57BL/6 マウス皮下に小切開を加え移入する。

マウス退縮型線維肉腫細胞 (QR-32; 1x10<sup>5</sup> 個) を移入スポンジ内に接種する。

移植後より阻害剤を連日投与する。

腫瘍移植後経時的に腫瘍を摘出し、H&E 組織学的検査、抗 RB6 抗体 (抗好中球抗体) を用いた免疫組織染色を施行し、*in vivo* における阻害剤の効果を検証する。

週 3 回の腫瘍計測を行い、発癌頻度および潜伏期間等を比較して発癌予防作用を持つ

化合物を最終決定する。また、副作用判定のための体重測定を行う。マウスが瀕死の状態となるか、もしくは腫瘍死した場合には、剖検を行い転移の有無を含めて担癌宿主における病態を把握する。一部は組織学的検査を施行する。

#### (3)炎症細胞の浸出阻害に関わる機構の解析

阻害化合物の投与により発現変動する遺伝子を包括的に把握するために、炎症局所および骨髄組織から得たRNAを用いたDNAマイクロアレイ解析を施行する。また、得られる研究成果に応じ即座に対応できるように、同一サンプルからはプロテオミクス解析用のタンパク質の調整も併行する。なお、対照には溶媒のDMSO等の投与組織をあてる。対象分子には特に炎症細胞浸出に関わる炎症性サイトカインや、ケモカイン発現等に焦点をあてて解析を進める。

#### (4)阻害化合物と標的分子との分子間結合能シミュレーション等による結合最小部位の決定 (*in vitro*あるいは*in silico*構造機能解析)

阻害化合物および3)にて決定される標的分子の結合構造活性相関および骨格基本構造等に関する情報は、NIH Chemical Genomics Center (NCGC)にて集積・整備されているデータベース

(<http://www.ncgc.nih.gov/>)や、タンパク質データバンク(<http://www.rcsb.org/pdb/>)より収集する

阻害化合物の標的分子への結合配列の検索には、分子動力学専用計算機等を用いた分子シミュレーションを施行する。分子間結合特性と、3次元可視化構造情報による阻害化合物の到達性も併せて勘案する。

リード化合物をコンピューターシミュレーションして策定する

当該リード化合物の作用骨格を含む既存化合物が、マウスモデルの炎症発癌を抑制することの最終検証を行う。

### 4. 研究成果

#### (1)炎症反応を抑制する化合物のスクリーニング

申請者がこれまでに集積してきた研究成果より、炎症発癌の起始は炎症細胞の局所浸出に端を発することから、この浸出過程を遮断する化合物を新たに見出すために、培養スクリーニング系を確立した。その結果、400種超に及ぶ化合物の中から、22種類の化合物を選択し、中でも最も浸出抑制活性の高い化合

物を抽出した。

#### (2)候補化合物による炎症浸出抑制効果の検討

炎症細胞の局所浸出を示す複数の動物モデルを用いて候補化合物の浸出抑制効果を検討した。用いたモデルは、ゼラチンスポンジの皮下移入による炎症細胞浸出アッセイ法(Br J Cancer 94: 854-862, 2006)、および空気嚢炎症法(Air-pouch models of inflammation)を採用し検討したところ、いずれのモデルにおいても対照溶媒(DMSO)投与に対して有意な浸出抑制を見いだした。

#### (3)炎症発癌モデルを用いた候補化合物による抑制効果の検討

候補化合物は、異物誘発の炎症反応によって退縮型細胞が癌化するマウス炎症発癌モデルを用いて、その発癌抑制効果を検討した。その結果、異物によって誘発される炎症浸出が著しく抑制され、これに伴い癌化も抑制された。

#### (4)DNAマイクロアレイ解析による候補化合物の標的シグナル分子の解析

候補化合物の作用対象(炎症関連シグナル分子)を明らかにするために、候補化合物およびその対照溶媒を投与したマウスの炎症局所よりtotal RNAを回収し、DNAマイクロアレイ解析を施行した。その結果、複数の炎症関連分子の変動が観察された。中でも、候補化合物は、炎症反応シグナルの中心的な作用を持つNF- $\kappa$ B発現とその関連分子の発現および活性化を抑制することを見出した。

#### (5)候補化合物の炎症浸出を抑制するための最小骨格構造の解析

炎症浸出や炎症性シグナルの遮断に関わる化合物の最小骨格を同定するために、当該化合物の分割骨格を含む標品を用いて、異物誘発炎症浸出を抑制する作用(Br J Cancer 94: 854-862, 2006)を指標として最小骨格を決定した。

現在この最小骨格を含む標品を用いて前述のマウス炎症発癌モデルならびに化学物質誘発大腸炎等による発癌モデルを用いて発癌抑制・予防作用の有無を検討中である。

#### (6)本研究成果の国内外の位置付けとインパクト・今後の展望

癌死をもたらす発癌要因のうち、炎症の占める割合は約20~25%と推計されている(RA Weinberg, ed. The Biology of Cancer, pp.441-442, 2007; Nature 420: 860-867, 2002; Lancet Oncol 2:533-543,2001)。換言

すれば、因果関係の明らかな発癌要因は、癌の治療・予防に直結する標的となる。“炎症発癌”の機構は、第一義的に炎症細胞の局所浸出と、次いで炎症細胞に由来するフリーラジカルを介した遺伝子毒性や、炎症性サイトカイン等による細胞増殖の促進にある。本研究は、炎症の初期反応そのものを制御することで、“炎症発癌”に対する最初の具体的治療・予防戦略の科学的根拠を提示した。

これまでの分子標的療法の多くは、癌細胞のレセプター構造改変部、リン酸化修飾部もしくはATP結合部等のシグナル異常に焦点を当ててきた。本研究の対象は、本来生体に備わる白血球細胞等の血管内皮への接着・運動浸潤(経内皮浸出)に関わる生理機能にある。従って、炎症細胞浸出に関わる分子シグナル機構に対するピンポイントで、かつ副作用の軽減される低分子標的療法の開発は、過剰で制御を受けない炎症反応を背景とする自己免疫疾患(慢性関節リウマチ・全身性エリテマトーデスなど)へも広く開発応用され、新たな研究の展開と創薬開発へと発展する意義を有する。

本研究は、炎症細胞浸出に焦点を絞り、報告者が独自に開発してきた*in vitro*及び*in vivo*の炎症解析系を用いて、分子標的阻害化合物の中から炎症発癌に実効性する化合物を決定した。さらに、阻害に関わる最小骨格分子を決定した。今後はタンパク質構造ベース等から類推し、作用する既存薬剤ライブラリーもしくは合成化合物を照合し、動物モデルによる実効性の評価を進める予定である。従って本研究は、構造ゲノム・タンパク質情報・技術を利用した薬剤探索の先駆け研究として位置付けられ、新たな分子設計による創薬開発研究として、もたらず意義は極めて重要と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計9件)

Kanda Y, Kawaguchi T, Kuramitsu Y, Kitagawa T, Kobayashi T, Takahashi N, Tazawa H, Habelhah H, Hamada J-I, Kobayashi M, Hirahata M, Onuma K, Osaki M, Nakamura K, Kitagawa T, Hosokawa M and Okada F. Fascin regulates chronic inflammation-related human colon carcinogenesis by inhibiting cell anoikis. *Proteomics* 14: 1031-1041, 2014. doi: 10.1002/pmhc.201300414

Nakabayashi M, Osaki M, Kodani I, Okada E, Ryoike K, Oshimura M, Ito H and Kugoh H. PITX1 is reliable biomarker for predicting prognosis in patients with

oral epithelial dysplasia. *Oncol Lett* 7: 750-754, 2014. PMID:24527083

Kuramitsu Y, Wang Y, Okada F, Baron B, Tokuda K, Kitagawa T, Akada J and Nakamura K. Malignant progressive tumor cell clone exhibits significant up-regulation of cofilin-2 and 27 kDa modified form of cofilin-1 compared to regressive clone. *Anticancer Res* 33 (9): 3661-3665, 2013. doi: 10.1002/elps.201300497

Tazawa H, Kawaguchi T, Kobayashi T, Kuramitsu Y, Wada S, Satomi Y, Nishino H, Kobayashi M, Kanda Y, Osaki M, Kitagawa T, Hosokawa M and Okada F. Chronic inflammation-derived nitric oxide causes conversion of human colonic adenoma cells into adenocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 319: 2835-2844, 2013. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.08.006.

Iwamoto H, Kanda Y, Sejima T, Osaki M, Okada F and Takenaka A. Serum miR-210 as a potential biomarker of early clear cell renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 44 (1): 53-58 2014. doi: 10.3892/ijo.2013.2169.

Kobayashi S, Kuwata K, Sugimoto T, Igarashi K, Osaki M, Okada F, Fujii J, Bannai S, and Sato H. Enhanced expression of cystine/glutamate transporter in the lung caused by the oxidative-stress-inducing agent paraquat. *Free Radic Biol Med* 53: 2197-2203, 2012. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.040.

Imaoka N, Hiratsuka M, Osaki M, Kamitani H, Kambe A, Fukuoka J, Kurimoto M, Nagai S, Okada F, Watanabe T, Ohama E, Kato S, Oshimura M. Prognostic significance of sirtuin 2 protein nuclear localization in glioma: an immunohistochemical study. *Oncol Rep* 28 (3): 923-930, 2012. doi: 10.3892/or.2012.1872.

Kiura K, Hasebe A, Iyori M, Okada F, Yasuda M, Shamsul HM, Ohtani M, Totsuka Y, Wakita M and Shibata K. Involvement of regulatory T cells in Toll-like receptor 2-mediated anti- and pro-tumor activities of the mycoplasma lipopeptide FSL-1. *Immunobiology* 216 (8): 891-900, 2011. doi: 10.1016/j.imbio.2011.02.006.

Onuma K, Suenaga Y, Sakaki R, Yoshitome S, Sato Y, Ogawara S, Suzuki S, Kuramitsu M, Yokoyama H, Murakami A, Hamada J, Nicolson GL, Kobayashi M, Fujii J and

Okada F. Development of a quantitative bioassay to assess preventive compounds against inflammation-based carcinogenesis. Nitric Oxide 25: 183-194, 2011. doi: 10.1016/j.niox.2011.02.003.

[学会発表](計7件)

池田多津世, 末永裕佳, 神田裕介, 小沼邦重, 尾崎充彦, 岡田 太: 炎症発癌を標的とする阻害化合物探索と実効性評価. 平成24年度文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「がん研究等の特性を踏まえた支援活動」平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ: 個体レベルのがん研究による相乗効果: 学際的インターアクションから創造へ, プログラム・抄録集, p70, 2013年2月7日, 琵琶湖ホテル, 大津市

池田多津世, 末永裕佳, 神田裕介, 小沼邦重, 尾崎充彦, 岡田 太: 炎症発癌を遮断する阻害化合物探索. 第102回日本病理学会総会, 日本病理学会会誌p491 (SP3-2), 2013年6月8日, ロイトン札幌, 札幌

小沼邦重, 池田多津世, 末永裕佳, 神田裕介, 小林正伸, 尾崎充彦, 岡田 太: 炎症発癌の遮断に向けた化合物の実効性の検証. 第66回日本酸化ストレス学会学術集会 プログラム・抄録集, p57, 2013年6月13日, ウィンクあいち, 名古屋.

岡田 太: 炎症浸出の阻害化合物探索による炎症発癌の抑制. 第86回日本生化学会, プログラム号85 (8): p125, 2013. 2013年9月11日, パシフィコ横浜, 横浜

岡田 太: 低酸素再酸素化環境と発癌・悪性化の進展. 平成23年度北海道大学遺伝子病制御研究所共同研究集会(招待講演) 2011年9月6日, 北海道大学医学部フラテホール, 札幌市

岡田 太: 発酵玄米によるマウス炎症発がんの予防. 第18回 日本がん予防学会学術集会(ポスターディスカッション). 2011年6月20日, 京都府立医科大学図書館ホール, 京都市

[図書](計2件)

Okada F. Inflammation as a niche for tumor progression. *In: Cancer and Inflammation Mechanisms: Chemical, Biological, and Clinical Aspects* (Eds. Y Hiraku, S Kawanishi and H Ohshima), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp149-164, 2014.

Okada F and Kobayashi H. How aging and cellular senescence influence metastasis. *In: Cancer Metastasis:*

biologic basis and therapeutic (Eds. D Lyden, DR Welch and B Psaila). Cambridge University Press, pp105-116, 2011

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等:

<http://byoutaiseikagaku.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 太 (OKADA, Futoshi)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 00250423