

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590883

研究課題名(和文) 伝統薬物成分の紫外線による光化学療法および発癌抑制とその作用機構

研究課題名(英文) Effects of compounds isolated from traditional drugs on UV-induced photochemotherapy and carcinogenesis and their mechanisms

研究代表者

木村 善行(Kimura, Yoshiyuki)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20294796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：黄芩から単離した2',5,5',7-Tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavoneおよび2(R),3(R)-2',3,5,6',7-Pentahydroxyflavanoneは、MMP-9発現およびVEGF産生抑制を介し、短期高用量UVB照射による皮膚増殖性皮膚炎症を抑制していることを明らかにした。黄芩中のWogoninはリンパ管新生を介した抗腫瘍・抗転移効果を示した。セリ科薬用植物中のFurocoumarin類はUVA照射下、Chk1のリン酸化増加およびcdc2のリン酸化減少を介したG2/M期休止によるMelanoma細胞増殖抑制、抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Tetrahydroxy-dimethoxyflavone and Pentahydroxyflavanone isolated from Scutellariae Radix inhibited the acute UVB-induced skin inflammation through the inhibition of MMP-9 expression and VEGF production. We found that wogonin isolated from Scutellariae Radix had anti-tumor and anti-metastatic actions through anti-lymphangiogenesis. We found that the anti-proliferative and anti-tumor actions of UVA plus furocoumarins isolated from Umbelliferae medicinal plants were due to G2/M arrest of the cell cycle by an increase in phospho-Chk1 and decrease in phospho-cdc2 of melanoma cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：癌 植物成分 薬理学 生理活性 紫外線

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の環境破壊の進展と共に、気候変動が著しく悪化の方向に変化しつつあり、オゾン層の破壊もその一つであり、地表に到達する紫外線量が増加している。その結果、長期の紫外線の照射による皮膚癌の発生の増加が予想されている。

(2) 短時間の局所的な紫外線 A 波照射(UVA)と Psolaren の併用療法(PUVA 療法)は、尋常性乾癬、皮膚の悪性リンパ腫や尋常性白斑症などの治療に適用されている。

(3) PUVA 療法に用いられている Psolaren は、皮膚病疾患に伝統的に使用されているセリ科植物中に多種類の Psolaren 関連化合物が含有され、単離されている。

(4) 和漢薬には、外用剤や内服剤として、伝統的に皮膚疾患の治療薬として使用されている背景がある。従って、和漢薬には、長期 UVB 照射による発癌抑制作用および短時間・局所照射による固形癌増殖や表皮の異常増殖(炎症性角化症等)の抑制作用を有する化合物が存在している可能性が高い。本研究において、伝統的に皮膚障害に使用されている和漢薬にその素材を求めた。

2. 研究の目的

紫外線の暴露は、皮膚老化と共に皮膚癌の発生を引き起こす一方、乾癬、尋常性皮膚角化症や悪性リンパ腫の治療には紫外線 A 波(UVA)と光化学療法剤(Psoralein)、即ち PUVA 療法が実施されている。

(1) UVA との併用薬物が少なく、固形腫瘍に対する影響も明らかでない。本研究では、皮膚疾患に使用されている伝統薬物から UVA+光化学療法薬物の探索研究を行い、その抗腫瘍効果の作用機構を明らかにする。

(2) 長期 UVB 照射の発癌リスクを防止する化合物の探索研究および短期 UVB 照射による増殖性皮膚炎症に対する抑制薬物の探索研究を行う。

(3) 長期の UV 照射は、皮膚の血管新生と共にリンパ管新生が関与し、発癌や腫瘍増殖に関与していることから、リンパ管新生作用を標的とした抗腫瘍・抗転移剤の探索研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 短期 UVB 照射による増殖性皮膚炎症に対する影響：黄芩(*Scutellaria baicalensis*)から単離した Baicalein および Wogonin 以外の 4 種類の Flavonoid 成分を 2 週間経口投与し、投与 7 および 8 日目に高容量 UVB(200 mJ/cm²)照射し、皮膚炎症を誘発し、皮膚の肥厚、表皮層、真皮層の厚さおよび皮膚中の Matrix Metalloproteinase(MMP)を測定する。

(2) リンパ管新生を介した抗腫瘍・抗転移効果：黄芩(*Scutellaria baicalensis*)から単離した Wogonin(25 および 50mg/kg)を抗転移腫瘍株 LM8 を背部皮下に移植したマウスに

35 日間投与し、腫瘍の容積量、肺、肝臓への転移数および腫瘍組織のリンパ管新生および血管新生を測定し、さらに、Wogonin のリンパ管新生に関わる VEGF-C および VEGF Receptor-3 の発現を測定する。

(3) UVA 照射とセリ科植物から単離した Furocoumarin 類による抗腫瘍効果：B16F10 Melanoma をメラニン含有ヘアレスマウス背部に皮下移植し、Furocoumarin 類(0.3~1.0mg/kg)腹腔内投与後、UVA(1 J/cm²)照射を 20 日間し、腫瘍容積量を測定する(*In Vivo*)。B16F10 Melanoma 細胞と各種 Furocoumarin 類(0.1-10.0μM)を加え、UVA(5 J/cm²)照射し、細胞増殖能、細胞周期および細胞周期に関わる Chk1、cdc2 の発現およびリン酸化を測定し、その作用機構を明らかにする(*In Vitro*)。

4. 研究成果

本研究では、皮膚疾患の治療薬として使用されている伝統薬物として、①黄芩(*Scutellaria baicalensis* roots)から単離した主成分 Baicalein および Wogonin 以外の 4 種類の Flavonoid 成分の短期 UVB 照射による増殖性皮膚炎症作用に対する影響、②黄芩から単離した主成分 Wogonin のリンパ管および血管新生を介した抗腫瘍・抗転移効果および③セリ科植物の白芷(*Angelica dahurica* roots)や蛇床子(*Cnidium japonicum* seeds)などから単離した 23 種類の Coumarin 類と UVA 照射併用における Melanoma 細胞の増殖抑制とその作用機構(*In Vitro*)および Melanoma 移植マウスでの抗腫瘍効果(*In Vivo*)を検討した。以下にその研究成果を順次報告する。

(1) 黄芩(*Scutellaria baicalensis* roots)中の 2',5,5',7-tetrahydroxy-6',8-dimethoxyflavone (1)、skullcapflavone II (2)、2(S)-2',5,6',7-tetrahydroxyflavanone (3)、2(R),3(R)-2',3,5,6',7-pentahydroxyflavanone (4)(図 1)の高用量短期 UVB 照射による皮膚障害に及ぼす影響：

黄芩中の 4 種類の Flavonoid 類の内、Compound 1(50 mg/kg)および Compound 4(10 および 50 mg/kg)の投与は、高用量 UVB 照射(200 mJ/cm²)による炎症性の皮膚肥厚および耳介の浮腫を抑制した(図 2)。

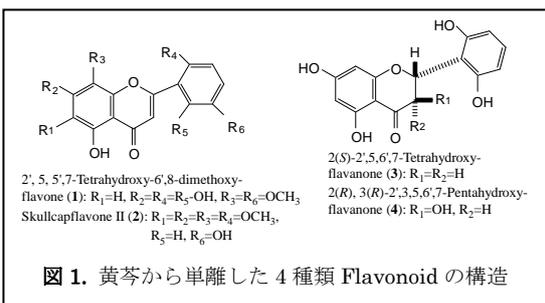
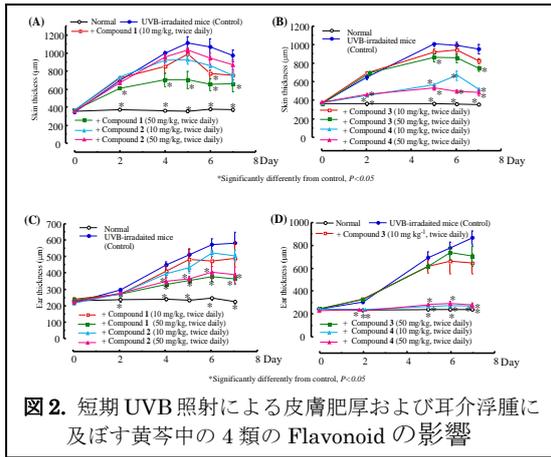
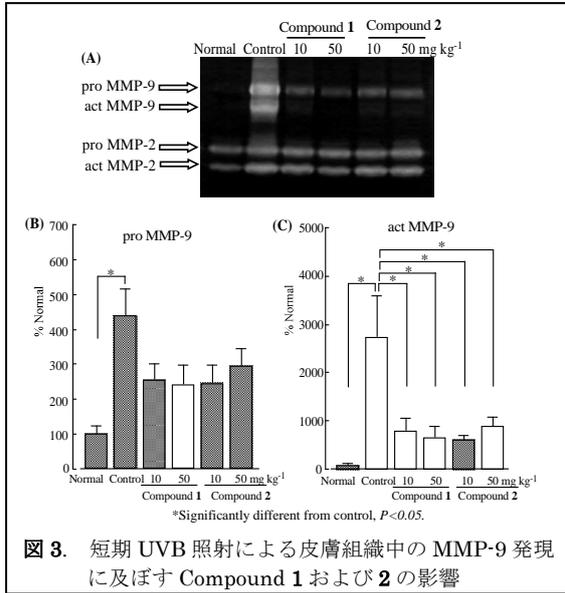


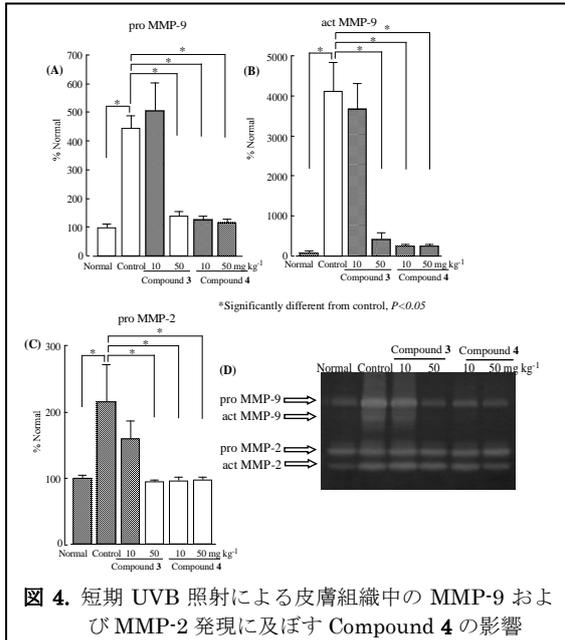
図 1. 黄芩から単離した 4 種類 Flavonoid の構造



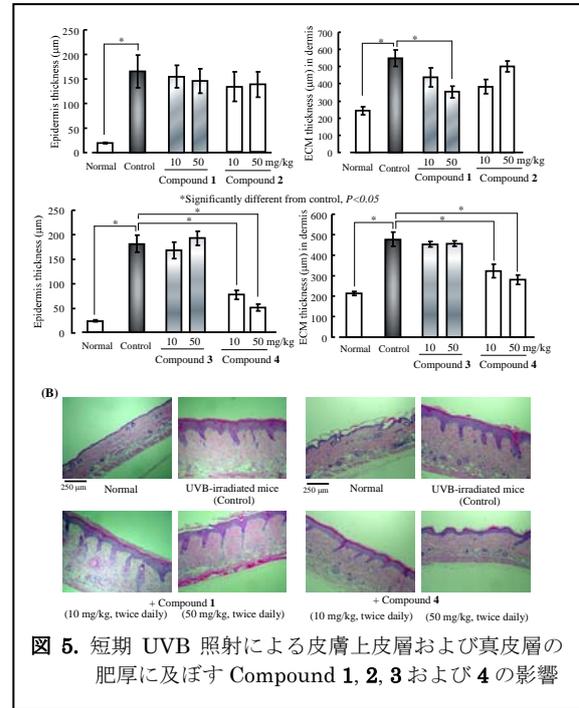
高用量 UVB 短期照射によって、皮膚中の MMP-2 および MMP-9 の発現が増加し、Compound 1 および 2 は MMP-9 の発現を抑制した(図 3)。



Compound 4 は MMP-9 および MMP-2(Pro 体)の発現を抑制した(図 4)。



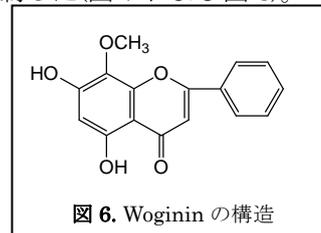
皮膚病理所見から、皮膚上皮層および真皮層の肥厚が短期 UVB 照射によって認められた。皮膚上皮層の肥厚は、Compound 4(10 および 50mg/kg)によって抑制され、真皮層の肥厚は Compound 1(50mg/kg)および 4(10 および 50mg/kg)によって抑制された(図 5)。



さらに、Compound 1 および 4 は、短期 UVB 照射による皮膚血管径の増大を抑制し、VEGF 産生も抑制した。これらの事実から、黄芩から単離した Compound 1 および 4 は短期 UVB による皮膚障害に対する防御作用は、MMP-9 および VEGF 発現の抑制を介していることを示唆した。

(2) 黄芩(*Scutellaria baicalensis* roots)中の主成分 Wogonin のリンパ管新生の抑制による抗腫瘍・抗転移効果：

UV 照射による発癌や癌増殖には、血管新生やリンパ管新生が深く関わっていることが指摘されている。黄芩中の主成分 Wogonin に短期 UVB 照射による皮膚炎症抑制作用を見出し、Cyclooxygenase-2 (COX-2)、Hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) および Nuclear factor kappa B (NF- κ B) 発現の抑制を介したものであることを明らかにした。本研究では、高転移骨肉腫瘍細胞 LM8 移植マウスを用いて、抗腫瘍・抗転移効果を検討した。その結果、Wogonin(図 6)は 25 および 50mg/kg の用量で抗腫瘍効果および肺や肝臓への転移を抑制した(図 7 および 図 8)。



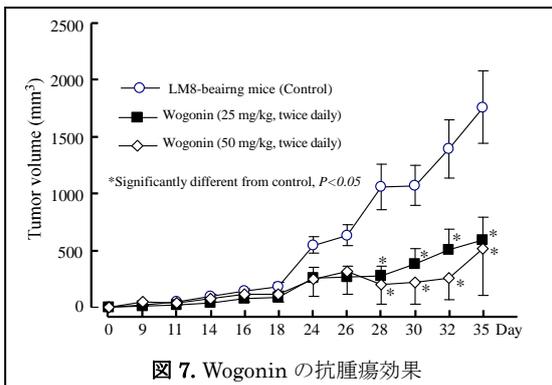


図 7. Wogonin の抗腫瘍効果

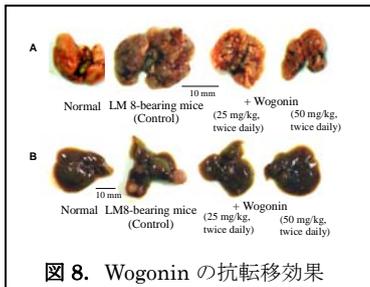


図 8. Wogonin の抗転移効果

腫瘍組織の免疫染色の結果、Wogonin は CD31(血管新生のマーカー)や LYVE-1(リンパ管新生のマーカー)の発現を抑制した(図 9)。

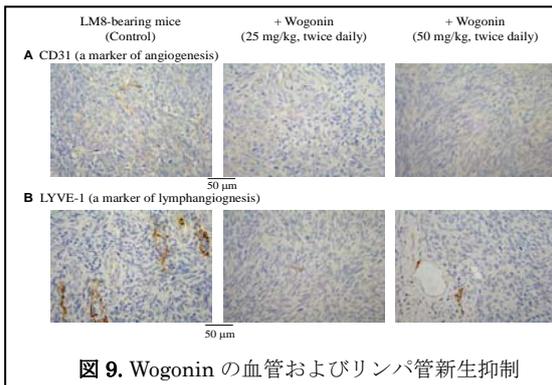


図 9. Wogonin の血管およびリンパ管新生抑制

Wogonin は腫瘍細胞 LM8 からの VEGF-C 産生に影響を与えなかった。Wogonin は、ヒトリンパ管内皮細胞に VEGF-C 作用後の VEGF Receptor-3 の発現に影響を与えず、VEGF Receptor-3 のリン酸化を 10, 50, 100 μM 濃度で抑制した(図 10)。

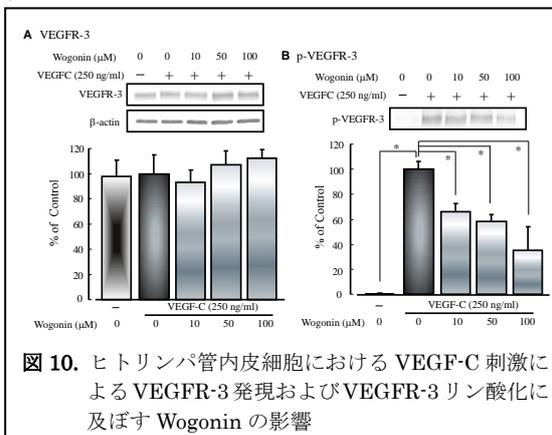


図 10. ヒトリンパ管内皮細胞における VEGF-C 刺激による VEGFR-3 発現および VEGFR-3 リン酸化に及ぼす Wogonin の影響

以上の実験結果から、Wogonin の抗腫瘍・抗転移効果は、リンパ管内皮から VEGF

Receptor-3 のリン酸化の抑制であることを明らかにした。

(3) UVA 照射下におけるセリ科植物由来の Coumarin 類の抗腫瘍効果(光化学療法化合物の探索)とその作用機構

① UVA 照射下での B16F10 melanoma 細胞に対する増殖抑制作用 (In Vitro) : 7 種類の Dihydrofurocoumarin、5,8 位に置換基を有する 6 種類の Linear 型 Furocoumarin、5 位に置換基を有する 4 種類の Linear 型 Furocoumarin、8 位に置換基を有する 4 種類の Linear 型 Furocoumarin および 2 種類の Angular 型 Furocoumarin (図 11-13) の UVA 照射下での B16F10 Melanoma の増殖能に対して、13 種類の Furocoumarin に 15 μM 以下で 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を示した (Table 1)。その 13 種類の中で、

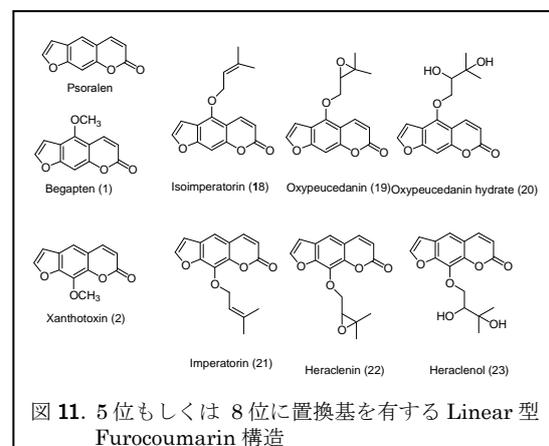


図 11. 5 位もしくは 8 位に置換基を有する Linear 型 Furocoumarin 構造

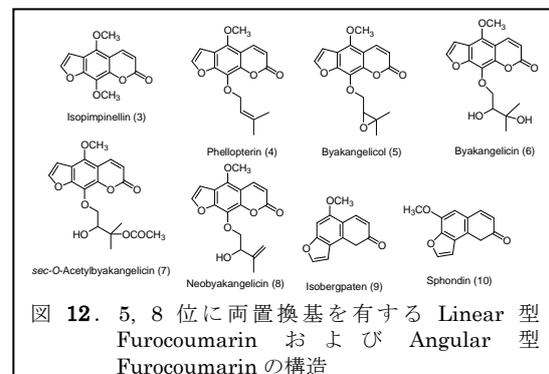


図 12. 5, 8 位に両置換基を有する Linear 型 Furocoumarin および Angular 型 Furocoumarin の構造

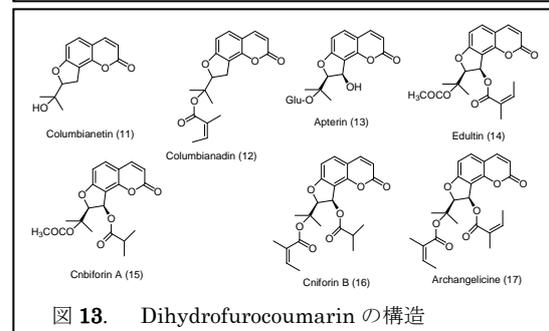


図 13. Dihydrofurocoumarin の構造

Bergapten (1), Xanthotoxin (2), Phellopterin (4), Isoimperatorin (18), Oxypeucedanin (19), Oxypeucedanin hydrate (20), Heraclenin (22) および Heraclenol (23) の 8 種類の Furocoumarin

が 1.0 μ M 以下で IC₅₀ を示した。

Table 1. The 50% inhibitory concentrations (IC₅₀) of various furocoumarins on cell proliferation under UVA irradiation in B16F10 melanoma cells

| Compounds | IC ₅₀ (μ M) | Compounds | IC ₅₀ (μ M) |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Psoralen | 0.11 | Columbianadin (12) | >50 |
| Bergapten (1) | 0.06 | Apterin (13) | >100 |
| Xanthotoxin (2) | 0.14 | Edultin (14) | 39.8 |
| Isopimpinellin (3) | >100 | Cniforin A (15) | 38.3 |
| Phellopterin (4) | 0.52 | Cniforin B (16) | >50 |
| Byakangelicol (5) | >100 | Archangelicin (17) | >50 |
| Byakangelicin (6) | 12.5 | Isoimperatorin (18) | 1.15 |
| sec-O-Axcetylbykangelicin (7) | >50 | Oxypeucedanin (19) | 0.22 |
| Neobyaknaglicin (8) | 11.3 | Oxypeucedanin hydrate (20) | 0.26 |
| Isobergpaten (9) | 8.63 | Imperatorin (21) | 9.84 |
| Sphondin (10) | 2.62 | Heraclenin (22) | 1.01 |
| Columbianetin (11) | >50 | Heraclenol (23) | 0.80 |

The IC₅₀ values are means for four experiments.

以上の実験事実に基づいて、B16F10 Melanoma 細胞の UVA 照射下での細胞周期を検討した。

② UVA 照射下での B16F10 Melanoma 細胞の細胞周期および制御タンパク質に及ぼす影響(*In Vitro*): Bergapten (50 nM), Xanthotoxin (50 nM), Phellopterin (0.5 μ M), Isoimperatorin (1 μ M), Oxypeucedanin hydrate (0.25 μ M), Heraclenol (0.5 μ M)は何れも、G1 期を減少させ、S 期および G2 期を増加させた(図 14, 図 15)。これらの事実は、上記の Linear 型 Furocoumarin は G2/M 期を制御していることを明らかにした。

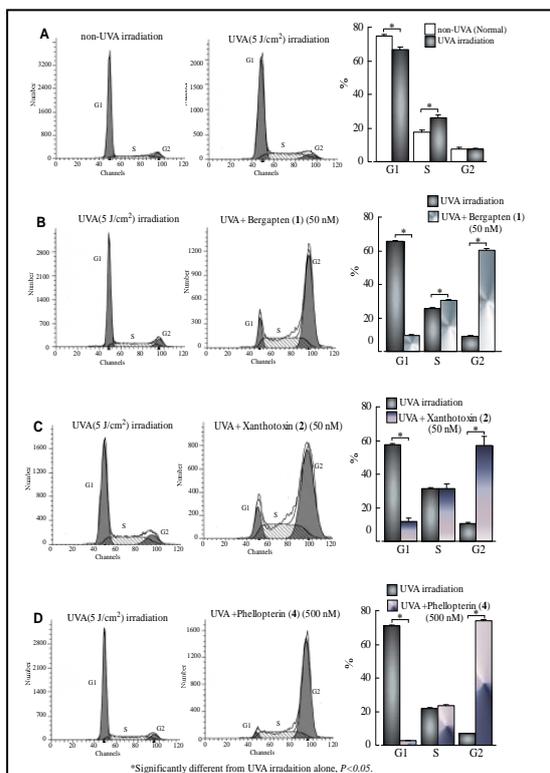


図 14. B16F10 Melanoma 細胞における UVA 照射下での細胞周期に及ぼす Bergapten, Xanthotoxin, Phellopterin の影響

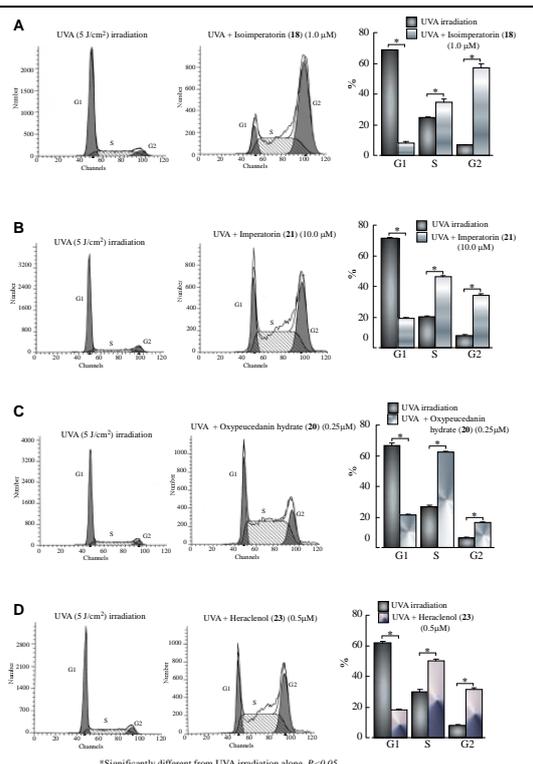


図 15. B16F10 Melanoma 細胞における UVA 照射下での細胞周期に及ぼす Isoimperatorin, Imperatorin, Oxypeucedanin hydrate, Heraclenol の影響

次に G2/M 期の制御タンパク質である Chk1 および cdc2 の発現、リン酸化を検討した。その結果、UVA 照射下で、上記の Furocoumarin 類は Chk1 のリン酸化体の増加し、cdc2 のリン酸化体を減少した(図 16)。

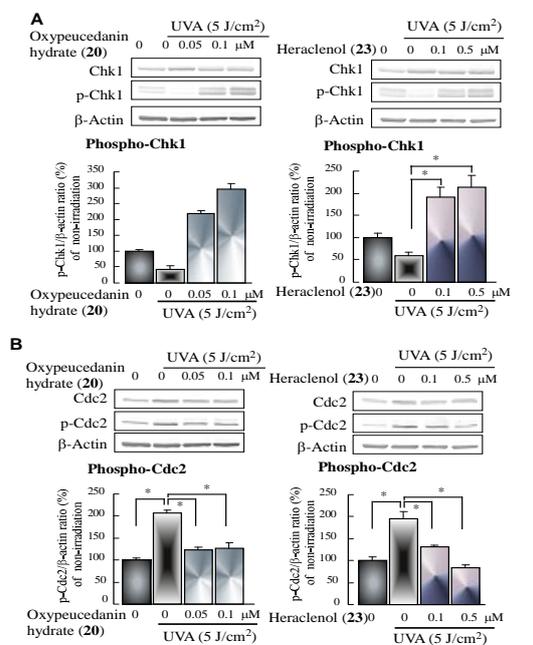


図 16. UVA 照射下での Chk1 および cdc2 発現リン酸化に及ぼす Oxypeucedanin hydrate, Heraclenol の影響

以上の *In vitro* 実験結果を踏まえて、腫瘍移植マウスを用いて抗腫瘍実験を行った。

③ B16F10 Melanoma 細胞移植マウス

スにおける UVA 照射下での Furocoumarin 類の抗腫瘍効果 : Bergapten, Xanthotoxin, Isoimperatorin, Imperatorin, Heraclenol, Oxypeucedanin hydrate の 5 位もしくは 8 位に置換基を有する Linear 型 Furocoumarin 類に強い抗腫瘍効果を認めた (図 17、図 18)。

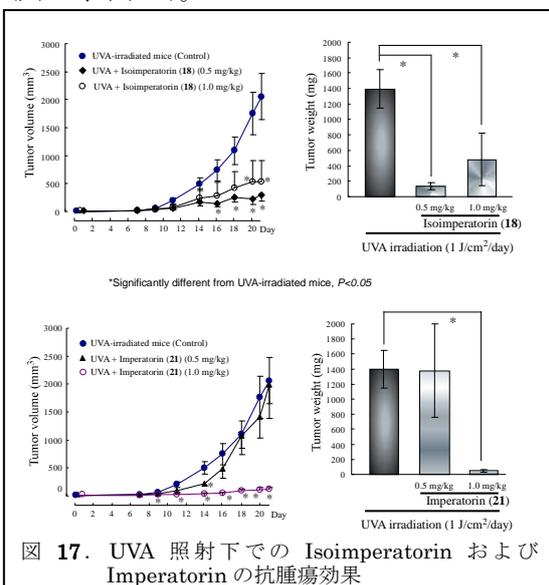


図 17. UVA 照射下での Isoimperatorin および Imperatorin の抗腫瘍効果

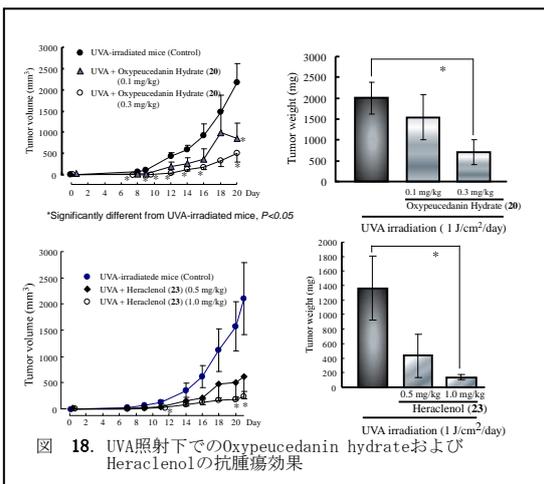


図 18. UVA照射下でのOxypeucedanin hydrateおよび Heraclenolの抗腫瘍効果

以上の実験結果から UVA 照射下で Melanoma 細胞に対して Linear 型 Furocoumarin 類に強い細胞増殖抑制作用および強い抗腫瘍効果を示した。その作用機構は、細胞周期制御タンパク質 Chk1 のリン酸化の増加および cdc2 のリン酸化体の減少による G2/M 期休止によることを明らかにした。

化学構造的には、Furocoumarin 骨格の 5 位もしくは 8 位に置換基を有する化合物に強い活性が認められ、5 位および 8 位の両方に置換基を有する化合物は活性が弱かった。

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 5 件)

- (1) Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M, Baba K, Kimura Y. Anti-tumor effects of various furocoumarins isolated from the

roots, seeds and fruits of *Angelica* and *Cnidium* species under ultraviolet A irradiation. *J. Nat. Med.* 68: 83-94 (2014). 査読有

- (2) Kimura Y, Sumiyoshi M, Sakanaka M, Taniguchi M, Baba K. *In vitro* and *in vivo* antiproliferative effect of a combination of ultraviolet-A and alkoxy furocoumarins isolated from Umbelliferae medicinal plants, in melanoma cells. *Photochem. Photobiol.* 89: 1216-1225 (2013). 査読有
- (3) Kimura Y, Sumiyoshi M. Anti-tumor and anti-metastatic action of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots through anti-lymphangiogenesis. *Phytomedicine* 20: 328-336 (2013). 査読有
- (4) Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of various flavonoids isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 63: 1613-1623 (2011). 査読有
- (5) Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of baicalein and wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis* roots on skin damage in acute UVB-irradiated hairless mice. *Eur. J. Pharmacol.* 661: 124-132 (2011). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- (1) 木村善行、住吉真帆、阪中雅広、谷口雅彦、馬場きみ江
紫外線 A 波(UVA)照射下におけるセリ科植物由来のクマリン類の抗腫瘍効果とその作用機構
日本生薬学会第 60 回年会 2013 年 9 月 8 日 北海道医療大学 (北海道、当別)
- (2) Kimura Y, Sumiyoshi M, Taniguchi M, Baba K. Photochemotherapy by ultraviolet A plus furocoumarins isolated from *Angelica* species in B16F10-bearing hairless mice. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2012 Sep.19, Sapporo.
- (3) 木村善行、住吉真帆
リンパ管新生を介した黄芩中の Wogonin の抗腫瘍・抗転移効果
日本生薬学会第 58 回年会 2011 年 9 月 25 日 昭和大学 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 善行 (Kimura, Yoshiyuki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号 : 20294796

(2) 研究分担者

研究者番号 :

(3) 連携研究者

住吉真帆 (Sumiyoshi, Maho)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 60444767