

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11863

研究課題名(和文)フラボノイドをベースにした抗がん作用をもつサプリメントの開発

研究課題名(英文)Development of Supplement having anti-cancer action based on Flavonoid

研究代表者

岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10311846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroではいくつかのフラボノイドには抗がん作用があることが報告されているが、がんの骨浸潤に重要な役割をする破骨細胞や骨芽細胞に関しては検討されていない。今回行った研究において、抗がん作用を持つだけでなく、破骨細胞形成にも関与するフラボノイドをその構造から6種類に分類し解析した。その結果、漢方薬の甘草に含まれるリクイリチゲニンが破骨細胞抑制効果を持ち、骨芽細胞分化への抑制はなく、さらに副作用も少ない構造を持つ薬物であることが明らかとされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方薬の甘草に含まれるリクイリチゲニンは破骨細胞抑制効果を持ち、骨芽細胞への抑制はない薬物であることが明らかとされた。破骨細胞形成を抑制した濃度は、構造の異なるフラボノイド、フィセチンと比較するとやや高い濃度であったが、骨芽細胞の形成を促進した初めてのフラボノイドであった。少しだけ構造の異なるフラボノイドにおいて、破骨細胞抑制効果がかなり違うことが明らかにされたことは、サプリメント開発において有意義なものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lots of researchers reported that some flavonoids have an anti-cancer effect in vitro. But any effects of osteoclast and osteoblast correlated bone invasion and metastasis of cancer cells remain to investigate. In this research, we classified flavonoid into six groups from its structure and analyzed the effect of each flavonoid in osteoclastogenesis. In result, Liquiritigenin, a component obtained from a Chinese herb, showed a significant inhibition effect during osteoclastogenesis. On the other hand, it did not inhibit osteoblast formation. Liquiritigenin is an aglycone of liquiritin, and it is one of the flavonoids present in Glycyrrhizae radix known as one of Kampo drug. Liquiritigenin has been shown to have various pharmacological effects, such as antioxidative, antitumor, and anti-inflammatory effects. Our data suggest that liquiritigenin may act as an inhibited supplement of osteoclasts in bone diseases such as osteoporosis.

研究分野：薬理学

キーワード：フラボノイド がん 骨疾患 破骨細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

フラボノイドは、ベンゼン環2個を3個の炭素原子でつないだ構造を有するフェニル化合物の総称で、抗菌作用や抗酸化作用だけでなく、抗炎症作用、発がん抑制作用、がん細胞の増殖抑制作用、血管新生阻害作用、抗変異原作用、がん予防作用など、がんに関する様々な作用が報告されている。がんの治療において原発巣を取り除くことは当然のことながら、その後の転移の有無、また骨への浸潤なども考慮し、治療および予後を注意深く見守らなければならない。その際には薬剤の役割が大きなウェイトを占めてくるものと考えられる。

ドイツの疫学調査によると、フラボノイドに属するアピゲニンとエピガロカテキンガレートとの併用により、大腸がんの切除を受けた患者の再発率が有意に低下している(World J Gastroenterol, 2008)。エピガロカテキンガレートはお茶に多く含まれるカテキンというフラボノイドの一種であるため、お茶を毎日飲むことが大腸がんの再発予防効果を期待できる可能性を示唆している。

一方、口腔内のがんに対するフラボノイドの研究も増えてきている。前述のエピガロカテキンガレートが口腔扁平上皮癌の細胞増殖を extracellular signal-related kinase (ERK)や p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)を抑えることで阻害することが報告されている(Cancer Letters, 2015)。しかしながら、*in vivo*での解析においては、口腔内のがんに対する研究は遅れているのが現状であった。口腔内のがんに関しては、頸部へのリンパ節転移だけでなく、顎骨との距離が近いこと、がんの顎骨への浸潤が避けられないことも多く、顎骨の切除は口腔機能の喪失へと直結する。そこで我々は、口腔がんの切除後に、再発予防や取り残したがんの抑制、あるいは顎骨の温存療法の治療薬としてフラボノイドを活用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

我々は以前より、抗酸化作用をもつ化合物の破骨細胞に対する影響を解析してきた。破骨細胞前駆細胞で発生する Reactive Oxygen Synthetase (ROS)を第2層抗酸化酵素である Heme Oxygenase-1 (HO-1)が ROS の産生を抑制すること、またこの酵素の発現を上昇させると破骨細胞形成を抑制することを明らかとしてきた。そこで、抗酸化作用をもつ化合物は破骨細胞を抑制するのではないかと仮説のもと、ポリフェノールを含む様々な天然物の破骨細胞形成および活性化の影響を調べ、イチゴ等に多く含まれているフィセチンを見つけ出した(Sakai et al., J Pharmacol Sci., 2013)。また、抗炎症薬という観点から選んできた漢方薬・甘草の主成分であるリクイリチゲニンにも破骨細胞形成抑制効果があることを報告した(Uchino et al., Phytother Res. 2015)。リクイリチゲニンは化学構造からフラバノン類に属している。このように、漢方薬に使用されている生薬にも多くのフラボノイドが含まれており、薬効との関連が研究されている。漢方薬の抗がん作用もフラボノイドの関与が大きいと考えられている。

各フラボノイドは、基本骨格に、C 環4位にカルボニル基が付加するかしないかと、各炭素原子に水酸基が付加するか、あるいはいくつ付加するかによっておおよそ決まる。そこで今回の研究においては、様々な種類のフラボノイドの抗がん作用を調べ、これを基にした抗がん作用およびがん切除後の予後薬の開発の基礎的研究にしたいと考えた。

3. 研究の方法

各フラボノイドの代表として、アピゲニン(フラボン類)、フィセチン(フラボノール類)、リクイリチゲニン(フラバノン類)、シアニジン(アントシアニン類)、を用いた。

#1 フラボノイドの骨関連細胞への影響の解析

生後4~8週のマウス(C57BL/6J)の大腿骨と腓骨から骨髓細胞を採取し、Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)と receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) ligand (RANKL)によって破骨細胞を誘導する。破骨細胞は Tartrate-positive acid phosphatase (TRAP)活性染色で確認す

る。この系にフラボノイドを作用させ、破骨細胞形成および活性化の影響を調べた。また同時に、骨芽細胞への影響も解析した。骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用い、アスコルビン酸と β グリセロホスフェートを添加し骨芽細胞へと分化させた。その際にリクイリチゲニンを様々な濃度で添加し、骨芽細胞分化の影響を解析した。

4. 研究成果

フラボノイドは、フラボン類、フラボノール類、イソフラボン類、フラバノン類、フラバノール類、アントシアニン類、の6種類に分類される。それぞれの代表として、アピゲニン、フィセチン、ダイゼイン、リクイリチゲニン、カテキン、シアニジン、を用いた。細胞は、破骨細胞前駆細胞株 RAW-D (RAW264.7 細胞の破骨細胞高分化型細胞株)とマウス初代培養細胞を用いて、破骨細胞形成および活性化におよぼす影響を調べた。すでに解析の行われている、イソフラボン類のフィセチンでは、1~20 μ M の濃度で、濃度依存的に破骨細胞形成の抑制が認められた。しかしながら、20 μ M では細胞毒性も生じ、細胞数の低下を認めていた。そこで、本実験系では、初めに1~10 μ M の濃度での解析を行った。

(1) アピゲニン(フラボン類)

フラボン類のアピゲニンを1~10 μ M の濃度で作用させた。アピゲニンは1~10 μ M の濃度の濃度では破骨細胞形成抑制効果を示さなかった。そこで、同じくフラボン類のクリシンを同濃度で作用させた。しかしながら、多核破骨細胞形成抑制ではなく、細胞数が増加する結果となった。

(2) シアニジン(アントシアニン類)

次に、アントシアニン類のシアニジンを同濃度で作用させたところ、濃度依存的に多核破骨細胞数に減少傾向が認められた。そこで、さらに濃度を上げて解析を行ったところ、50-100 μ M の濃度で、多核破骨細胞抑制効果が認められた。

(3) リクイリチゲニン(フラバノン類)

次に、以前行ったフラバノン類のリクイリチゲニンを再度1~10 μ M の濃度で作用させた。他の2つのフラボノイドと比較して、明らかに有意に多核破骨細胞数の減少が認められた。

以前の結果では、マウス大腿骨、腓骨から採取した骨髄細胞においては、10 μ M までは多核破骨細胞数の減少傾向は認めるものの、その抑制効果は弱かった。しかしながら、100 μ M ではほとんど多核の破骨細胞は認められなかった。そこで、再度破骨細胞前駆細胞株 RAW-D 細胞で調べたところ、骨髄細胞より強く、50, 100 μ M では全く旗骨破骨細胞の形成は認められなかった。

これらの結果は、培養細胞と初代培養細胞との違いによるものだと考えられた。

次に、マウス骨髄細胞における細胞毒性を調べたところ、100 μ M 濃度のリクイリチゲニンでも毒性は認められなかった。

(4) 結論

今回の申請では、骨粗鬆症や口腔内がんにおける予防および治療後のサプリメントの開発のための基礎的研究として、6種類のフラボノイドの破骨細胞における影響を検討した。イソフラボン類のダイゼインとフラバノール類のカテキンの破骨細胞形成に対する影響はすでに報告されており、比較的高濃度においても多核破骨細胞形成の抑制効果は少ないようである。今回の申請において行った、アピゲニン(フラボン類)とシアニジン(アントシアニン類)に関しても、やや減少傾向を認めるものの、明確な有意差は認められなかった。以前行ったフィセチンとリクイリチゲニンに関して

は破骨細胞前駆培養細胞株、初代培養細胞において破骨細胞抑制能を認めた。しかしながら、細胞毒性と骨芽細胞(リクイリチゲニンは骨芽細胞分化促進)への作用を考えると、フィセチンより、リクイリチゲニンをベースにした構造の探究が必要であると考えられる。また、リクイリチゲニンには、光学異性体があるので、この解析も重要であるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

- ① Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S, Asaumi J, Calderwood SK., Okamoto K, Kozaki K: Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab. *Oral Oncology*. 86, 251-257, 2018. doi:org/10.1016/j.oraloncology. 2018.09.30. 査読有
- ② Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S, Asaumi J, Okamoto K, Calderwood SK, Kozaki KI: Anti-EGFR antibody cetuximab is secreted by oral squamous cell carcinoma and alters EGF-driven mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*. 503(3), 1267-1272, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.035. 査読有
- ③ Ono K, Eguchi T, Sogawa C, Calderwood SK, Futagawa J, Kasai T, Seno M, Okamoto K, Sasaki A, Kozaki KI: HSP-enriched properties of extracellular vesicles involve survival of metastatic oral cancer cells. *J Cell Biochem*. 119(9), 7350-7362, 2018, doi: 10.1002/jcb.27039. 査読有
- ④ Sakai E, Morita M, Ohuchi M, Kido MA, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Itoh K, Yamamoto M, Tsukuba T: Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 during osteoclastogenesis. *FASEB J*. 31(9), 4011-4022, 2017. doi: 10.1096/fj.201700177R. 査読有
- ⑤ Sakai E, Aoki Y, Yoshimatsu M, Nishishita K, Iwatake M, Fukuma Y, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T: Sanguin H-6, a constituent of *Rubus parvifolius* L., inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and prevents tumor necrosis factor- α -induced osteoclast formation in vivo. *Phytomedicine*. 23(8), 828-37, 2016. doi: 10.1016/j.phymed.2016.04.002. 査読有

[学会発表](計 20 件)

- ① 板垣まみ, 十川千春, 他 急速転移性癌細胞株由来細胞外小胞による破骨細胞分化および癌細胞浸潤の制御 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 2018 年
- ② 奥舎有加, 他 破骨細胞分化を負に制御する Rab タンパク質の同定(Rab11a negatively regulates osteoclast differentiation) 第 60 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡, 2018.
- ③ 坂井詠子, 他 Keap1 遺伝子欠損は Nrf2 の活性化を介して破骨細胞分化を抑制する Kelch-like ECH-associated protein 1 gene deletion inhibits osteoclast differentiation by Nrf2 activation 第 40 回日本分子生物学会年会/第 90 回日本生化学会大会, 神戸, 2017.
- ④ 岡元邦彰, 他 コバルトプロトポルフィリンの破骨細胞分化および活性化に対する影響 メタルバイオサイエンス研究会, 岡山, 2017.
- ⑤ 坂井詠子, 他 ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現抑制はカスパーゼ 3 の活性化、HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化に必要である 第 59 回歯科基礎医学会, 松本, 2017.
- ⑥ 坂井詠子, 他 *tert*-Butylhydroquinone による Irf8 と MafB の発現増加を介した破骨細胞分化抑制機構 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016.
- ⑦ 岡元邦彰, 他 骨芽細胞分化における転写因子 TFEB の関与 第 58 回日本歯科基礎医学会, 札幌, 2016

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:筑波 隆幸

ローマ字氏名: Takayuki Tsukuba
所属研究機関名: 長崎大学
部局名: 医歯薬学総合研究科(歯学系)
職名: 教授
研究者番号(8桁): 30264055

研究分担者氏名: 十川 千春
ローマ字氏名: Chiharu Sogawa
所属研究機関名: 岡山大学
部局名: 医歯薬学総合研究科
職名: 准教授
研究者番号(8桁): 10253022

研究分担者氏名: 江口 傑徳
ローマ字氏名: Takanori Eguchi
所属研究機関名: 岡山大学
部局名: 医歯薬学総合研究科
職名: 助教
研究者番号(8桁): 20457229

研究分担者氏名: 奥舎 有加
ローマ字氏名: Yuka Okusha
所属研究機関名: 岡山大学
部局名: 医歯薬学総合研究科
職名: 助教
研究者番号(8桁): 50762027

研究分担者氏名: 坂井 詠子
ローマ字氏名: Eiko Sakai
所属研究機関名: 長崎大学
部局名: 医歯薬学総合研究科(歯学系)
職名: 助教
研究者番号(8桁): 10176612

研究分担者氏名: 西下 一久
ローマ字氏名: Kazuhisa Nishishita
所属研究機関名: 長崎大学
部局名: 医歯薬学総合研究科(歯学系)
職名: 助教
研究者番号(8桁): 20237697

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。