

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350979

研究課題名(和文)レスベラトロールのアザ誘導体化合物による細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of anti-proliferative effect of resveratrol derivatives on cancer cells

## 研究代表者

藤田 至彦 (FUJITA, Yoshihiko)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：80192730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：赤ブドウの果皮などの食品に含まれるレスベラトロール誘導体(RVD)の腫瘍細胞に対する増殖抑制作用の機序を、分子生物学的手法を用いて解析した。その結果、一般に活性酸素濃度が亢進しているとされるがん細胞ではMIFという炎症性サイトカインの1つであるタンパク質が、転写因子であるNFκBに直接働きかけ、その下流にあるJNKというアポトーシス誘導シグナル因子を抑制する。MIFはRVDと結合することにより、NFκBを経て、JNKの抑制ができなくなり、細胞にアポトーシスをもたらすことがわかった。したがって、RVDは、MIFを標的としたがん治療薬のリード化合物となる可能性が示唆された。

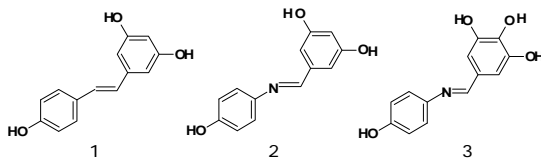
研究成果の概要(英文)：Derivatives of resveratrol (RVD) that is included in several foods such as grape skin exert anti-proliferative effect on cancer-derived cells. The mode of action regarding to this effect was investigated using molecular biological methods. We found that one inflammatory cytokine called "MIF" interacts with a transcription factor "NFκB", which down-regulates "JNK", an apoptosis-inducible signal molecule, thereby avoiding apoptosis induced by reactive oxygen species (ROS). RVDs can prevent MIF from performing this cell protecting effect by direct binding to MIF, resulting in apoptosis. Therefore, RVDs could be promising lead compounds for the development of a therapeutic agents to fight against cancer.

研究分野：総合生物

キーワード：レスベラトロール MIF

1. 研究開始当初の背景

レスベラトロール(RV)(1)は天然に豊富に存在するポリフェノールの1つであり、その大きな還元力により酸素から生成するスーパーオキシドのもつプロオキシダント効果が、がん細胞に対する細胞毒性をもたらすことが示唆されている。以前、RVよりも低い有効濃度で種々のがん細胞株に対して増殖抑制を示す化合物をスクリーニングした結果、乳がん由来の MCF-7、メラノーマ由来の A375 各細胞株に対し、RV の 2 種のアザ誘導体 2 および 3 が高い増殖抑制効果を示した。MCF-7 細胞の増殖抑制における IC<sub>50</sub> 値は RV(1)で 100 μM 以上であるのに対し、2 で 28 μM、3 で 6.4 μM であった。さらに、標的タンパクを単離・同定したところ、マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) であることが確認された。MIF は炎症や自己免疫疾患に関与する多面的なサイトカインであると同時に、腫瘍細胞の増殖因子としても働くことがわかっている。面白いことに化合物 2 および 3 は MIF との結合能を有するのに対し、親化合物である 1 はまったく結合能を示さない。したがって、2、3 が示す高い増殖抑制効果の一つの要因として、これらアザ誘導体が MIF に結合し、MIF の増殖因子としての活性を阻害することが考えられる。

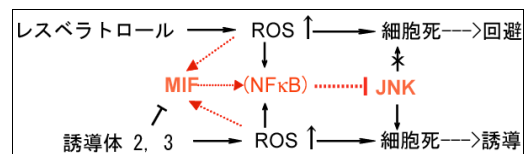


これらのアザ誘導体もつ増殖抑制効果 (細胞毒性) の分子機構について、上述のがん細胞株に対しては濃度依存的に活性酸素種 (ROS) の増加を促すが、皮膚繊維芽細胞、乳腺細胞など正常細胞においてはこの濃度範囲で ROS の増加、細胞増殖抑制を惹起しない。

2. 研究の目的

アザレスベラトロール誘導体 (ARVD) によ

る細胞毒性の発現と MIF との関連の未解明な部分について基礎研究を完成し、がんの新しい治療薬の臨床応用へと展開することを目的とした。がん細胞は正常細胞に比べて ROS レベルが高いとされているが、ROS は、自らが引き起こす DNA 損傷などを原因とするアポトーシスを回避するべく、いくつかの抗アポトーシス因子を活性化している。その代表的な因子として挙げられる NFκB は、ストレス応答 MAPK 経路と呼ばれるアポトーシス誘導性の c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) および p38(MAPK)を抑制する。MIF も同様に JNK の不活性化を促すことにより、いくつかのがん細胞株でアポトーシスを回避させる機能をもつことが複数報告されている。以上の点を基に次の図式のような仮説をたてた。



本研究では MIF による ROS からの細胞保護作用 (アポトーシス回避機構) の評価を行うと同時に、以下の実験をとおして、上の仮説 (点線の部分) が妥当であるか検討した。

MIF による JNK の不活性化ががん細胞株で実際に起こるかを確認する。

MIF による JNK の不活性化が NFκB を介する経路か、独自の経路なのかを明らかにする。

ROS が直接 MIF を活性化する可能性を検討する。

新たな化合物のデザイン・合成・スクリーニングを行う。

3. 研究の方法

a. MIF による ROS からの細胞保護作用 (アポトーシス回避機構) の評価

ここでは RV やそのアザ誘導体が生成させる細胞内 ROS に対する MIF のアポトーシス回避効果の濃度・時間依存性を、3 つのアッセ

イ系、すなわち i. MIF のノックダウン誘導が可能なベクターを導入した細胞株、ii. 細胞増殖に影響しない MIF の阻害剤 ( Iso-1 など ) の共存下における細胞株、iii. MIF の機能部位と考えられている Cys<sup>57</sup> - Ala<sup>58</sup> - Leu<sup>59</sup> - Cys<sup>60</sup> の Cys<sup>57</sup> または / および Cys<sup>60</sup> を Ser に変えた変異 MIF を導入した細胞株を用い RV やアザ誘導体の増殖抑制効果を調べ、それぞれの細胞生存率より、生成した細胞内 ROS に対して MIF がどれくらい細胞保護作用を有しているのか評価した ( 細胞内 ROS の増加は ROS 検出蛍光プローブ DCFH-DA を用いた ) 。

#### b. MIF による JNK の不活性化の評価

上記 i ~ iii から適当な系をえらび、RV や ARVD 添加後に JNK およびその下流にある c-Jun のリン酸化をウェスタンブロッティングで解析した。

#### c. MIF による JNK の不活性化の経路についての検討

上記の適当な系について、RV や ARVD 添加後に NF k B の DNA 結合能をゲルシフトアッセイで評価し、MIF 発現の有無により、NF k B の活性がどのように変化するか調べた。

#### d. ROS が MIF を up-regulate する可能性の検討

MCF7 細胞に RV や ARVD を添加したのち、培地中への MIF の分泌量を Elisa で、MIF の mRNA の変化をリアルタイム PCR で測定した。

#### e. MIF とのドッキングによる新規化合物の創製および細胞毒性の評価

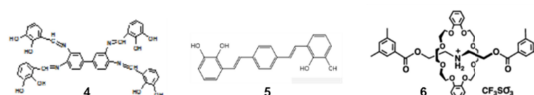
MIF との in silico ドッキングにより新規化合物をデザイン・合成し、がん細胞特異性および細胞毒性を評価した。

### 4. 研究成果

MCF7 および A549 の 2 細胞株に MIF の shRNA の発現誘導ベクターを導入したところ、( MIF のノックダウンによる ) ARVD 感受性の亢進が本来非感受性である A549 細胞で見られたことから、MIF は ARVD の活性酸素による細胞毒性から細胞を保護する作用をもつという仮説が裏

付けられた。また、親株の A549 と比べて、MIF をノックダウンした場合や MIF の阻害剤 ( Iso-1 ) を用いた場合の方が、アポトーシス誘導キナーゼ ( JNK ) のリン酸化の亢進が顕著に認められた。このことから、MIF は本来、NF k B を活性化し、さらに下流に存在する JNK の活性 ( リン酸化 ) を抑制することによりアポトーシスを回避する機構が示唆された。さらに、ARVD 添加後に NF k B と特異的配列 DNA ( 5' - AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC - 3' ) との結合能のゲルシフトアッセイによる評価を行ったところ、親株の A549 細胞では NF k B と特異的 DNA との間にみられた顕著な結合能が、MIF のノックダウン株では認められなかったことから、MIF は本来 NF k B のアポトーシス抑制作用を直接制御しており、添加された ARVD との結合が起ると MIF の NF k B との相互作用が抑制され、細胞がアポトーシスへと傾くことがわかった。Elisa による培地中への MIF の分泌については変化が認められず、ARVD より生じる ROS が MIF を up-regulate する可能性は否定された。また MIF の変異体 ( Cys57Ser, Cys60Ser ) の解析により、どちらの変異体についても ARVD により生成した ROS に対する細胞保護作用が大きく損なわれたので、これらのシステインは MIF の活性化に重要な残基であることが示唆された。

いくつかデザイン・合成した新規化合物の中から、特に増殖抑制能のみられる 4 ~ 6 について解析を試みた。複雑な ARVD である 4 は、種々のがん由来の細胞に対して低濃度で細胞毒性を示す ( IC<sub>50</sub> < 1 μM )。またポリフェノール誘導体 5 はメラノーマ細胞特異的に細胞毒性を示す。現在、これらの作用機序を MIF との関わりも含めて詳細に検討中である。



ポリフェノールではないが、ロタキサン化合物 6 も当初 MIF を標的とした化合物として

候補に挙がった。その後の解析で、MIF を標的とせず、細胞周期調節因子を阻害することにより種々のがん細胞に対して細胞毒性を有することが明らかとなった。

ARVD の ROS 産生の誘導効果を種々の細胞で調べるうちに、メラノーマ細胞では株によって活性酸素量が異なり、予想に反して ROS の生成量と細胞の増殖が正の相関を示すことがわかった。さらに詳細な検討の結果、ヘムタンパクの 1 つであるサイトグロビン (CYGB) が細胞内 ROS の生成に関わっており、必ずしも ARVD には依存しないことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 1 件)

Fujita Y, Kimura M, Sato H, Takata T, Ono N, Nishio K.

Characterization of the cytotoxic activity of [2]rotaxane (TR0-A0001), a novel supramolecular compound, in cancer cells.

Arch Pharm Res. 2016 査読あり in press. DOI 10.1007/s12272-016-0741-9

Shiotani A, Fujita Y, Nishio K.

Low-Dose Aspirin-Associated Upper and Mid Gastrointestinal Tract Damage and Gene Polymorphism.

Curr Pharm Des. 2015;21:5066-72. 査読あり DOI: 10.2174/1381612821666150915105537

Terashima M, Fujita Y, Togashi Y, Sakai K, De Velasco MA, Tomida S, Nishio K.

KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase  $\alpha$ -subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival.

Oncotarget. 2014 Aug 30;5:7040-50. 査読あり DOI: 10.18632/oncotarget.2220

Fujita Y, Koinuma S, De Velasco MA, Bolz J, Togashi Y, Terashima M, Hayashi H, Matsuo T, Nishio K.

Melanoma transition is frequently accompanied by a loss of cytoglobin expression in melanocytes: a novel expression site of cytoglobin.

PLoS One. 2014 Apr 10;9:e94772. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0094772. eCollection 2014.

[学会発表] (計 6 件)

Yoshihiko Fujita

Exploratory analysis of predictive biomarkers of oxaliplatin versus irinotecan in combination with bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer in WJOG4407G study

第 4 0 回欧州がん治療学会 ( E S M O ) 2015 年 9 月 2 5 ~ 2 9 日 ウィーン

Yoshihiko Fujita

Melanoma transition is frequently accompanied by a loss of cytoglobin, a putative tumor suppressor, in melanocytes  
106th AACR Annual Meeting (全米癌研究学会) 2015 年 4 月 18 日 ~ 22 日、Philadelphia

藤田 至彦

メラノサイトからメラノーマへの移行は、しばしばがん抑制因子であるサイトグロビンの発現低下を伴う

第 7 3 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 ~ 27 日 パシフィコ横浜 (横浜市)

藤田 至彦

マイクロアレイをもちいた原発不明がんの診断バイオマーカーの探索

第 1 8 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2014 年 6 月 25 ~ 27 日

仙台市情報・産業プラザ (仙台市)

Yoshihiko Fujita

A microarray-based gene expression analysis identified diagnostic biomarkers for unknown primary cancer

105th AACR Annual Meeting (全米癌研究学会) 2014 年 4 月 5 日 ~ 9 日、サンディエゴ

Yoshihiko Fujita

A Microarray-Based Gene Expression  
Analysis Identified Diagnostic Biomarkers  
for Unknown Primary Cancer

第38回欧州がん治療学会 (ESMO) 2013  
年9月27日～10月1日 アムステルダ  
ム

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/genom/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 至彦 (FUJITA, Yoshihiko)

近畿大学・医学部・医学部講師

研究者番号：80192730

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大川原 正 (OKAWARA, Tadashi)

熊本科学保健大学・保健科学部・教授

研究者番号：60040325