

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21366

研究課題名(和文) 癌領域における漢方薬の新たな可能性を探して：作用機序解明と癌治療への早期応用戦略

研究課題名(英文) Looking for new possibilities of kampo medicine in cancer treatment: Elucidation of action mechanism and early application strategy for cancer treatment

研究代表者

玉田 真由美 (Tamada, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：80528133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌治療における漢方薬の有用性は、化学療法に伴う副作用対策や緩和ケア領域のみならず、癌転移抑制・再発抑制作用など数多く報告されてきた。しかしその使用が経験則や古典の記載を基とし、作用機序が明らかでないことが障害となり、敬遠されることも否めない。作用機序が判明すれば、癌治療領域においても、有効な治療手段の1つとなると考え、当研究室で構築した既存薬ライブラリーの中の漢方薬成分を使用し、これまでおこなってきた研究を基に、癌特有の糖代謝から正常細胞が主として使用するミトコンドリア呼吸へ代謝変動を誘導するもの、および転移の原因でもある上皮間葉転換を抑制するものを選別し、その分子機構の解明をすすめている。

研究成果の概要(英文)：The usefulness of Kampo medicine in the treatment of cancer has been reported not only as a countermeasure against side effects accompanying chemotherapy and palliative care but also on inhibition of cancer metastasis and inhibition of recurrence. However, the reason why use of kampo medicine tends to be avoided is that its use is mainly based on empirical rules and classic descriptions and that its mechanism is unclear. We believe that if the mechanism is clear, it will be an effective means of treatment in the area of cancer treatment. Using the Kampo ingredients in our existing drug library built in our laboratory, we first selected ones that induce metabolic shift from cancer specific glucose metabolism to mitochondrial respiration mainly used by normal cells. Next we selected ones that suppress epithelial mesenchymal transition, which causes to cancer metastasis. Based on these data, We are trying to elucidate these detailed mechanism.

研究分野：漢方、癌

キーワード：漢方薬 癌糖代謝 代謝変動 上皮間葉転換

## 1. 研究開始当初の背景

癌領域における漢方薬の有用性は、化学療法に伴う副作用対策や緩和ケア領域で数多く報告されてきた。しかし、その処方、古典の記載、経験則を基としたものが多く、有用性を認めていても、作用機序が明らかでないことが障壁となり使用を敬遠される場合があることも否めない。

近年、六君子湯のグレリン分泌促進による癌関連食思不振症候群に対する効果、半夏瀉心湯のβグルクロニダーゼ阻害活性によるイリノテカンによる遅発性下痢発症予防に対する効果など、有用性のみならず作用機序も報告されるようになり、我々も、補中益気湯が、腫瘍周囲に存在するマクロファージの炎症誘発性サイトカイン産生を抑制することにより、悪液質の発生を抑制しうることを報告した(Yae *et al.*, Evid Based Complement Alternat Med 2012)。作用機序が判明した薬剤に関しては、専門医に限らず広く認知・処方されていることから、漢方薬の作用機序解明が早急に望まれているといえる。癌周辺症状への有用性だけでなく、動物実験では、癌転移抑制など直接的な抗癌作用についても報告されており、作用機序が判明すれば、癌治療の領域においても、漢方薬が有効な治療手段の1つとなる可能性を秘めていると考えられる。

そこで、これまで行ってきた研究の中から、癌特有の代謝である好気性解糖(Warburg effect)、および、癌の転移にかかわる上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition: EMT)に着目して、漢方薬の効能を探索することとした。

### (1) 癌特有の代謝である好気性解糖(Warburg effect)との関連性

癌細胞の多くは、酸素の有無に関係なくエネルギー産生に解糖系を主に使用する。この代謝は好気性解糖(Warburg effect)とよばれ、正常とは異なる癌特有の代謝として注目さ

れている。糖取り込み・解糖系亢進により、癌は素早くエネルギーを産生し、その中間代謝物を原料として増殖のために必要な要素を十分得ることができる。また、ミトコンドリア呼吸を抑え、解糖系を主として使用することは、ミトコンドリア呼吸で発生する活性酸素(ROS)の産生を抑制できるほか、解糖系の側副路であり、NADPH産生経路でもあるペントースリン酸経路使用の亢進による還元型グルタチオン産生にもつながり、活性酸素発生を抑制することができる。活性酸素の発生を抑制することは、癌にとって増殖に有利であるだけでなく、治療抵抗性や転移にも影響を与えていることが報告されている。実際に我々は、解糖系亢進により治療抵抗性を獲得した癌細胞において、代謝変動の誘導が抗癌剤感受性を増強させることを確認しており(Tamada *et al.*, Cancer Res 2012, Tamada *et al.*, Clin Cancer Res 2012)、癌特有の代謝である解糖系亢進を抑制し、ミトコンドリア呼吸へ変動させ、正常の代謝へ近づけるアプローチは、少ない副作用での腫瘍増殖抑制効果、治療抵抗性解除、転移抑制効果を期待できると考えている。

### (2) 転移の原因でもある上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition: EMT)との関連性

国内外でのこれまでの研究により、癌の浸潤は、腫瘍細胞の細胞・細胞間接着の喪失が開始起点となることが報告されてきた。細胞・細胞間接着が失われた癌細胞は、上皮としての特性を失うが、上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition: EMT)という現象が誘発され、間葉系細胞としての特徴を得ることで、細胞外マトリックスとの相互作用が増し、周囲組織へスムーズに移動できるようになる。EMTは創傷治癒や胎児の発生などにおいても重要な機構であるが、臓器の線維化や癌の浸潤・転移にも関わることが明らかになってきており注目されている。

EMT 誘発の原因やシグナルは依然として明らかになっていない部分も多いが、我々はこれまでの研究により、上皮性を保つ細胞に炎症性サイトカインを投与することで、EMT 様変化を呈することを報告し (Takahashi *et al.*, J Biol Chem. 2010)、その現象を基に EMT 評価アッセイを構築した。EMT 阻害により細胞の上皮性を維持させることは、癌浸潤・転移抑制に繋がると考えられ、EMT を阻害する薬剤探索も開始した。

長い歴史があり、既に安全性が確立され、副作用も把握できている漢方薬から、代謝変動作用や EMT 阻害効果をもつものを見出すことができれば、新規開発薬剤よりスムーズに臨床応用に結びつく可能性がある。また、作用機序が判明することで、漢方薬の使用や適応範囲が広がる可能性が高く、本研究が重要な研究であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は当研究室で構築した既存薬ライブラリーのうち、漢方薬成分を使用し、(1) 解糖系からミトコンドリア呼吸 (癌特有の代謝から正常に近い代謝) へ代謝変動させるもの、(2) 上皮間葉転換 (EMT) を阻害するものを選別する。(1) については、代謝変動を引き起こすメカニズムとして、これまで我々が研究してきた、解糖系の酵素の一つである pyruvate kinase M2 (PKM2) の発現・酵素活性との関連性、またこれまでに報告されている分子 (LDH, PDK など) との関連性を調べることで、作用機序の解明につなげる。(2) についても、炎症性サイトカインや、これまで当研究室で研究してきた、CD44 をはじめとする EMT に影響を与える分子との相互作用などを調べることで作用機序の解明につなげる。さらに実験が進めば、(3) アフィニティーナビーズによる応答分子検索を行い、応答分子の特定、その上・下流シグナルとの関連性を追及することで、作用機序をより明確にし、癌治療への早期応用を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究は、当研究室で構築した既存薬ライブラリーのうち、128 種の漢方薬成分を用いて以下の実験を行う。糖代謝に関する実験はエネルギー産生を主に解糖系に依存している p53 欠損ヒト大腸癌細胞 (HCT116 p53 knockout) を用い、EMT に関する実験に関しては、長期の培養においても上皮性が維持されている正常網膜色素上皮細胞を用いた。なお、漢方薬成分に関しては、薬剤名を伏せ、番号表記とすることで、臨床でどのような疾患に使われているといった情報が入らない状態での実験を行った。

プレ実験として、薬剤添加の有無による細胞数の測定により、細胞毒性の評価を行い、細胞毒性のない薬剤濃度を確認したのち、以下の実験を行った。

### (1) 解糖系からミトコンドリア呼吸へ代謝変動を起こす薬剤のスクリーニング 糖消費量の測定

我々はこれまでに、解糖系からミトコンドリア呼吸へ代謝変動させることにより、間接的に Glucose transporter1 (GLUT1) の発現低下・糖取り込み減少、糖消費抑制が誘導されることを報告している (Tamada *et al.*, Cancer Research 2012)。言い換えれば、糖消費抑制および糖取り込み抑制を示すものの中にはミトコンドリアへの代謝変動が原因となるものが含まれる可能性があることから、糖消費を抑制する薬剤を選別する。(1 次スクリーニング)

#### 乳酸産生量の測定

解糖系亢進状態が抑制されるとその最終産物である乳酸産生量も減少する。で選別された薬剤を添加した状態での乳酸産生量を測定し、乳酸産生を抑制する薬剤を選別する。(2 次スクリーニング)

#### オリゴマイシン (ミトコンドリア ATP 合成阻害薬) 感受性試験

解糖系が亢進した癌細胞ではミトコンド

リア ATP 合成阻害薬であるオリゴマイシン感受性が低い。しかし、ミトコンドリア呼吸への代謝変動を誘導するとオリゴマイシン感受性が亢進し、増殖抑制を起こすことを我々はすでに確認している (Tamada *et al.*, Cancer Research 2012)。 で選別された薬剤を使用し、オリゴマイシン感受性亢進を誘導するか否かを、マルチウェルタイムラプス顕微鏡を用いた細胞増殖試験で確認する。(3 次スクリーニング)

#### 解糖系亢進に影響を与えている分子との関連性評価

解糖系酵素の 1 つである pyruvate kinase M2 (PKM2) 酵素活性は、チロシンリン酸化を受け、酵素活性が低いである場合は、解糖系を促進させ、チロシンリン酸化が外れ、酵素活性が高い状態では、ミトコンドリア呼吸を促進させることが報告されている。LDH は pyruvate kinase から乳酸産生 (解糖系側) を促進させ、PDK は pyruvate kinase から acetyl CoA の産生 (ミトコンドリア呼吸側) を促進させる。上記スクリーニングで選別された薬剤のうち、これらの分子に影響を与えるものがないかを調べるため、ウエスタンブロット法を用いた PKM2 チロシンリン酸化 (Tyr105) レベルの評価、LDH 発現、PDK 発現の評価を行い、作用機序判明につながるものがないか調べていく。

#### (2) 上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) 阻害剤のスクリーニング

##### 線維性集塊の形成 (Focus formation assay) を利用した EMT 阻害の評価

網膜色素上皮細胞は、長期の培養においても上皮性が維持できる細胞だが、過去に当研究室では炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を作用させると、EMT 様変化 (カドヘリンの低下、細胞外マトリックス (ECM) 産生の増加、線維芽細胞様の形態変化) を呈し、ECM 内に細胞が遊走・集積する特徴的な線維性集塊の

形成 (focus formation) を認めるようになることを報告している。(Takahashi *et al.*, J Biol Chem 2010) この現象を基に構築した EMT 評価アッセイを用い、EMT 阻害剤のスクリーニングを行う。培養した評価細胞に EMT 誘導剤と評価薬剤を同時添加し、線維性集塊形成度を定量化することによって、EMT 阻害能を判定する。

#### 3 次元培養系 (3D-culture) による評価

は 2 次元培養系 (cell based assay) による評価だが、より生体に近い 3 次元培養系を用い、細胞浸潤能、組織構築能を指標に EMT 阻害能を判定する。

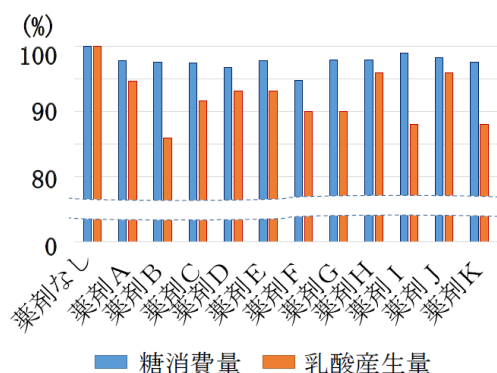
## 4. 研究成果

### (1) 解糖系からミトコンドリア呼吸へ代謝変動を起こす薬剤のスクリーニング 糖消費量・乳酸産生量測定

128 種の漢方薬成分を添加し、糖消費量および解糖系最終産物である乳酸産生量を、それぞれ測定した。

糖消費のみ抑制、乳酸産生量のみ抑制、糖消費・乳酸産生量とも抑制、いずれも抑制されないものに分類した。図 1 は糖消費および乳酸産生とも抑制された薬剤についての結果を提示する。糖消費抑制については、抑制されても数%程度であり、残念ながら、現段階では、その抑制効果は明瞭とは言えない状況である。

(図 1)



\* 薬剤添加なしの条件での結果を 100%とした場合の比率

#### PKM2 チロシン残基リン酸化の評価

PKM2 酵素活性は、チロシンリン酸化 (Tyr105)と連動することから、の結果、糖消費・乳酸産生量を抑制する可能性のある薬剤処理を行った細胞の溶解産物を用いて、ウエスタンブロットによる評価を行い、チロシンリン酸化が抑制される、つまり酵素活性が高い状態でミトコンドリア呼吸促進を促すことができる可能性を評価した。

LDH、PDK など解糖系亢進に関連する分子への影響

糖消費・乳酸産生量とも抑制する可能性があるが、PKM2 のリン酸化には影響を与えていない薬剤については、LDH、PDK など、PKM2 以外の解糖系亢進に関連する分子に影響を与えていないか、ウエスタンブロットによる評価を行った。

の結果と、の結果が連動していると判定するには、結果が明瞭ではなかったため、可能性のある薬剤を使用し、実験条件を変更することで、結果が明瞭になるかどうか再検討中である。より明確な結果が得られた場合には、オリゴマイシン (ミトコンドリア ATP 合成阻害薬) 感受性試験による確認を行う予定である。

(2) 上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) 阻害剤のスクリーニング

線維性集塊の形成 (Focus formation assay) を使用した EMT 阻害の評価

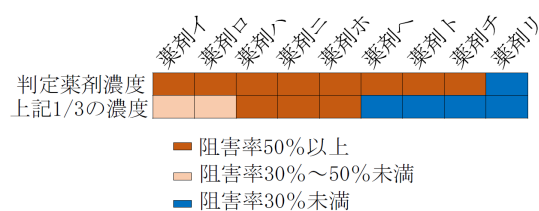
当研究室で構築した EMT 評価アッセイを用い、長期培養状態においても上皮性が維持されている網膜色素上皮細胞に EMT 誘導剤と 128 種の評価薬剤を同時添加し、線維性集塊形成度を定量化した。focus formation の阻害率を評価することで、EMT 阻害の評価を行い、阻害率が 50%以上のものを「阻害活性有り」と判断した。(図 2)

「阻害活性有り」と判断された漢方薬成分に関しては、更に生体に近い状態での評価を行うため、今後 3 次元培養による評価を行う

予定である。

また、当研究室では上皮性を保つ細胞に炎症性サイトカインを作用させることで EMT 様の線維性集塊形成を認めるようになる現象の作用機序には、接着分子であり、癌幹細胞マーカーの一つでもある CD44 や、そのリガンドであるヒアルロン酸が関与していることを明らかにしており、選別された薬剤が、これらの分子機構に影響を与えるかどうかについても評価している。

(図 2)



(参考文献・引用文献)

Yae *et al.*, Evid Based Complement Alternat Med 2012  
 Tamada *et al.*, Cancer Research 2012; 72 (6):1438-1448  
 Tamada *et al.*, Clinical Cancer Research 2012; 18: 5554-5561  
 Takahashi *et al.*, J Biol Chem. 2010

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[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://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 真由美 (Tamada Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 80528133