

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：16301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K09301  
 研究課題名(和文) 伝統薬物成分の免疫機能と腫瘍環境制御による抗腫瘍・抗転移効果とその作用機構

研究課題名(英文) Antitumor and antimetastatic activities of various natural compounds isolated from traditional drug through the regulation of tumor environment and immune function

研究代表者  
 木村 善行 (Kimura, Yoshiyuki)  
 愛媛大学・医学部・研究員

研究者番号：20294796  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：伝統薬物成分レスベラトロール関連3種のジハイドロオキシstilbenesは、アゾキシメタンおよびデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)処理による大腸癌の増殖を抑制した。大腸周辺組織中のIL-1、IL-6、MCP-1およびPD-1の産生上昇をジハイドロオキシstilbenes類は抑制した。さらに、ジハイドロオキシstilbenes類は、M2型マクロファージからのPD-1発現を抑制した。ジハイドロオキシstilbenes類の大腸癌の増殖抑制は、腫瘍組織周辺マクロファージからのサイトカイン、ケモカインおよびPD-1抑制によるものであること示唆した。  
 漢方薬「桂枝加芍薬湯」およびアカメガシワエキスはDSS誘発大腸炎を抑制した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、大腸癌に罹患する人たちが増大し、癌死亡率の上位を占めつつある。更に、潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症性大腸炎は、難病の一つであり、大腸癌発生のリスクファクターの一つである。漢方薬「桂枝加芍薬湯」やアカメガシワエキスは、デキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎を抑制した。レスベラトロール関連化合物の合成ジハイドロオキシstilbenes類は、発癌物質アゾキシメタンおよびデキストラン硫酸ナトリウム誘発による大腸癌の増殖を抑制した。これらの成果は、新たな大腸炎や大腸癌の治療薬候補となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Traditional drug compound resveratrol-related three dihydroxystilbenes inhibited the colon tumor growth induced by azoxymethane(AOM) plus dextran sulfate sodium (DSS) in mice. Furthermore, three dihydroxystilbenes inhibited the elevations of IL-1, IL-6, MCP-1 and programmed cell death-1 (PD-1) in AOM/DSS-treated mice. Three dihydroxystilbenes inhibited the PD-1 expression in M2-macrophages. These findings suggested that three dihydroxystilbenes prevented colon tumor growth by inhibiting cytokines, a chemokine, and PD-1 induced in the colon tumor microenvironment by tumor-associated macrophages (TAMs).  
 Kampo Medicine (Keishi-ka-Shakuyaku-To) and Mallotus japonicus cortex (Akamegashiwa) prevented the DSS-induced ulcerative colitis.

研究分野：薬理学

キーワード：癌 伝統薬物成分 薬理学 生理活性 生体分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌治療には、従来の癌化学療法剤以外に、新たな分子標的剤や腫瘍の血管新生抑制剤が開発され、臨床現場で使用され、癌治療が著しく進歩している。その一方、耐性癌出現による癌再発や転移を引き起こしている。

(2) 最近、大腸癌に罹患する人たちが増大し、癌死亡率の上位を占めつつある。更に、潰瘍性大腸炎やクローン病の炎症性大腸炎は、難病の一つであり、大腸癌発生のリスクファクターの一つである。

(3) 腫瘍組織周辺に集積するマクロファージ(Tumor-associated Macrophages, TAMs)、Type 2 Macrophage であり、免疫機能抑制を誘導し、腫瘍の増殖を促進している。M2 型 Macrophage の Programmed cell death 1 (PD-1)発現による癌免疫逃避機構によって癌増殖を抑制しない。TAMs 中の M2 型 Macrophage からの Cytokine 類、Chemokine および PD-1 の発現抑制が新たな治療薬候補化合物となる。

(4) 伝統薬物には、免疫機能活性化による抗腫瘍効果やがん化学療法剤の副作用防止効果期待されている。本研究では、①伝統薬物成分 Resveratrol 類似化合物 3 種の Dihydroxystilbene の Adoxynethane (AOM)および Dextran Sulfate Sodium (DSS)による大腸癌の増殖および②漢方薬 桂枝加芍薬湯、アカメガシワ(*Mallotus japonicus cortex*)エキスおよび明日葉中(*Angelica keiskei root*)のカルコンの主成分 Xanthoangelol の DSS 誘発潰瘍性大腸炎に対する影響を検討した。

## 2. 研究の目的

(1) 腫瘍の増殖に関わる TAM 中の M2 型 Macrophage からの PD-1 発現を抑制する成分を伝統薬物成分および関連化合物から探索する(In vitro)。

(2) 潰瘍性大腸炎は大腸癌発生のリスクファクターであると報告されている。そこで、

Dextran Sulfate Sodium (DSS)による潰瘍性大腸炎を抑制する伝統薬物およびその成分を探索する(In vivo)。

(3) 以上の実験結果に基づいて、発癌物質 Azoxymethane(AOM)と DSS 誘発による大腸癌発生・増殖での伝統薬物成分の癌増殖の抑制効果を明確にし、腫瘍組織周辺のサイトカイン類、ケモカイン、PD-1 産生および癌増殖周辺組織中の免疫染色法による COX-2 発現を測定し、その作用機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) TAM 中の M2 型 Macrophage からの PD-1 発現に及ぼす Resveratrol、Piceatannol およびその関連化合物 3 種類の Dihydroxystilbene 類の影響を検討する。

(2) DSS 誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす漢方薬 桂枝加芍薬湯エキス、アカメガシワ(*Mallotus japonicus cortex*)エキスおよびアシタバ根(*Angelica keiskei root*)の主カルコン成分 Xanthoangelol の影響を検討し、大腸炎組織中のサイトカイン類やケモカイン類の役割を明らかにする。

(3) 発癌物質 AOM 投与後の 1.5%DSS 飲料水の 5 日間の自由摂取を 3 回繰り返し、M2 型 Macrophage からの PD-1 発現を抑制した 3 種類の Dihydroxystilbene 類の大腸癌増殖に対する影響を検討し、大腸癌周辺組織中からのサイトカイン類、ケモカイン、PD-1 産生および免疫染色法による COX-2 発現を測定し、その作用機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

伝統薬物(漢方方剤、民間薬など)には抗腫瘍効果や既存の化学療法剤の副作用防止が期待されているが、その有効性や有効成分が不明確である。現在、大腸癌の罹患率が増加しつつ、大腸癌による死亡率も増加している。さらに、難病に指定されている潰瘍性大腸炎やクローン病が、大腸癌のリスクファクターであるとの報告がある。そこで、本研究では、①漢方方剤 桂枝加芍薬湯の炎症性大腸炎に及ぼす影響を検討した。②民間薬で、古くから胃腸病の治療に使用されてきたアカメガシワ(*Mallotus japonicus cortex*)エキスおよび③明日葉根(アシタバ根) (*Angelica keiskei root*)の黄色成分である主カルコンの Xanthoangelol の Dextran Sulfate Sodium (DSS)誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす影響を検討した。更に、④発癌物質 Azoxymethane(AOM) 処理後、1.5%DSS 飲料水の 5 日間の自由摂取を 3 回繰り返し、大腸癌の発生・増殖に及ぼす Resveratrol 関連した 3 種類の Dihydroxystilbene 類の影響を検討すると共に、TAM 中の M2 型 Macrophage からの癌免疫を抑制する PD-1 発現の影響を検討した。以下にその研究成果を順次報告する。

(1) 漢方方剤 桂枝加芍薬湯の Dextran Sulfate Sodium (DSS)誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす影響:

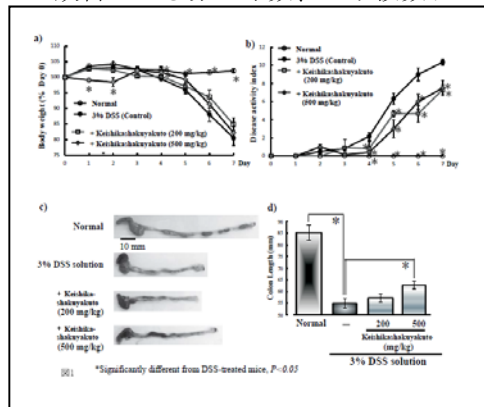
3%(w/v)DSS 飲料水の 7 日間の自由摂取し、漢方方剤 桂枝加芍薬湯エキス(200 および 500mg/kg)を 1 日 2 回 7 日間経口投与した。

図 1 に示すように体重の減少(a)、Disease Activity Index の上昇(b)、結腸の長さ(c および d)を抑制した。

**Disease Activity Index : Weight Loss Score: 0, None; 1, 1-<5%, 2, 5-<10%, 3, 10-<15%, 4, >15%. Stool Score: 0, Normal; 1, Light loose; 2, Loose, 3, Light diarrhea, 4, Severe diarrhea. Bleeding Stool Score: 0, Negative; 1, Light surface positive; 2, Hemoccult positive; 3, Bleeding; 4, Gross bleeding.**

8 日目に 3 種混合麻酔下で下大静脈からヘパリン採血し、赤血球数、白血球数、血小板数およ

びヘマトクリット値、ヘモグロビン値を測定し、Table 1 に示すように、桂枝加芍薬湯は DSS 飲料による赤血球数、血小板数およびヘマトクリット値、ヘモグロビン値の低下を抑制した。



**Table 1. Effects on red cells, leukocytes and platelets, and Hb and Ht levels in DSS-treated mice**

Groups	Red cells (x10 <sup>3</sup> /μL)	Leukocytes (x10 <sup>3</sup> /μL)	Platelets (x10 <sup>4</sup> /μL)	Hb (g/100 mL)	Ht (%)
Normal	867.7 ± 10.5*	4.77 ± 0.72	48.40 ± 4.59*	13.32 ± 0.09*	39.45 ± 0.43*
3% DSS	247.2 ± 40.5	3.85 ± 1.25	26.20 ± 6.27	4.01 ± 0.70	11.10 ± 2.15
keishikashakyakuto (200 mg/kg)	637.3 ± 29.5*	3.17 ± 0.59	51.07 ± 6.69*	9.75 ± 0.47*	28.12 ± 1.33*
keishikashakyakuto (500 mg/kg)	399.2 ± 3.74*	5.25 ± 1.21	68.03 ± 5.44*	6.20 ± 0.56*	17.85 ± 1.55*

DSS: dextran sulfate sodium. Values are means ± SEM of 6 mice.

\*Significantly different from dextran sulfate sodium-treated groups; P<0.05

さらに、図 2 示すように、3%DSS7 日間の飲料において結腸の粘膜傷害が引き起こされ、桂枝加芍薬湯エキス(200 および 500mg/kg)投与によって、DSS によって引き起こされた結腸の粘膜傷害が抑制された。

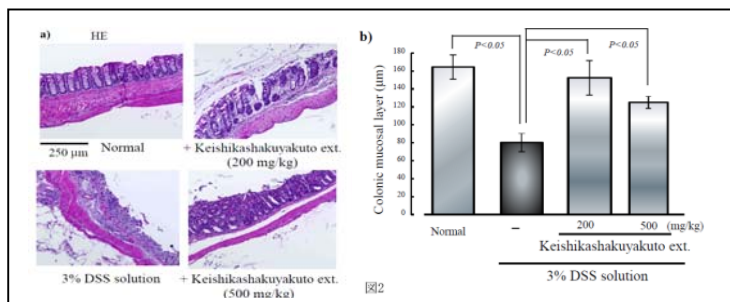


図2

結腸組織中の MCP-1、IL-1β および TNF-α の上昇を抑制した (図 3)。

以上の事から、桂枝加芍薬湯は DSS による結腸内のサイトカイン類(IL-1β および TNF-α)およびケモカイン(MCP-1)の上昇の抑制を介してデキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎を抑制したと推察された。

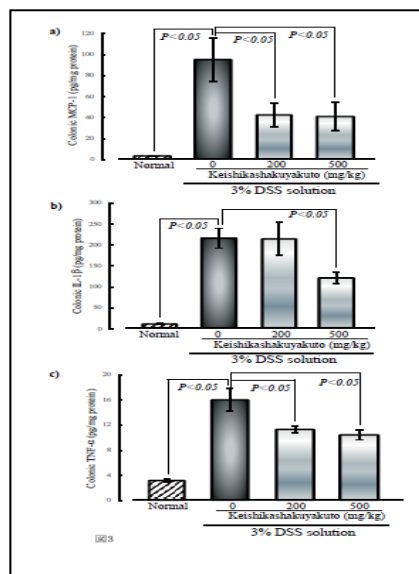


図3

(2) アカメガシワ (*Mallotus japonicus* Cortex) エキスのデキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす影響

桂枝加芍薬湯と同様に、3%(w/v) Dextran Sulfate Sodium (DSS) 飲料水の 7 日間の自由摂取し、アカメガシワエキス(200 および 500mg/kg)を 1 日 2 回 7 日間経口投与した。その結果、図 4 に示すように、DSS 投与による体重減少、食餌摂取量の低下、DAI の上昇および結腸の縮小を抑制した。更に、結腸の縮小や結腸の粘膜傷害や粘膜への好酸球の浸潤を抑制した(図 5)。

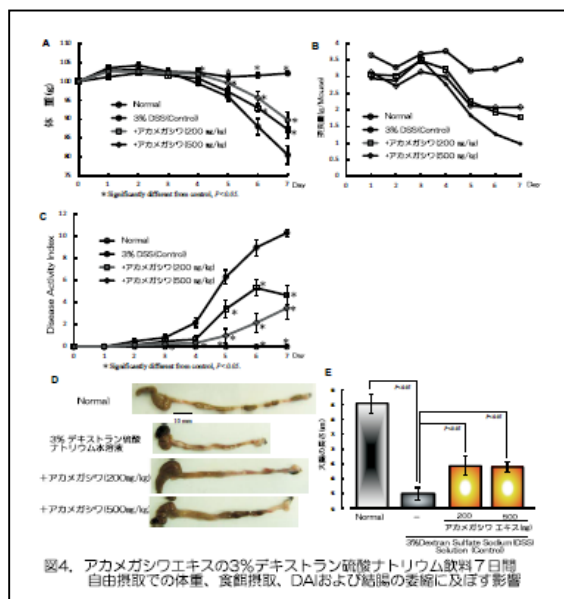


図4. アカメガシワエキスの3%デキストラン硫酸ナトリウム飲料7日間自由摂取での体重、食餌摂取、DAIおよび結腸の萎縮に及ぼす影響

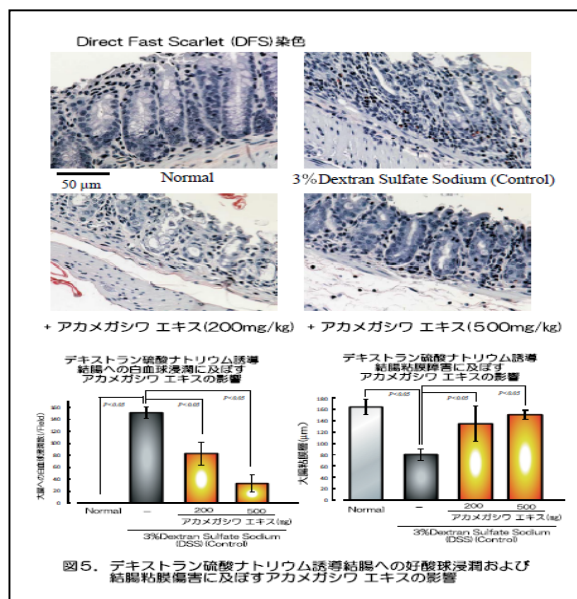
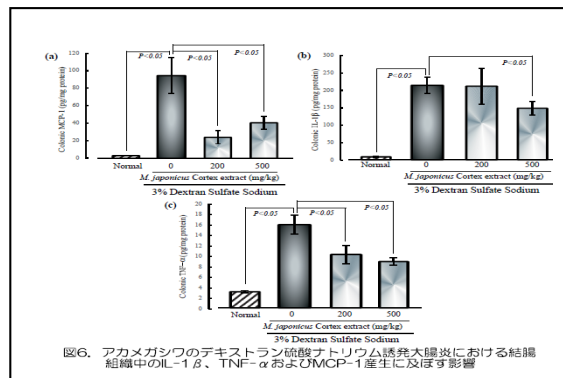
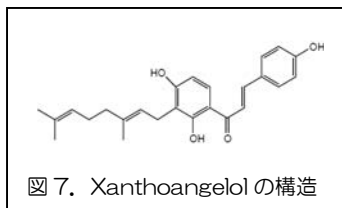


図5. デキストラン硫酸ナトリウム誘発結腸への好酸球浸潤および結腸粘膜傷害に及ぼすアカメガシワエキスの影響

アカメガシワエキスの投与は、DSS 誘発による潰瘍性大腸炎での結腸組織中の MCP-1、IL-1β

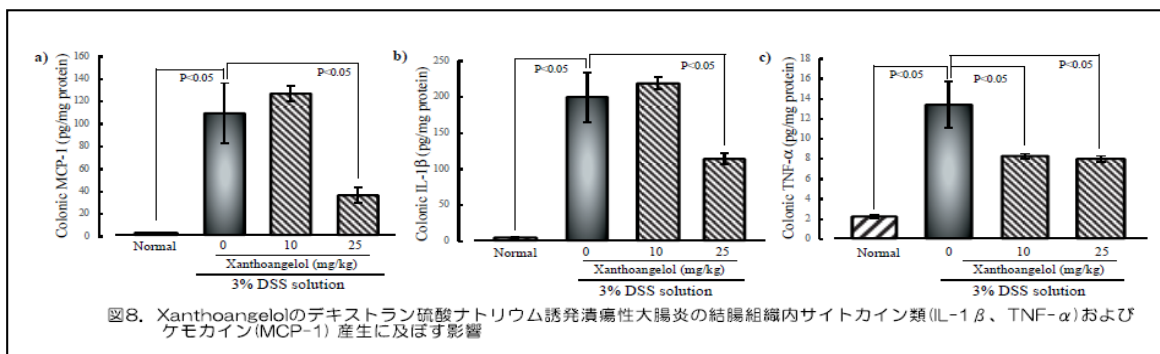
および TNF- $\alpha$  の上昇を抑制した(図 6)。

以上の実験事実から、アカメガシワは、桂枝加芍薬湯と同様に結腸内のサイトカイン類(IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ )およびケモカイン(MCP-1)の上昇の抑制を介してデキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎を抑制したと推察された。

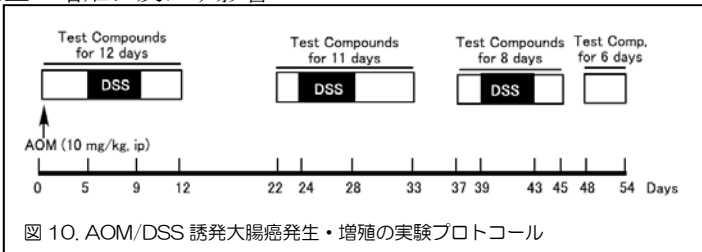


(3) アシタバ根(*Angelica keiskei* Root)中の主カルコン成分 Xanthoangelol のデキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎に及ぼす影響

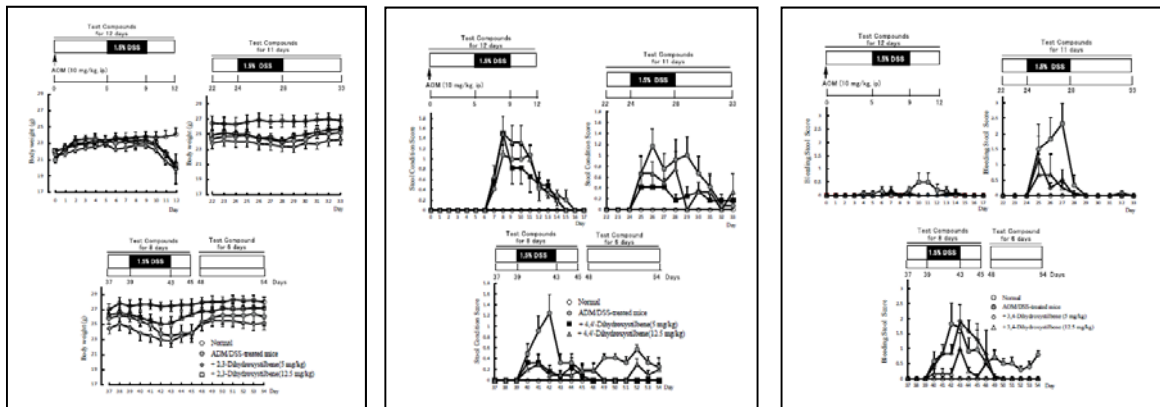
Xanthoangelol(図 7)は、漢方方剤 桂枝加芍薬湯およびアカメガシワ(*Mallotus japonicus* Cortex)と同様に、結腸内のサイトカイン類(IL-1 $\beta$ および TNF- $\alpha$ )およびケモカイン(MCP-1)の上昇の抑制(図 8)を介してデキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎を抑制したと推察された。



(4) Resveratrol 関連合成 Stilbene 類の発癌物質 Azoxymethane(AOM)と Dextran Sulfate Sodium (DSS)処理による大腸癌の発生・増殖に及ぼす影響

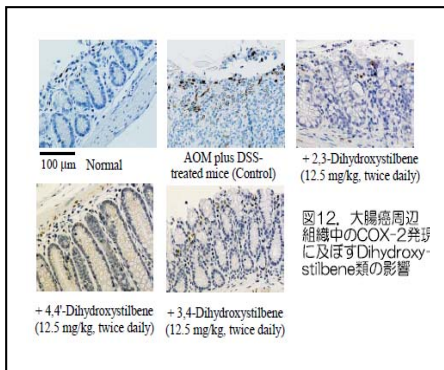


Resveratrol 関連 3 種類の Dihydroxystilbene 類(図 9)の発癌物質 Azoxymethane(AOM)と Dextran Sulfate Sodium (DSS)の実験プロトコールは図 10 に示すように行い、AOM(10 mg/kg)を腹腔内投与後、1.5%DSS 含有飲料水を 5 日間 3 回に分けて自由摂取させ、AOM 投与 55 日後に 3 種混合麻酔下、ヘパリン加採血後、安楽死させ、大腸を摘出し、大腸癌の増殖および大腸癌組織周辺の各種サイトカイン類、ケモカインおよび癌免疫逃避機構に關与する M2 型 Macrophage からの Programmed cell death 1 (PD-1)等を行った。1.5%DSS の摂取後、体重減少、軟便状態および血便状態が起こるが、3 種類の Dihydroxystilbene 類は抑制しなかった(図 11)。



この事実は、3 種類の合成 Stilbene 類が DSS 誘発による大腸炎を抑制しない事を示唆した。

表 2 に示すように  
3 種類の Dihydroxystilbene 類は、  
大腸の重量、腫瘍面積、腫瘍数  
および腫瘍周辺組織中の COX-2  
陽性細胞数の増加を抑制した(図 12)。

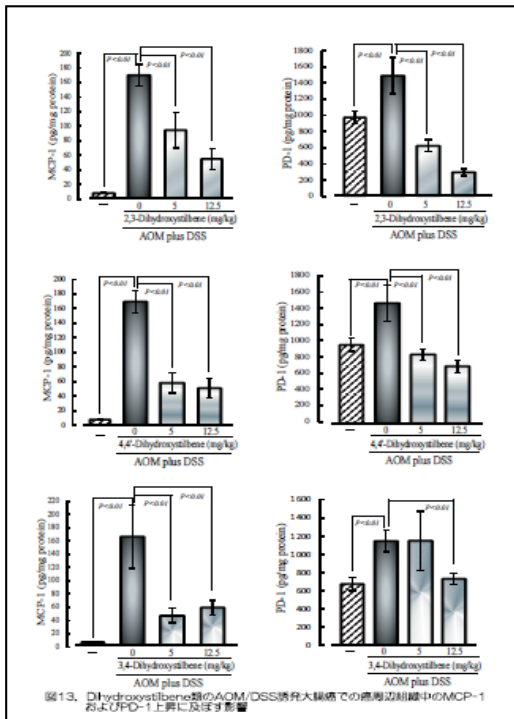


**Table 2**  
Effects of 2,3-, 4,4'- and 3,4-dihydroxystilbenes on colon weight and tumor number, tumor area and COX-2-positive cell numbers in the colon in AOM/DSS-treated C57BL/6J mice

Groups	Colon (mg)	Tumor number	Tumor area (mm <sup>2</sup> )	COX-2-positive cell number (mm <sup>2</sup> /field)
<b>Experiment 1</b>				
Normal	226.13±9.24*	0±0*	0±0*	19.0±4.9*
AOM/DSS-treated mice (Control)	460.15±22.36	4.50±0.67	236.73±36.77	156.0±23.8
<b>+ 2,3-Dihydroxystilbene</b>				
5 mg/kg, twice daily	379.07±33.97*	2.17±0.60*	118.84±42.65*	60.2±12.7*
12.5 mg/kg, twice daily	369.20±23.33*	0.83±0.40*	50.48±28.16*	53.3±14.5*
<b>+ 4,4'-Dihydroxystilbene</b>				
5 mg/kg, twice daily	348.88±18.90*	2.50±1.02*	92.94±35.05*	38.2±10.0*
12.5 mg/kg, twice daily	390.87±28.42*	3.00±0.58	112.27±25.79*	54.5±18.6*
<b>Experiment 2</b>				
Normal	288.43±16.76*	0±0*	0±0*	21.3±6.8*
AOM/DSS-treated mice (Control)	682.48±44.64	12.40±2.04	195.06±14.98	181.3±27.7
<b>+ 3,4-Dihydroxystilbene</b>				
5 mg/kg, twice daily	549.55±97.73	4.33±2.74*	106.65±65.18	86.8±32.9*
12.5 mg/kg, twice daily	495.62±72.13	6.17±2.75*	46.37±18.90*	57.7±20.5*

Values are the means ± S.E. of 6 mice. \*Significantly different from AOM/DSS-treated mice. P<0.05. AOM: Azoxymethane (10 mg/kg, ip), DSS: 1.5% Dextran sulf sodium.

3 種類の Dihydroxystilbene は、大腸癌周辺組織からの MCP-1 および PD-1 産生の上昇を抑制した(図 13)。また、AOM/DSS 誘発大腸癌に伴う癌周辺組織中の IL-1β および IL-6 の上昇を抑制した(データ未発表)。



以上の実験事実から、3 種類の Dihydroxystilbene の AOM/DSS による大腸癌発生・増殖の抑制は、癌周辺組織中のサイトカイン類(IL-1β および IL-6)、ケモカイン(MCP-1)、M2 型 Macrophage からの PD-1 産生の抑制および COX-2 発現抑制作用が関与している可能性が示唆された。さらに、3 種類の Dihydroxystilbene (2,3-, 3,4-, および類の 4,4'-Dihydroxystilbene) の作用機構を解明する必要がある。

癌周辺組織には Macrophage が集積され、その Macrophage は、M2 型 Macrophage であると報告されている。先に著者は、3 種の Dihydroxystilbene は、M2 型 Macrophage の分化および活性化を抑制したことを報告した。3 種の Dihydroxystilbene は、M2 型 Macrophage からの PD-1 発現を抑制した(図 14)。

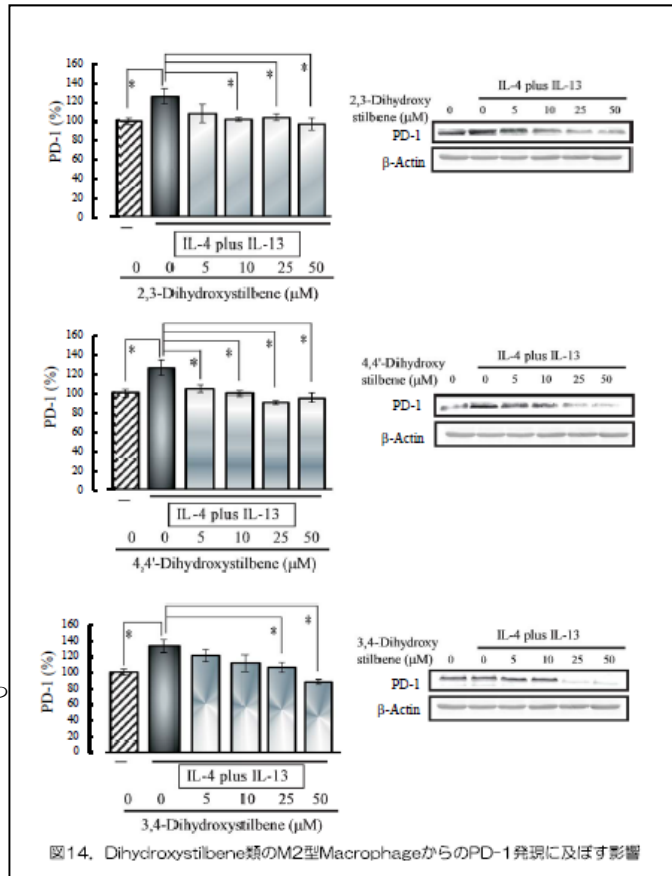


図 14. Dihydroxystilbene 類の M2 型 Macrophage からの PD-1 発現に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshiyuki Kimura	4. 巻 6
2. 論文標題 Effects of kampo medicine keishikashakuyakuto on large intestine disease in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Traditional & Kampo Medicine	6. 最初と最後の頁 165-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/tkm2.1232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiyuki Kimura	4. 巻 10
2. 論文標題 Preventive effects of Mallotus japonicus cortex extracts on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in C57BL/6J mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Natural Products Journal	6. 最初と最後の頁 177-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/221031550966619106112622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiyuki Kimura and Kimiye Baba	4. 巻 12
2. 論文標題 Xanthoangelol isolated from Angelica keiskei roots prevnts dextran sulfate sodium-induced colitis in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Natural Products Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----