

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18157

研究課題名(和文)臨床応用を目指した膵癌におけるエスシンのNF- $\kappa$ Bを介した抗腫瘍効果の解明研究課題名(英文) Escin inhibits angiogenesis by blocking nuclear factor- $\kappa$ B activation in pancreatic cancer cell lines

研究代表者

大見 関(Omi, Kan)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60825488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転移能の高い膵癌はNF- $\kappa$ Bの活性が高く血管新生因子の産生能を亢進し悪性度を高めている。エスシンが膵癌のNF- $\kappa$ B活性を抑制し血管新生能が低下するかを検討した。エスシンは一定濃度において細胞増殖を抑制した。NF- $\kappa$ Bの核内移行を抑制し、活性が低下することをNF- $\kappa$ B ELISAで確認した。Western blottingでは、細胞質、核内でtotal NF- $\kappa$ Bだけでなく、リン酸化NF- $\kappa$ Bの活性低下をみた。RT-PCRとELISAではIL-8やVEGFの遺伝子発現とタンパク産生が低下していた。エスシンは、不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能を低下させた。エスシンは膵癌の血管新生能を低下しうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は悪性度が極めて高く、より効果のある新規治療薬の開発は急務である。我々は今までに、膵癌の転移や血管新生に転写因子NF- $\kappa$ Bが重要な役割を果たしていることを報告してきた。転移能の高い膵癌は恒常的にNF- $\kappa$ Bの活性が高く、その下流のVEGFやIL-8といった血管新生因子の産生能を亢進し悪性度を高めている。以上より、NF- $\kappa$ Bは新規分子標的薬のターゲットになりうるが、既存のNF- $\kappa$ B阻害薬は副作用が強く長期投与が困難で、膵癌では臨床応用に至っていない。今回、天然化合物エスシンが膵癌の血管新生能を低下させることが示唆されたため、動物実験等を今後行い、臨床応用につなげられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Escin, from the horse chestnut, has been reported to suppress the NF- $\kappa$ B in several cancers. Our previous study showed that NF- $\kappa$ B enhanced angiogenesis in PaCa. We examined whether escin inhibited angiogenesis by blocking NF- $\kappa$ B activation in PaCa. Escin, in concentration of over 10  $\mu$ M, inhibited the proliferation of several PaCa cell lines. In immunocytochemical staining, escin inhibited the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B ELISA showed that NF- $\kappa$ B activity in escin-treated PaCa cells was inhibited and RT-PCR showed that the mRNA expression levels of IL-8 and VEGF were suppressed following escin treatment in the PaCa cell lines. ELISA showed escin decreased the production of IL-8 and VEGF. Tube formation in immortalized human endothelial cells was inhibited following incubation with the supernatants from escin-treated PaCa cells. These results indicated that escin inhibited angiogenesis by reducing the production of IL-8 and VEGF via blocking NF- $\kappa$ B activity in PaCa.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 血管新生 NF- $\kappa$ B VEGF IL-8 anigiogenesis

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は悪性度が最も高い癌種の一つである。手術や化学療法、放射線療法などの治療法が発展してきているが依然としてその死亡率は高く、新規治療薬の開発は急務である。

炎症が発癌や癌の進行に關与することは広く知られてきた。例えば、肝炎ウイルスによる慢性肝炎は肝癌を発生しやすく、慢性膵炎は膵癌のリスクファクターとされ、慢性膵炎患者の発癌率は正常よりも 13~18 倍高い。Farrow らが提唱した、炎症が癌-間質相互作用を介して発癌を誘導する

「Landscape Theory」の概念では、炎症によって産生されるサイトカインが、炎症性転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化することで発癌に關与するとされている (図 1)。NF- $\kappa$ B は消化器癌の悪性度を規定する転写因子のひとつである。我々はこれまでに、膵癌細胞株の NF- $\kappa$ B の活性を比較し、膵癌血管新生および肝転移能と NF- $\kappa$ B 活性が關していることを、世界に先駆けて報告した。以上より、NF- $\kappa$ B は膵癌の治療標的になりうると思われるが、既存の NF- $\kappa$ B 阻害薬は副作用が強く、臨床応用に至っていない。そこで私たちは副作用の少ないとされる天然化合物に着目した。生薬「馬栗(セイヨウトチノキ)」も、古くから抗炎症作用や抗酸化作用を目的に使われてきたが、その薬理的なメカニズムの解明には至っていない。

エスシン(図 2)は馬栗の種子由来のサポニンで、様々な癌種において細胞増殖や NF- $\kappa$ B 活性を抑えることで抗腫瘍効果を示すことが報告されているが、膵癌の血管新生におけるエスシンの効果は未だ明らかではない。

図1 炎症と発癌 Landscape theory

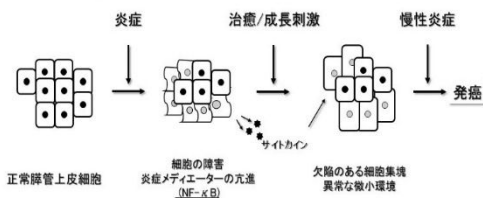
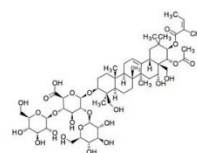


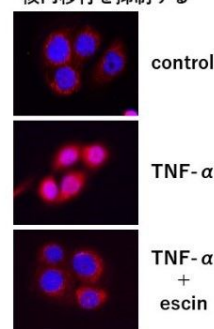
図2 エスシンの分子構造式



## 2. 研究の目的

我々は今までに、膵癌の転移や血管新生に転写因子 NF- $\kappa$ B が重要な役割を果たしていることを報告してきた。転移能の高い膵癌は恒常的に NF- $\kappa$ B の活性が高く、その下流の VEGF や IL-8 といった血管新生因子の産生能を亢進し悪性度を高めている。以上より、NF- $\kappa$ B は新規分子標的薬のターゲットになりうるが、既存の NF- $\kappa$ B 阻害薬は副作用が強く長期投与が困難で、膵癌では臨床応用に至っていない。そこで、副作用が少ないとされる天然由来の化合物に着目した。エスシンは様々な癌種において細胞増殖や NF- $\kappa$ B 活性を抑えることで抗腫瘍効果を示すことが報告されており、我々も膵癌においてエスシンが炎症性転写因子である NF- $\kappa$ B 活性を低用量で抑制することを見出したが(図 3)、膵癌の血管新生におけるエスシンの効果は未だ明らかではない。エスシンが膵癌の NF- $\kappa$ B 活性を抑制し、血管新生能が低下するかを検討し、新規分子標的薬の開発へつなげることを目的に研究を行った。

図3 エスシンはNF- $\kappa$ Bの核内移行を抑制する



## 3. 研究の方法

### (1)細胞毒性の評価

エスシンの膵癌細胞株 (AsPC-1、SW 1990、BxPC-3) に対する効果を WST-1 アッセイで評価した。各膵癌細胞株に対して、0~30  $\mu$ M のエスシンを投与し、72 時間後にその細胞毒性を確認した。

### (2) NF- $\kappa$ B の評価

エスシンが膵癌細胞 (AsPC-1、SW 1990、BxPC-3) の NF- $\kappa$ B 活性を抑制することを免疫染色、NF- $\kappa$ B -ELISA で確認した。予備実験では、エスシンが一部の膵癌の NF- $\kappa$ B 活性を抑制することを認めており、複数の膵癌細胞株で検討した。各細胞株に対してエスシン (10 $\mu$ M) を 2 時間曝露させ、曝露時間の最後 15 分間に TNF- $\alpha$  (5ng/ml) で刺激をし、核内タンパクを抽出し、NF- $\kappa$ B ELISA を行った。また、同様の条件で BxPC-3 を用いて NF- $\kappa$ B 活性の変化に対するエスシンの作用 (核内および細胞質内) を western blotting で確認した。

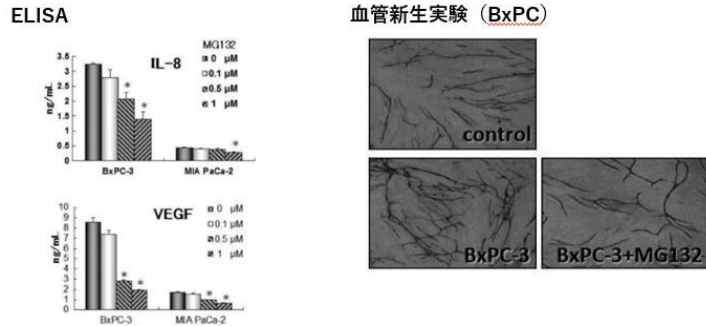
### (3)mRNA の評価

血管新生因子である IL-8、 VEGF の各膵癌細胞株 (AsPC-1、 SW 1990、 BxPC-3) における mRNA の発現増加に対するエスシンの作用を RT-PCR で確認した。5%FBS 含有培地で各膵癌細胞株にエスシン (10 μM) を投与し、その 1 時間後に TNF- (1ng/ml) で 15 分間刺激をした。

### (4)タンパク産生の評価

膵癌由来の血管新生因子のうち、VEGF および IL-8 に着目し、ELISA で定量した。予備実験では、膵癌に対して NF- B 阻害薬の MG132 が VEGF および IL-8 の産生を低下することを確認しており (図 4) 今回は 10%FBS 含有培地において TNF- (1ng/ml) 刺激下に各膵癌細胞株 (SW 1990、 BxPC-3) にエスシンを投与し、48 時間後にその上清を用いて ELISA を行った。

図 4 NF-κB阻害薬 (MG132) は血管新生因子の産生を抑制し、血管新生を低下させる。



### (5)血管新生の評価

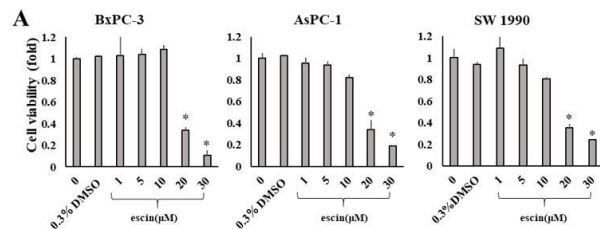
従来の in vitro tube formation assay は on Matrigel 法がよく使われてきたが、我々は Bishop ET, et al. が提案した線維芽細胞 (FB) と血管内皮細胞 (VEC) の共培養法をさらに改良した tube formation assay で VEC の管腔形成を定量的に評価した。膵癌細胞株 (BxPC-3、 SW1990) 10% FBS を添加した培地にて 37°C で一晩インキュベートした後に、エスシン (10 μM) を 2%FBS に添加したもの、または添加しないものと共に、さらに 48 時間培養を行った。その後、細胞上清を回収し、マトリゲル上で EA.hy 926 細胞を混合培地 (2% FBS 含有培地と前述の上清) と共に 16 時間インキュベートし、管腔形成を促した。なお、2%FBS を含む RPMI 培地のみでインキュベートした細胞をコントロールとした。

## 4. 研究成果

(1) エスシンは膵癌細胞株の増殖を有意に抑制する。

膵癌細胞 (BxPC-3、 AsPC-1、 SW1990) をさまざまな濃度のエスシンと 72 時間インキュベートした後、WST-1 アッセイを用いて増殖能を調べたところ、すべての膵癌細胞株の増殖は 10 μM 以上のエスシンにより有意に抑制された (図 5 A)。WST-1 アッセイの結果から半値阻害濃度 (IC50) を算出したところ、BxPC-3、 AsPC-1、 SW1990 細胞ではそれぞれ 17.2、 15.9、 14.1 μM (図 5 B) であった。エスシンによる細胞毒性の影響を避けるため、以降の実験ではエスシンの濃度を IC50 値未満に設定した。

図 5 エスシンは膵癌細胞株の増殖を抑制する (>20μM)



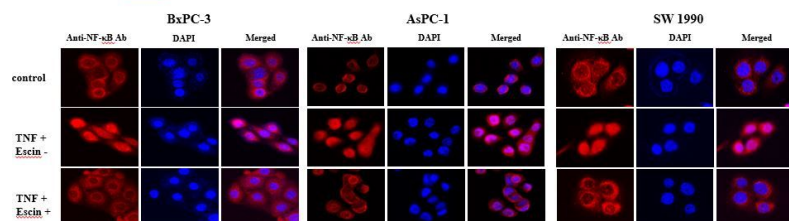
PaCa cell line	IC50 for escin
BxPC-3	17.2 μM
AsPC-1	15.9 μM
SW 1990	14.1 μM

WST-1 assay における各細胞株に対するエスシンの半数阻害濃度。

(2) エスシンは TNF- による NF- B の核内移行を抑制する

免疫染色で、TNF- 単独で処理した細胞では NF- B は核内に移動したが (図 6) エスシン処理した細胞では NF- B は細胞質内にとどまった。次に、核内に移行した NF- B の活性を ELISA 法で測定した (図 7)。その結果、エスシンは TNF- によって誘導される核内の NF- B の活性を有意に低下させることが示された。NF- B の活性は、エスシンおよび TNF-

図 6 NF-κBの核内移行がエスシンによって抑制された。



の両方で処理した細胞では、未処理の細胞と比較して高かったが、TNF- $\alpha$  刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は、エスシンによる抑制の範囲を超えていたと考えられる。また、エスシンが NF- $\kappa$ B を不活性化したという結果をさらに裏付けるために、免疫染色でエスシンに対して最も感受性が高いと思われた BxPC-3 細胞を用いて細胞質および核における NF- $\kappa$ B および p- NF- $\kappa$ B のタンパク質発現量を測定するためにウェスタンブロット分析を行った。エスシンは、細胞質および核における総 NF- $\kappa$ B および p- NF- $\kappa$ B の両方の TNF- $\alpha$  誘発活性化を顕著に減少させた(図8)。

図7 各細胞株でエスシンにより核内NF- $\kappa$ Bが低下した。

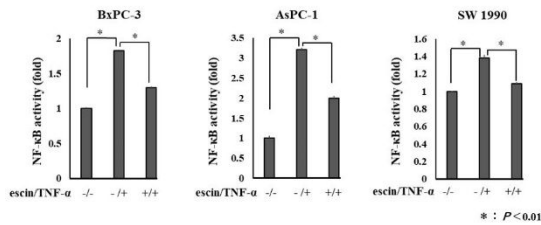
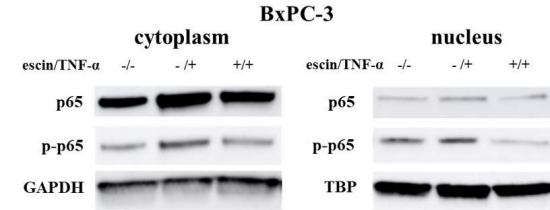


図8 細胞質、核内ともにエスシンでNF- $\kappa$ Bのリン酸化が抑制されていた。

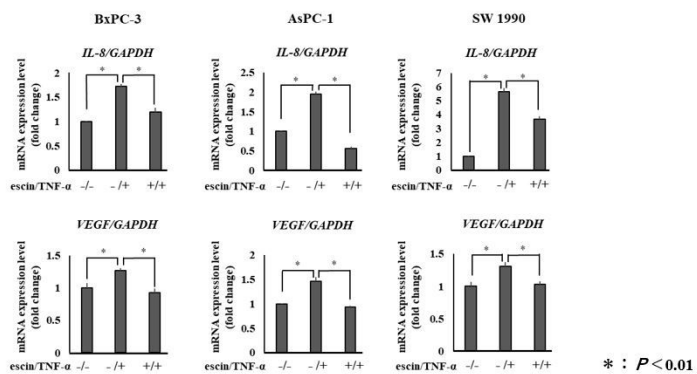


(3) エスシンは TNF- $\alpha$  誘導の IL-8 および VEGF の mRNA 発現レベルを低下させる。

RT-qPCR では、エスシン (10 $\mu$ M) は、膵癌細胞において TNF- $\alpha$  によって誘導された IL-8 および VEGF の mRNA 発現レベルを有意に低下させた(図9)。

図9

エスシンによってTNF刺激下でのIL-8、VEGFのRNA発現量は低下した。



(4) エスシンは膵癌細胞における IL-8 と VEGF の産生量を低下させる。

ELISA で、エスシン (10 $\mu$ M) は TNF- $\alpha$  誘導による膵癌細胞の IL-8 および VEGF のタンパク質産生を有意に抑制した(図10)。また、これらのタンパク質産生をエスシンは用量依存的に抑制した(図11)。IL-8 産生の抑制に関しては、統計的に有意な差が認められたが、エスシンによる SW1990 細胞株の TNF- $\alpha$  誘導 IL-8 産生の抑制は、VEGF 産生の抑制と比較して若干低いものであった。

図10 エスシンによりTNF- $\alpha$ に誘導されたIL-8、VEGFの産生量は低下した。

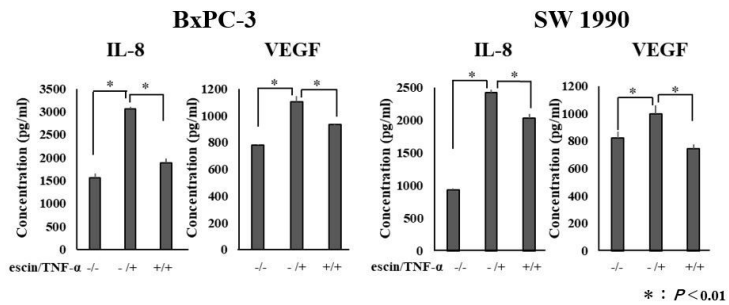
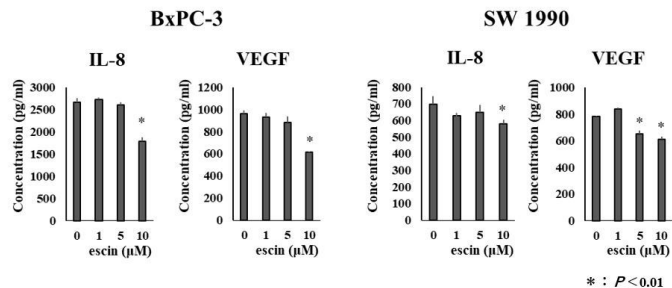


図11 エスシンは用量依存的にIL-8、VEGFの産生量を低下させた。



(5) エスシンはヒト内皮細胞の管腔形成能を低下させる

ヒト内皮細胞における管腔形成に対するエスシンの効果を測定した。管腔形成は、細胞を IL-8 および VEGF と培養した場合に促進された (図 12)。また、管腔形成は、エスシン未処理の膵癌細胞の上清と培養した場合にも促進された。しかし、エスシンで処理した膵癌細胞の上清と培養すると、管腔形成は著しく減少した (図 13)。

考察

膵癌は悪性度がもっとも高い固形癌の一つとされ、化学療法や放射線療法を用いた集学的治療により徐々にその予後は改善してきているが未だにその 5 年生存率は 20% に満たない。新規の治療薬の開発は急務である。我々はこれまでに、NF- $\kappa$ B の活性を抑制することにより、血管新生因子である IL-8 や VEGF の産生が低下し、膵癌細胞の増殖抑制が実現されうることを報告してきている。しかし、既存のボルテゾミブなどの NF- $\kappa$ B 阻害薬は臨床適応されていない。そこで我々は、NF- $\kappa$ B 抑制作用を持つとされる天然化合物に着目した。本研究の目的は、セイヨウトチノキから抽出した天然化合物であるエスシンが、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害

することによって膵癌細胞の血管新生を抑制するかどうかを明らかにすることであった。エスシンと NF- $\kappa$ B 活性阻害による VEGF や IL-8 などの血管新生因子の産生抑制を関連付けた報告はこれまでにない。本研究では、エスシンが IL-8 と VEGF の産生を有意に抑制することがわかったが、部分的な抑制である可能性はある。例えば AP-1 を介した経路も IL-8 を制御しているからである。しかし、今回の研究の結果からエスシンはいくつかのヒト膵癌細胞株において、細胞増殖および NF- $\kappa$ B 活性化を抑制し、VEGF および IL-8 の分泌を減少させることが示された。さらに、エスシンは、膵癌細胞の培養上清によって誘導されるヒト内皮細胞の管腔形成を抑制した。したがって、この結果から、エスシンは NF- $\kappa$ B を不活性化することにより、VEGF および IL-8 産生を低下させ、膵癌細胞による血管新生に影響を与えたと結論づけることができると考える。低濃度のエスシンは細胞の正常な増殖能に影響を与えなかったことから、より安全で毒性の低い化合物である可能性があり、ゲムシタピンや S-1 との併用などにより、その抗癌作用を高めるような使用方法も考慮されると思われる。このように、エスシンは膵癌の有効な治療薬として重要な役割を果たすことが期待されるが、臨床応用するためには、in vivo 実験などさらなる検討が必要である。今回、動物実験を少数のマウスを用いて計画したが、期待される結果が得られなかったため、今後の課題として継続して研究を行っていく方針である。

図12 IL-8、VEGFはヒト内皮細胞の管腔形成を促進する。

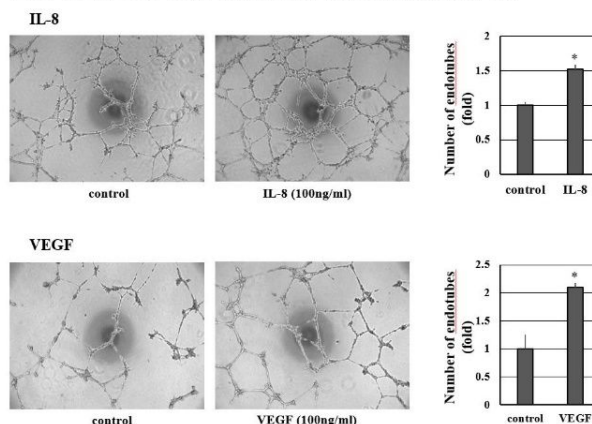
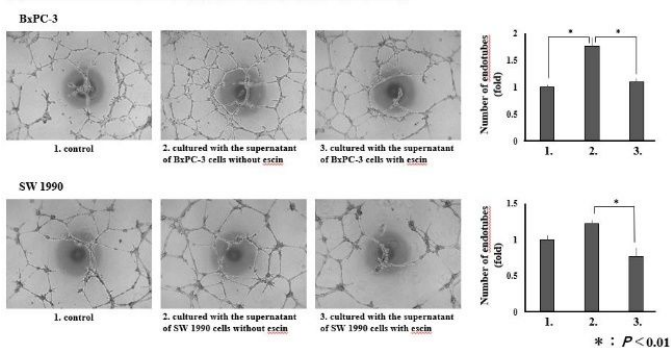


図13 エスシンによりヒト内皮細胞の管腔形成能は低下した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Omi Kan, Matsuo Yoichi, Ueda Goro, Aoyama Yoshinaga, Kato Tomokatsu, Hayashi Yuichi, Imafuji Hiroyuki, Saito Kenta, Tsuboi Ken, Morimoto Mamoru, Ogawa Ryo, Takahashi Hiroki, Takiguchi Shuji	4. 巻 45
2. 論文標題 Escin inhibits angiogenesis by suppressing interleukin-8 and vascular endothelial growth factor production by blocking nuclear factor- $\kappa$ B activation in pancreatic cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2021.8006	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大見 関、松尾洋一、ほか
2. 発表標題 天然化合物エスシンの 膵癌に対する抗血管新生作用の検討
3. 学会等名 第58回日本外科代謝栄養学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大見 関、松尾洋一、ほか
2. 発表標題 Escin inhibits angiogenesis by suppressing IL-8 and VEGF production via blocking NF- $\kappa$ B activation in pancreatic cancer cell lines
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大見 関、松尾洋一、ほか
2. 発表標題 Escinの膵癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大見 関、松尾洋一、ほか
2. 発表標題 肺癌に対するエスシンの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------