

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21792044

研究課題名（和文）フラボン誘導体 Factor-X の生物学的活性
（抗腫瘍・抗ウイルス効果）の検討研究課題名（英文） Study on biological activities of
a naturally occurring flavone, Factor-X

研究代表者

青木 将虎（AOKI MASATORA）

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90299404

研究成果の概要（和文）：

Factor-X はクマザサ抽出液から分離・同定された分子量 330 のフラボン誘導体である。従来クマザサには多くの薬理作用があることが報告されているが、その中で、岐阜大学の共同研究者チームにより、有効成分を含む Fraction から Factor-X が分離・同定されたが、その後の解析により、Factor-X は Tricin (4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone) であることが同定され、その合成にも成功した。我々の予備的実験において、tricin は単純ヘルペスウイルス (HSV) への抗ウイルス効果、また、各種癌細胞株に対する増殖抑制効果・アポトーシス増強能を持つことが示唆された。本研究では更に tricin の効果を検討するため、肝硬変～肝癌の病理に重要な役割を果たす Human Hepatic Stellate cell に対する効果について検討を進め、tricin が stellate cell の PDGF 依存性増殖を抑制することを見出し、そのメカニズムについて論文にて報告した。

研究成果の概要（英文）：

Tricin (4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone), a naturally occurring flavone, has anti-inflammatory potential and exhibits diverse biological activities including antigrowth activity in several human cancer cell lines and cancer chemopreventive effects in the gastrointestinal tract of mice. The present study aimed to investigate the biological actions of tricin on hepatic stellate cells (HSCs) in vitro, exploring its potential as a treatment of liver fibrosis, since HSC proliferation is closely related to the progression of hepatic fibrogenesis in chronic liver diseases leading to irreversible liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Tricin inhibited platelet-derived growth factor (PDGF)-BB-induced cell-proliferation by blocking cell cycle progression and cell migration in the human HSC line LI90 and culture-activated HSCs. It also reduced the phosphorylation of PDGF receptor and the downstream signaling molecules ERK1/2 and Akt, which might be due to its tyrosine kinase inhibitor properties rather than inhibition of the direct binding between PDGF-BB and its receptor. Our findings suggest that tricin might be beneficial in HSC-targeting therapeutic or chemopreventive applications for hepatic fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：癌 ウィルス 歯学 薬理学

1. 研究開始当初の背景

Factor-X はクマザサ抽出液から分離・同定された分子量 330 のフラボン誘導体である。従来クマザサには多くの薬理作用があることが報告されているが、近年我々はクマザサ抽出液の持つ抗ウイルス効果および抗腫瘍効果に注目し検討を行ってきた。その中で、最近我々の共同研究者である岐阜大学生命科学研究支援センターのチームにより、有効成分を含む Fraction から Factor-X が分離・同定された。同成分を用いた我々の予備的実験において、Factor-X は単純ヘルペスウイルス (以下 HSV) への抗ウイルス効果、更に各種癌細胞株に対する増殖抑制効果・アポトーシス増強能を持つことが示唆された。

その後の解析により、Factor-X は Tricin (4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone; Fig. 1) であることが同定された。また、その化学合成にも成功したことより、よりスムーズな研究遂行が可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、Factor-X=tricin の持つ生物学的活性のメカニズムを *in vitro* さらには *in vivo* において明らかにすることを目的とし、今後、癌や感染症などの疾患に対する治療応用への可能性について探ることを目的とする。

3. 研究の方法

In vitro: 各種癌細胞株、正常細胞株を tricin 存在下に培養し、細胞増殖に対する影響を検討。その中で、肝硬変～肝癌の病理に重要な役割を果たす Human Hepatic Stellate cell に注目し、本細胞に対する効果について検討を進め、そのメカニズムについて以下に示す通り各種 assay にて解析した。

4. 研究成果

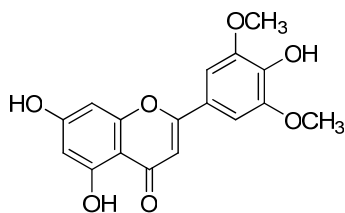


Fig. 1. Chemical structure of tricin.

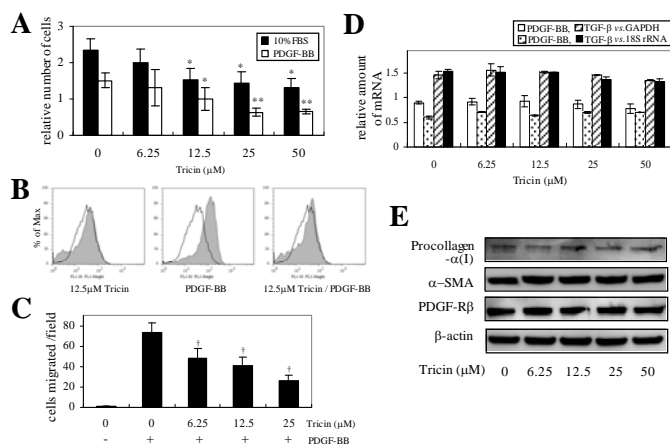


Fig. 2. Effects of tricin on IL90 cell line. (A, B) Serum-starved LI90 cells were stimulated with 10% FBS or PDGF-BB (10 ng/mL) in the presence or absence of tricin at the indicated concentrations for three days. Values indicate the relative number of cells (\pm SD) compared to the control well (vehicle supplemented with 0.2% FBS, set at 1.0) (A). Shaded histogram in flow cytometric analysis represents intracellular ROS levels of each sample compared with control (vehicle alone, open histogram). Representative data from three independent experiments are shown (B). (C) PDGF-BB-induced migration ability of LI90 cells evaluated in the presence or absence of tricin using matrigel-coated transwell. Mean numbers (\pm SD) of cells migrated after 24 h are shown. * p <0.05, ** p <0.01, † p <0.005 vs. cells without tricin treatment. (D) Serum-starved LI90 cells stimulated with PDGF-BB (10 ng/mL) or TGF- β 1 (8 ng/mL) in the presence or absence of tricin for 24 h. Relative expression of collagen- α (I) mRNA compared to control unstimulated well (vehicle alone, set at 1.0) after normalization to GAPDH or 18S rRNA expression is shown. (E) LI90 cell extracts prepared after three days incubation with or without tricin. Indicated proteins were detected using western blotting.

Hepatic stellate cell line, LI90 と tricin を *in vitro* にて作用させることにより、tricin が LI90 の PDGF 依存性の増殖を濃度依存性に抑制すること、また PDGF 依存性の migration を抑制することが認められた (Fig. 2)。同増殖抑制効果は細胞周期の抑制に基付くこと、そのメカニズムとして PDGF レセプターのリン酸化阻害に伴う下流シグナルの抑制が考えられた (Fig. 3)。Tricin は Akt, MAP kinase pathway を阻害することが示された。

この Hepatic stellate cell に対する増殖抑制効果、そのメカニズムは、ヒト肝臓由来 primary cell からの culture-activated hepatic stellate cell においても同様に証明された (Fig. 4)。

Tricin の持つ PDGF レセプターリン酸化抑制効果は、PDGF とレセプターの結合阻害に基づくものではなく (Fig. 5)、Tricin の持つ phospho-kinase 抑制効果が寄与していることが示唆された (Fig. 6)。

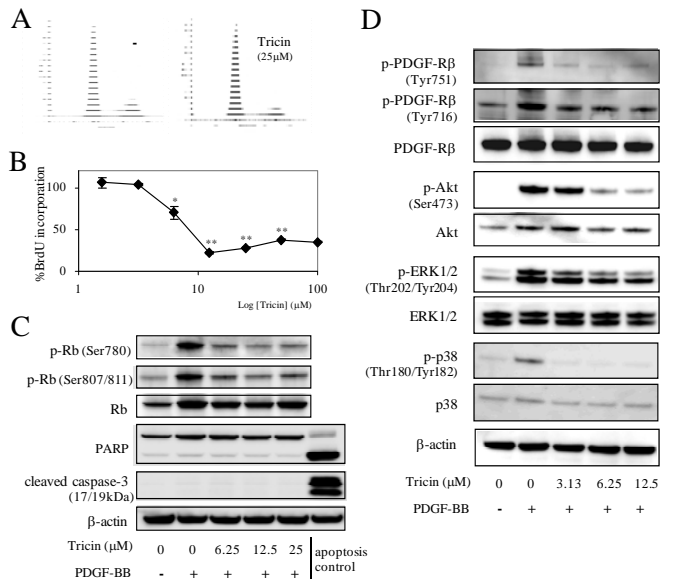


Fig. 3. Inhibitory effects of tricrin on PDGF-BB-induced cell proliferation and PDGF-Rb signaling pathways. Serum-starved LI90 cells were stimulated with PDGF-BB (10 ng/mL) in the presence or absence of tricrin at indicated concentrations. (A) Representative histograms of cell cycle profiles at 24 h incubation following PI DNA staining and flow cytometry are shown from three independent experiments with similar results. (B) ELISA analysis of BrdU incorporation after 24 h incubation. % ratio of BrdU incorporation compared to cells without tricrin. Mean values (\pm SD) of triplicate wells are shown. * p <0.05, ** p <0.005 vs. cells without tricrin. (C,D) After 48 h (C) or 10 min (D) incubation, cell extracts were prepared and analyzed using western blotting. Positive control for apoptosis in (C) prepared from LI90 cells treated using CPT-11 and ultraviolet radiation.

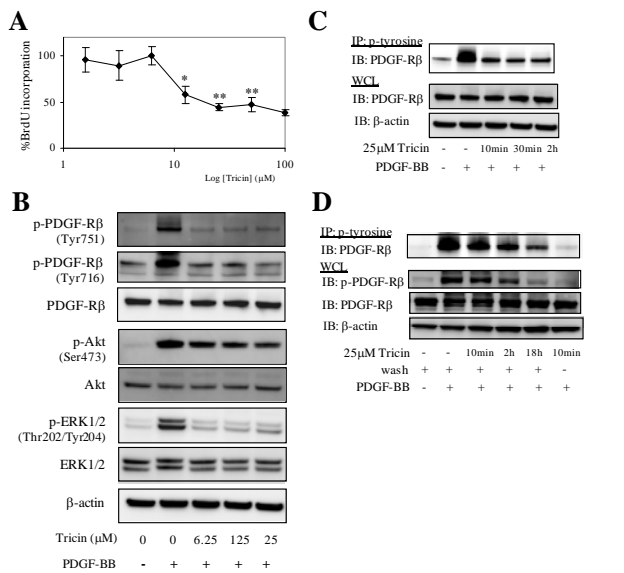


Fig. 4. Effects of tricrin on culture-activated HSCs. (A) Serum-starved HSCs were stimulated with PDGF-BB (10 ng/mL) in the presence or absence of various doses of tricrin. ELISA analysis of BrdU incorporation after 24 h incubation. % ratio of BrdU incorporation compared to cells without tricrin. Mean values (\pm SD) of triplicate, ** p <0.01 vs. cells without tricrin. (B,C) Serum-starved HSCs untreated or treated wells are shown. * p <0.05 with tricrin at indicated concentrations. After 2 h incubation (B) or the indicated times (C), PDGF-BB (final concentration, 10 ng/mL) was added except for the control well. Cell lysates were prepared after 10 min stimulation, and given proteins were detected using western blotting (B). p-PDGF-R β was detected with IP-western blot using anti-p-tyrosine and anti-PDGF-R β antibodies (C). (D) Serum-starved HSCs were exposed to 25 μ M tricrin for 10 min, 2 h, or 18 h, washed (lanes 3-5) or left exposed (lane 6), then stimulated with PDGF-BB for 10 min. Cell lysates were used to detect p-PDGF-R β by western blotting with anti-p-PDGF-R β (Tyr751) Ab or by IP-western as for (C). IB: immunoblotting, WCL: whole cell lysate.

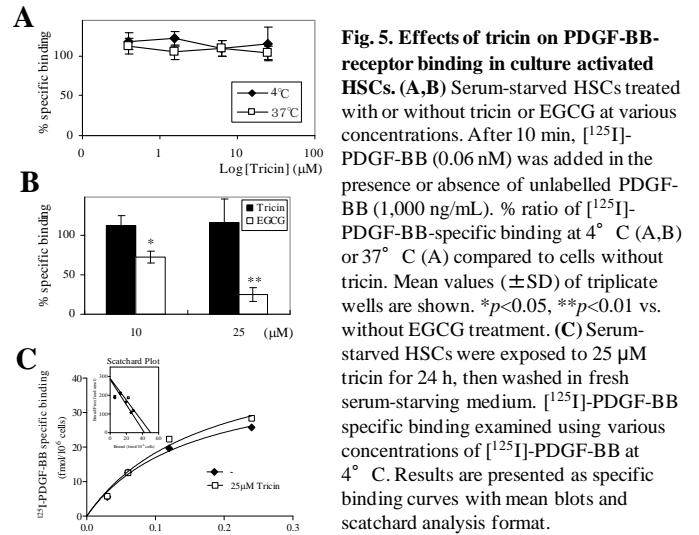


Fig. 5. Effects of tricrin on PDGF-BB-receptor binding in culture activated HSCs. (A,B) Serum-starved HSCs treated with or without tricrin or EGCG at various concentrations. After 10 min, [¹²⁵I]-PDGF-BB (0.06 nM) was added in the presence or absence of unlabelled PDGF-BB (1,000 ng/mL). % ratio of [¹²⁵I]-PDGF-BB-specific binding at 4 $^{\circ}$ C (A,B) or 37 $^{\circ}$ C (A) compared to cells without tricrin. Mean values (\pm SD) of triplicate wells are shown. * p <0.05, ** p <0.01 vs. without EGCG treatment. (C) Serum-starved HSCs were exposed to 25 μ M tricrin for 24 h, then washed in fresh serum-starving medium. [¹²⁵I]-PDGF-BB specific binding examined using various concentrations of [¹²⁵I]-PDGF-BB at 4 $^{\circ}$ C. Results are presented as specific binding curves with mean blots and scatchard analysis format.

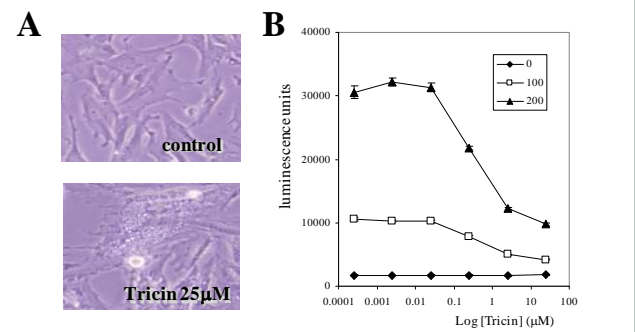


Fig. 6. Effect of tricrin on PDGF-R β kinase activity. (A) HSCs were incubated in the presence or absence of 25 μ M tricrin for 24 h, then HE stained. Representative photographs from microscopy are shown. (B) *In vitro* kinase assay using recombinant PDGF-R β tyrosin kinase (100 or 200 ng/well) performed in the presence or absence of various concentrations of tricrin. Mean kinase activity (\pm SD) detected as luminescence signal shown from triplicate wells.

Hepatic stellate cell は肝炎における肝線維化に対して重大な役割を果たしていることから、Tricrinによる慢性肝炎・肝硬変の予防的、治療的臨床応用の可能性が示唆された。薬剤誘導性肝炎マウスモデルにおける tricrin 投与の予備的実験において、今後の検討には tricrin の bioavailability を向上させることが必要だと思われた。共同研究者の報告により、tricrin 改変体の *in vivo* 投与における優位性が示されたことより (Ninomiya et al, Increased bioavailability of tricrin-amino acid derivatives via a prodrug approach. J Med Chem. 2011)、今後 tricrin の *in vivo* での効果についての検討に有用であると考えられた

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 1 件)

1) N Seki, U Toh, K Kawaguchi, M Ninomiya, M Koketsu, K Watanabe, M Aoki, T Fujii, A Nakamura, Y Akagi, J Kusakawa, M Kage, K Shirouzu and H Yamana. Tricin inhibits proliferation of human hepatic stellate cells in vitro by blocking tyrosine phosphorylation of PDGF receptor and its signaling pathways, J Cell Biochem (in press),

DOI: 10.1002/jcb.24107, 査読有

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 将虎 (AOKI MASATORA)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：90299404