

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：22101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659593

研究課題名(和文)放射線増感作用を示す植物生理活性物質のスクリーニングとその構造の検討

研究課題名(英文)Screening of radio-sensitizing phytochemicals and examination on their structures

研究代表者

大西 健(Ohnishi, Ken)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50152195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：放射線増感作用を示す植物生理活性物質を新たに同定するために、約40種類のフラボノイドのがん細胞及び正常細胞に対する放射線増感作用について調べた。その結果、2種のフラボノイドに、新たに放射線増感作用が見出された。その内の1種(フラボノイドA)の放射線増感作用は、正常細胞よりもがん細胞の方が強く、しかも細胞致死作用が非常に弱いことが示唆された。フラボノイドAによる放射線増感の機序について調べたところ、アポトーシスの増強が寄与していることが示唆された。以上の結果から、フラボノイドAは放射線増感剤として優れた特性を備えていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed screening of about 40 kinds of flavonoid to find novel radiosensitizers derived from plants. From the screening, we found that 2 kinds of flavonoid enhance radiosensitivity of cancer cells and one of the flavonoids (Flavonoid A) has a stronger radiosensitization action to cancer cells compared with normal cells. Furthermore, it is suggested that apoptosis contributes to the radiosensitization. These results show that Flavonoid A is an efficacious radiosensitizer because of its faint cytotoxicity and preferential radiosensitization to cancer cells.

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線増感 フィトケミカル フラボノイド

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

一部のフラボノイド (apigenin、genistein、fisetin、quercetin など) やイソチオシアネート類 (sulforaphane) などの植物由来生理活性物質にはヒトがん細胞に対して放射線増感作用あるいは増殖抑制作用や致死作用のあることが報告されている。しかし、これらの報告は特定のフラボノイドなどを対象とした散発的な研究である。多数のフラボノイド (7000 種以上) が存在することを考慮するとより多くのフラボノイドを包括的に扱ったスクリーニング研究が必要と考えられる。フラボノイドは基本的に図 1 のような基本構造をしている。A 環、B 環および C 環の OH 基の場所やどの OH 基がメチル化されているかによってフラボノイドは多種にわたる。しかし、スクリーニング研究がないため、増感作用あるいは抗がん作用を示すフラボノイドに共通した特徴的な化学構造が存在するのかわか現在不明のままである。

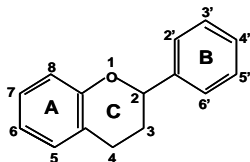


図 1 フラボノイドの基本構造

2. 研究の目的

植物由来生理活性物質は放射線増感物質開発の未開拓分野であり、現在までに報告されている放射線増感作用あるいは抗がん作用 (細胞増殖抑制作用、細胞致死作用) を示す植物由来生理活性物質は数少ない。本研究は、植物由来生理活性物質、特にフラボノイドの中から新規放射線増感物質を見出すと共に、増感作用を示すフラボノイドに共通の特徴的な化学構造があるのかわか検討することを目的とする。最終的には、正常細胞に対し悪影響が少なく (個体への副作用が少ない) がん細胞には致死作用が強い放射線増感作用を示すフラボノイドの同定を目指す。

3. 研究の方法

がん細胞 (ヒト肺がん細胞 H1299、マウス線維芽細胞 C3H/10T1/2 由来のマウスがん細胞 C3H/MCA Clone 15) に対する約 40 種類のフラボノイドの放射線増感作用および抗がん作用 (細胞増殖抑制作用、細胞致死作用) を次の各方法で調べた。放射線増感及び細胞致

死はコロニー形成法、細胞増殖はセルカウンターによる細胞数カウント法により求めた。放射線増感作用あるいは抗がん作用においてカギを握る部位を決定するため人為的にメチル化させた修飾フラボノイドの放射線増感作用および抗がん作用を調べた。放射線増感作用および抗がん作用の分子メカニズムをアポトーシス解析 (DAPI 染色)、DNA 二本鎖切断解析 ( $\gamma$ H2AX 免疫蛍光染色)、タンパク質/遺伝子発現解析 (ウエスタンブロット法、リアルタイム PCR 法) などを用いて調べた。また、放射線増感作用のあるフラボノイドの正常細胞 (ヒト肺線維芽細胞 HFL-、C3H10T1/2) に対する致死作用及び増感作用を検討した。さらに、それらフラボノイドの腫瘍増殖抑制効果をヌードマウスの *in vivo* 実験系で調べた。X 線照射は 10 MV、4 Gy/min の条件で linear accelerator (Mitsubishi Medical Linac) を用いた。

4. 研究成果

4-1. 放射線増感作用

約 40 種のフラボノイドの放射線増感作用を調べたところ、新たに 2 種類のフラボノイド (論文発表までフラボノイド A、フラボノイド B として表記する) に放射線増感作用のあることが分かった。フラボノイド A による放射線増感率 (enhancement ratio at D10) は正常細胞 (HFL-、C3H/10T1/2) よりもがん細胞 (H1299、C3H/MCA Clone 15) の方が高い値を示した (図 2C)。この結果から、フラボノイド A の放射線増感作用は、正常細胞よりもがん細胞の方が強い傾向のあることが示唆された。フラボノイド A は、単独での細胞致死作用が非常に弱く、しかも正常細胞への増感作用が弱いため (図 2A, B)、放射線増感剤として優れた特性を備えていることが示唆された。

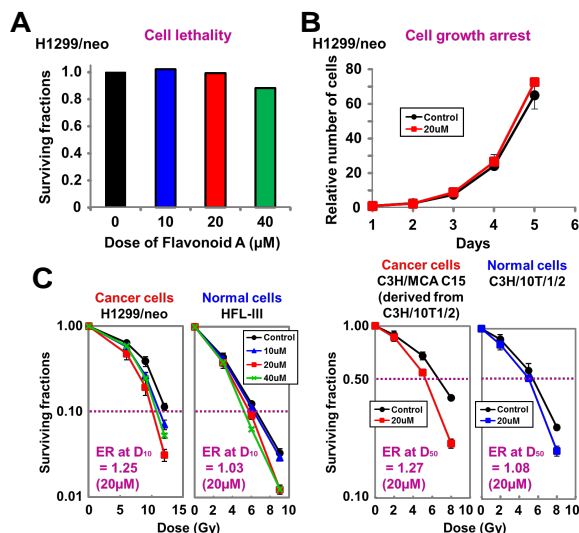


図 2 フラボノイド A の細胞生存率(A)、細胞増殖率(B)、放射線感受性(C)に及ぼす影響。

フラボノイド A の放射線増感作用の *p53* 依存性について調べたところ、正常型 *p53* 保有 H1299 細胞 (H1299/wt*p53*) と変異型 *p53* 保有 H1299 細胞 (H1299/*mp53*) の両細胞において、同様な放射線増感作用が見られた (図 3)。従って、フラボノイド A の放射線増感作用は *p53* 非依存的であることが分かった。

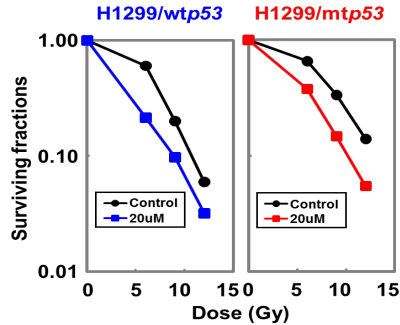


図 3 フラボノイド A の *p53* 非依存的放射線増感作用。

#### 4-2. 放射線増感作用のメカニズム

フラボノイド A の放射線増感作用のメカニズムを調べるため、放射線誘導アポトーシスの出現頻度を DAPI 染色により調べた。その結果、フラボノイド A と放射線併用処理では放射線単独処理よりもアポトーシス出現頻度が増加した (図 4)。これに相関して活性型 Caspase 3 および断片化 PARP の増強が見られた。 $\gamma$ H2AX フォーカス数の変動については、放射線単独処理細胞と放射線/フラボノイド A 併用処理細胞間で有意な違いは見られなかった (図 5)。従って、フラボノイド A によるアポトーシス増強は、DNA 損傷量あるいは DNA 修復阻害以外の要因によることが示唆された。

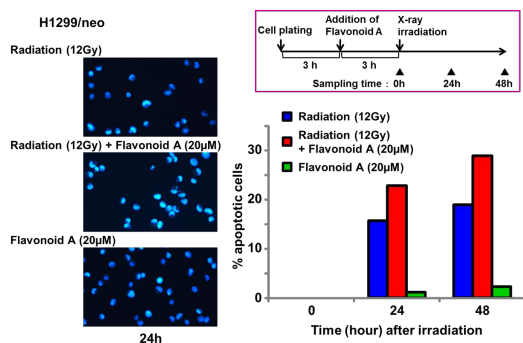


図 4 フラボノイド A による放射線誘導アポトーシスの増強。

アポトーシス誘導は ATP に依存しているため、ATP 産生系 (解糖系、電子伝達系) の変化がアポトーシス増強に関与していることが予想される。そこで、ミトコンドリア活性の調節系である AMPK - PGC-1 $\alpha$  を中心としたシグナル伝達系について解析した。リアルタイム

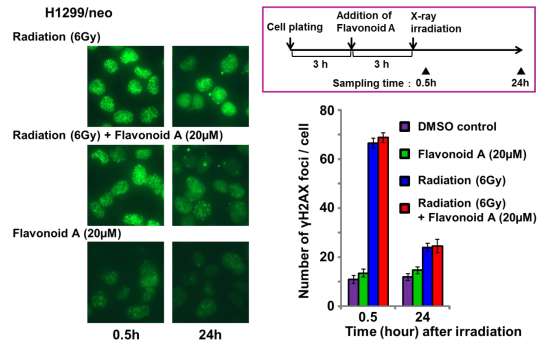
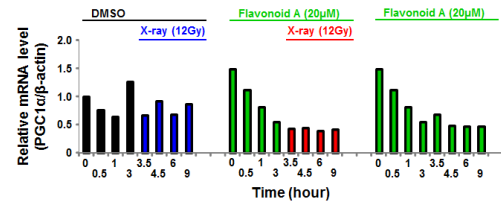
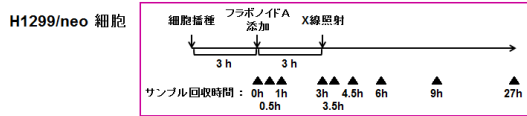


図 5 フラボノイド A の放射線誘導  $\gamma$ H2AX フォーカスに及ぼす影響。

#### A



#### B

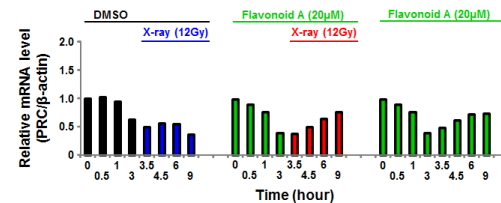
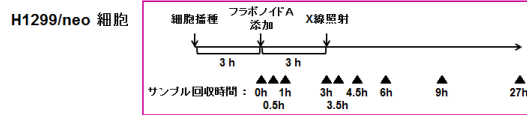


図 6 フラボノイド A 及び放射線の PGC-1a(A)、PRC(B) 発現に及ぼす影響。

PCR 法で PGC ファミリーの *PGC-1* (図 6A) と *PRC* (図 6B) の遺伝子発現について調べたところ、放射線単独では *PGC-1* 及び *PRC* 発現に変化は見られなかった。また、フラボノイド A 単独処理は、両者の発現に抑制傾向が見られた。一方、フラボノイド A 単独処理とフラボノイド A/放射線併用処理間では、これら遺伝子の発現に明瞭な違いは見られなかった。これらの結果から、フラボノイド A による放射線誘導アポトーシスの増強はミトコンドリア活性の調節系である AMPK - PGC-1 $\alpha$  によるものではないことが示唆された。

#### 4-3. 担がんヌードマウスによる放射線増感作用の検討

フラボノイド B について、X線 (2 Gy) 単独群と比較して併用処理群では有意差はないものの、腫瘍の増殖が抑制される傾向が確認された。フラボノイド A については、X線 (5 Gy) との併用処理による腫瘍増殖の抑制効果は確認されなかった。今回、高濃度のフラボノイドの調製法が難しかったため、今後、フラボノイドの至適濃度をさらに検討する必要がある。

#### 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 7 件)

Ohnishi K, Tani T, Bando S, Kubota N, Fujii Y, Hatano O, Harada H: Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. International Journal of Oncology, 査読有, in press.

Segawa T, Fujii Y, Tanaka A, Bando S, Okayasu R, Ohnishi K, Kubota N: Radiosensitization of human lung cancer cells by the novel purine scaffold Hsp90 inhibitor PI-H71. International Journal of Molecular Medicine, 査読有, 33, 559-564, 2014.

坂東真一, 秦野修, 窪田宜夫, 大西健, 植物由来天然生理活性物質フィトケミカルの放射線増感作用. 放射線生物研究, 査読有, 47, 193-210, 2012.

Ohara M, Kimura S, Tanaka A, Ohnishi K, Okayasu R. and Kubota N: Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation by inducing apoptosis. International Journal of Molecular Medicine, 査読有, 28, 1043-1047, 2011.

Fujita Y, Yamamoto N, Kato I, Iwai S, Ono K, Sakurai Y, Ohnishi K, Ohnishi T, Yura Y.: Induction of multinucleation in oral squamous cell carcinoma tissue with mutated p53 surviving boron neutron capture therapy. International Journal of Radiation Biology, 査読有, 87, 293-301, 2011.

Okamoto N, Takahashi A, Ota I, Ohnishi K, Mori E, Kondo N, Noda T, Nakagawa Y, Uemura H, Yane K, Hosoi H, Ohnishi

T.: siRNA Targeted for NBS1 enhances heat sensitivity in human anaplastic thyroid carcinoma cells. International Journal of Hyperthermia, 査読有, 27, 297-304, 2011.

Noda T, Takahashi A, Kondo N, Mori E, Okamoto N, Nakagawa Y, Ohnishi K, Zdzienicka, MZ, Thompson LH, Helleday T, Asada H, Ohnishi T.: Repair pathways independent of the Fanconi anemia nuclear core complex play a predominant role in mitigating formaldehyde-induced DNA damage. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 404, 206-210, 2011.

[学会発表] (計 16 件)

藤井義大, 坂東真一, 大西健, 加藤宝光: ヒト由来細胞とネコ由来細胞の放射線感受性の違い. 茨城大学理学部公開シンポジウム第 7 回 Quantum Medicine 研究会 (水戸) 2014 年 3 月

大西健, 谷俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野修: スフェロイドに出現する CD133 陽性細胞の放射線感受性. 第 16 回癌治療増感研究シンポジウム (奈良) 2014 年 2 月

谷俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野修, 大西健: スフェロイドの低酸素微小環境に依存した CD133 発現の可塑的变化. 第 11 回がんとハイポキシア研究会 (仙台) 2013 年 12 月

大西健, 谷俊明, 坂東真一, 秦野修, 藤井義大, 窪田宜夫: グリオブラストーマスフェロイド内低酸素微小環境と CD133 陽性細胞の誘導. 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月

大西健, 谷俊明, 坂東真一, 藤井義大, 窪田宜夫, 秦野修: 神経膠芽腫細胞 T98G の単層培養 スフェロイド培養間で見られる CD133 陽性細胞の可塑的な誘導. 日本放射線影響学会第 55 回大会 (青森) 2013 年 10 月

大西健, 坂東真一, 窪田宜夫, 秦野修, 谷俊明: スフェロイドを用いた CD133 陽性細胞の解析. 第 15 回癌治療増感研究シンポジウム (奈良) 2013 年 2 月

大西健, 坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫: フラボノイド 3',5,7-Trihydroxy-3,4'-Dimethoxyflavone に新規に見出されたがん細胞優位な細胞致死作用. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌) 2012 年 9 月  
坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫, 大西健: 植物由来フラボノイド A に新規に見出されたがん細胞優位な放射線増感作用. 第 71 回日本癌学会学術総会 (札

幌) 2012 年 9 月

坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫,  
大西健: フラボノイド A に新規に見出さ  
れた放射線増感の作用機序. 日本放射線  
影響学会 第 55 回大会(仙台)2012 年 9  
月

Bando S, Hatano O, Takemori H, Kubota  
N, Ohnishi K: Screening of  
phytochemicals sensitizing heat  
sensitivity of cancer cells. The 11th  
International Congress of  
Hyperthermic Oncology & The 29 th  
Japanese Congress of Thermal Medicine  
(ICHO&JCTM 2012) (京都) 2012 年 8 月

瀬川達矢, 田中彩, 坂東真一, 松本孔貴,  
岡安隆一, 大西健, 窪田宜夫: 新規 Hsp90  
阻害剤 PU-H71 の DNA 二重鎖切断修復抑制  
による放射線増感. 第 50 回日本放射線  
腫瘍学会 生物部会学術大会(宜野湾)  
2012 年 6 月

瀬川達矢, 田中彩, 坂東真一, 大西健,  
窪田宜夫: 新規 Hsp90 阻害剤 PU-H71 の  
放射線増感メカニズムについて. 第 14  
回癌治療増感研究シンポジウム(奈良)  
2012 年 2 月

坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫,  
大西健: フラボノイド THDF に新規に見出  
されたがん細胞優位な細胞致死作用. 第  
14 回癌治療増感研究シンポジウム(奈良)  
2012 年 2 月

瀬川達矢, 田中彩, 坂東真一, 大西健,  
窪田宜夫: Hsp90 阻害剤 Celastrol のヒ  
ト腫瘍細胞の放射線増感と p53 status.  
日本放射線腫瘍学会第 24 回大会(神戸)  
2011 年 11 月

坂東真一, 秦野修, 竹森洋, 窪田宜夫,  
大西健: 植物由来の新規放射線増感物質  
はがん細胞により強い増感作用を示す.  
日本放射線影響学会第 53 回大会(神戸)  
2011 年 11 月

Ohnishi K, Bando S, Kubota N, Takemori  
H, Hatano O: Screening of flavonoids  
sensitizing radiation sensitivity of  
cancer cells. 14th International  
Congress of Radiation Research.  
(Poland, Warsaw) 2011 年 8 月

[その他]

ホームページ等

[http://www.hs.ipu.ac.jp/files/Ohnishi/m  
ap\\_1.htm](http://www.hs.ipu.ac.jp/files/Ohnishi/map_1.htm)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大西健 (OHNISHI Ken)

茨城県立医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 50152195

### (2) 研究分担者

秦野修 (HATANO Osamu)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40164850