

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460908

研究課題名(和文)天然物成分の腫瘍組織環境制御による抗腫瘍効果とその作用機構

研究課題名(英文)Antitumor activities of various natural compounds isolated from medicinal plants through the regulation of tumor environment, and those mechanisms

研究代表者

木村 善行(Kimura, Yoshiyuki)

愛媛大学・医学系研究科・講師

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)：ジハイドロオキシクマリンの内、エスクレチンの抗腫瘍・抗転移効果は、腫瘍細胞のG1停止、腫瘍環境のM2マクロファージの分化過程の制御(Stat3のリン酸化の抑制)によることを示唆した。アシタバ根の成分Xanthoangelol、4-Hydroxyderricinもまた腫瘍環境、腫瘍関連マクロファージのM2マクロファージの分化・活性化の阻害を介して抗腫瘍・抗転移活性を示した。Resveratrolおよび関連合成Dihydroxystilbene類もまた、腫瘍環境M2マクロファージの分化・活性化阻害によるリンパ管新生の抑制を介して抗腫瘍・抗転移効果を有していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：It is suggested that the antitumor and antimetastatic actions of esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) among dihydroxycoumarins may be due to the regulated activation of tumor-associated macrophage (TAM) by M2 macrophage differentiation (inhibition of phosphorylation of Stat3) in the tumor microenvironment and/or G1 arrest in tumor cells. Xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from Angelica keiskei root might be also attributed to the regulated activated TAM through the inhibition of activation (monocyte chemoattractant protein-1 production) and differentiation (inhibition of phosphorylation of Stat3) of M2 macrophages in the tumor microenvironment. The antitumor and antimetastatic action to lung by resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) and the related synthetic dihydroxystilbenes (2,3-, 3,5- and 4,4'-dihydroxystilbene) were partly due to antilymphangiogenesis through the regulation of M2 macrophage activation and differentiation in TAMs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 植物成分 薬理学 生理活性 生体分子

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。さらに、従来の癌化学療法剤と同様に神経損傷による疼痛の感受性や味覚障害を引き起こし、Quality of Life (QOL)を悪化させている。癌治療は手術後の癌再発や転移を防止することが究極の課題である。

(2) 癌再発や転移は、腫瘍組織の増大と共に、腫瘍組織周辺に集積する Macrophage (Tumor-Associated Macrophage; TAM)から産生する Cytokine, Chemokine, Growth Factor や Metalloproteinase ががん増殖や転移に関与していることが明らかになり、腫瘍組織への TAM の活性化を制御することが新たな癌治療の発展に寄与でき、副作用の少ない薬剤の開発につながる。

(3) 腫瘍組織周辺に集積する TAM は Type 2 Macrophage であり、Type 1 Macrophage のように免疫機能活性化による癌増殖を抑制せず、むしろ、免疫抑制を誘導し、腫瘍の増殖を促進している。このことから、M2 型 TAM への分化を抑制する薬剤の探索もまた、新たな癌治療薬の開発となる。

(4) 和漢薬には、免疫機能活性化による抗腫瘍効果や癌化学療法剤の副作用防止効果が期待されている。本研究では、伝統薬物から単離した成分の抗腫瘍・抗転移効果を検討すると共に、M2 型 Macrophage の関与およびリンパ管新生の関係を明らかにする

2. 研究の目的

(1) 腫瘍本体の増殖を抑制する一方、腫瘍を取り巻く環境を制御することによる腫瘍耐性の出現、再発や転移を抑制することである。

(2) 腫瘍環境を標的とする場合、Tumor-Associated Macrophage (TAM)に関与する M2 型 Macrophage の分化過程の制御および M2 型 Macrophage の活性化によるサイトカイン類の産生の抑制を伝統薬物成分から単離した化合物で候補化合物を探索する。

(3) TAM の活性化は血管新生やリンパ管新生と深く関与し、癌再発や転移を引き起こしている可能性がある。そこで、伝統薬物から単離した化合物のリンパ管新生抑制作用を探索する。

(4) 以上の実験結果に基づいて、高腫瘍転移株の移植マウスでの伝統薬物成分の抗腫瘍・抗転移効果を明確にし、その作用機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) TAM 中の M2 Macrophage の分化阻害および腫瘍細胞の G1 Arrest を介した抗腫瘍・抗転移効果：セリ科植物中に含有される 3 種類

の Dihydroxycoumarin, Esculetin, Fraxetin および Daphnetin の高転移腫瘍株 LM8 移植マウスでの抗腫瘍・抗転移効果を検討し、さらに M2 Macrophage の分化、LM8 細胞の細胞周期に及ぼす影響を検討する。

(2) M2 Macrophage 分化阻害および活性化阻害による抗腫瘍・抗転移効果：セリ科アシタバ *Angelica keiskei* 根から単離した 2 種類のカルコン誘導体 Xanthoangelol および 4-hydroxyderricin の LM8 腫瘍細胞移植マウスでの抗腫瘍・抗転移効果および腫瘍組織中の Macrophage 発現を検討し (*In Vivo*)、M2 Macrophage の分化過程および活性化に及ぼす影響 (*In Vitro*) を検討する。

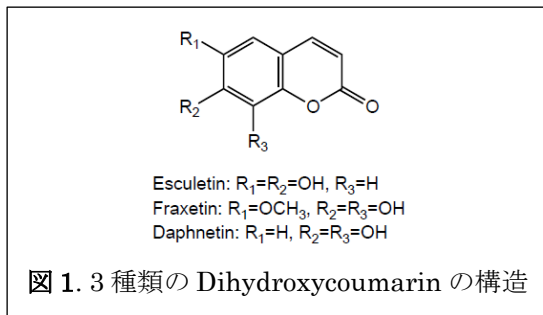
(3) リンパ管新生、M2 Macrophage 分化・活性化阻害を介した抗腫瘍・抗転移効果：タデ科イタドリ *Polygonum cuspidatum* 根から単離した Resveratrol および関連合成化合物の LM8 移植マウスでの抗腫瘍・抗転移、腫瘍組織中のリンパ管新生 (*In Vivo*)、リンパ管新生、M2 Macrophage の分化および活性化に及ぼす影響 (*In Vitro*) を検討する。

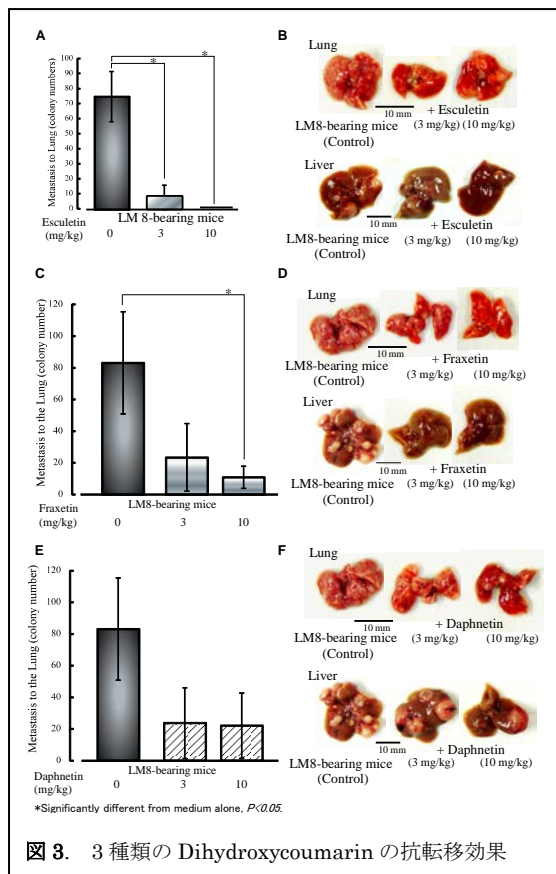
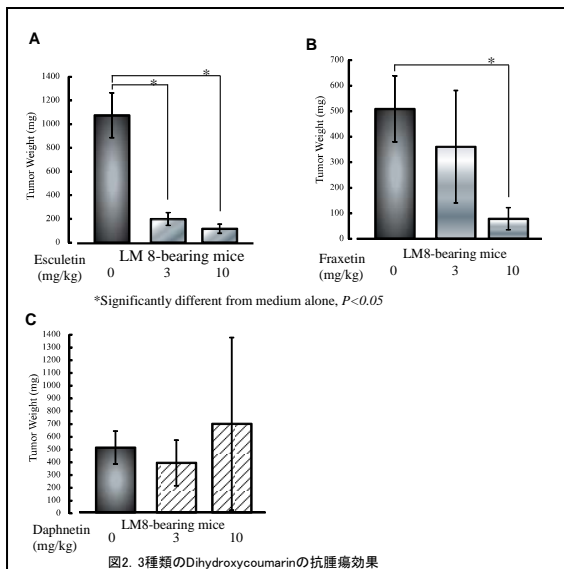
4. 研究成果

伝統薬物には抗腫瘍効果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り、本研究では、①多くの薬草中の含有される Dihydroxycoumarin 類の腫瘍細胞での細胞周期や M2 Macrophage 分化に対する影響および抗腫瘍・抗転移効果、②アシタバ (*Angelica keiskei* roots) から単離した主成分 Xanthoangelol および 4-Hydroxyderricin の M2 Macrophage 分化・活性化阻害による抗腫瘍・抗転移効果および③タデ科植物のイタドリ根 (*Polygonum cuspidatum* roots) から単離した Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilbene) および合成した Stilbene 類のリンパ管新生阻害、M2 Macrophage 分化・活性化阻害による抗腫瘍・抗転移効果を検討した。以下にその研究成果を順次報告する。

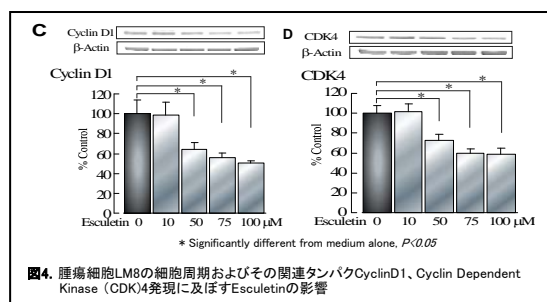
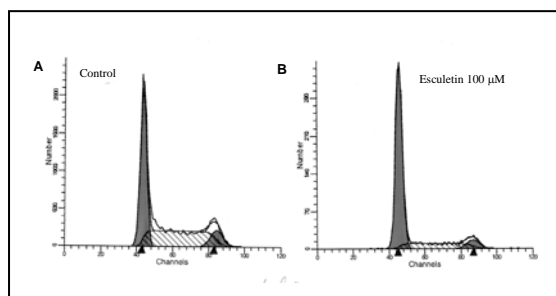
(1) 高転移腫瘍細胞 LM8 移植マウスにおける Dihydroxycoumarin 類の抗腫瘍・抗転移効果：

Esculetin, Fraxetin および Daphnetin (図 1) の LM8 腫瘍細胞移植マウスでの 35 日間の投与によって、Esculetin および Fraxetin に抗腫瘍・抗転移効果が認められ、Daphnetin には抗腫瘍・抗転移効果が認められなかった (図 2 および図 3)。

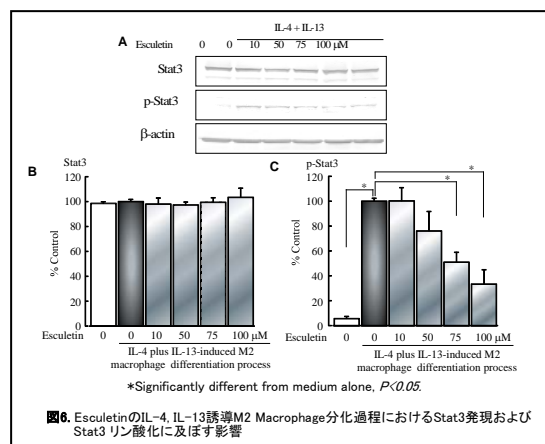
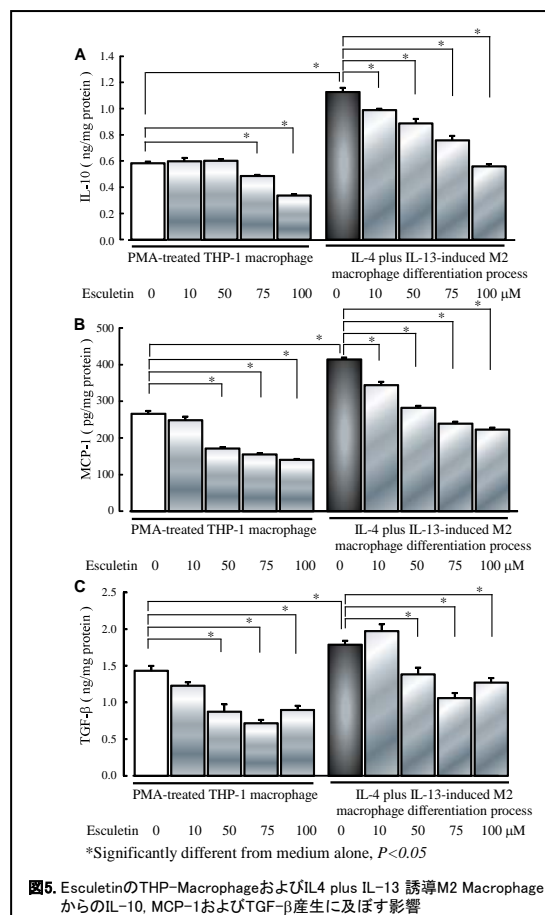




3種類のDihydroxycoumarinの内Esculetinに強い腫瘍増殖能を抑制し、細胞周期もCyclin D1およびCDK4抑制によるG1 Arrestであった(図4)。



Tumor-associated macrophage (TAM)はM2 Macrophageであると報告されている。EsculetinのPMA処理したTHP-1 MacrophageとIL-4 + IL-13処理したM2 MacrophageからのIL-10, MCP-1およびTGF- β の産生に及ぼす影響を検討した結果、Esculetinは両者のMacrophageからの産生を抑制した(図5)。

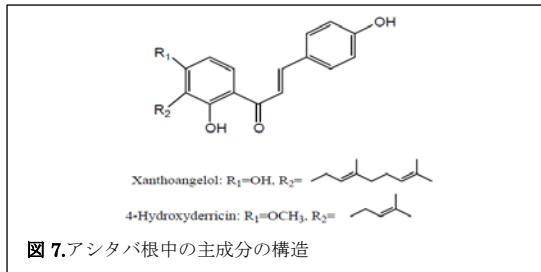


Macrophage 分化過程における Stat3 タンパクのリン酸化を阻害した(図 6)。

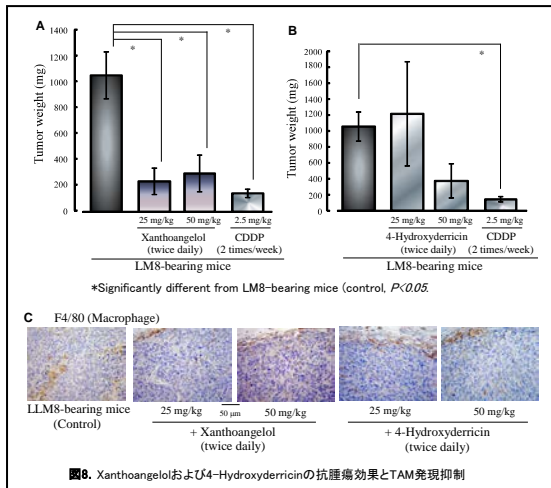
これらの事実から、Esculetin の抗腫瘍・抗転移効果は、腫瘍細胞の G1 Arrest を有すると共に、腫瘍環境中の M2 Macrophage の分化過程の制御を介していることを示唆した。

(2) アシタバ根(*Angelica keiskei* roots)中の Xanthoangelol および 4-Hydroxyderricin の抗腫瘍・抗転移効果:

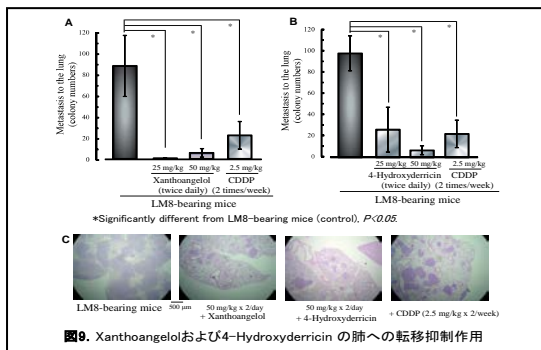
Xanthoangelol、4-Hydroxyderricin (図 7) はアシタバ中の主成分であり、種々の薬理作用が報告されている。本研究では、上記 2 成分の抗腫瘍・抗転移効果を検討した。



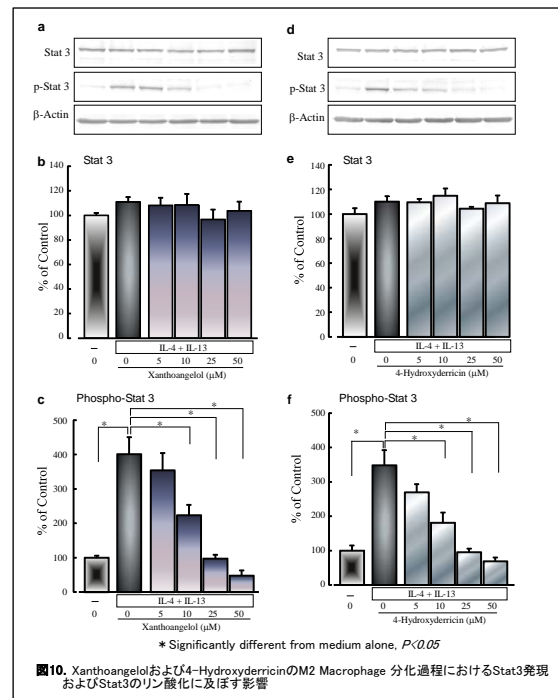
LM8 腫瘍細胞移植マウスでの Xanthoangelol および 4-Hydroxyderricin の 31 日間の投与において、抗腫瘍作用が認められ、腫瘍組織中の Macrophage の発現を抑制した(図 8)。



更に、上記の 2 種類のカルコン類は、肺への転移を強く抑制した(図 9)。



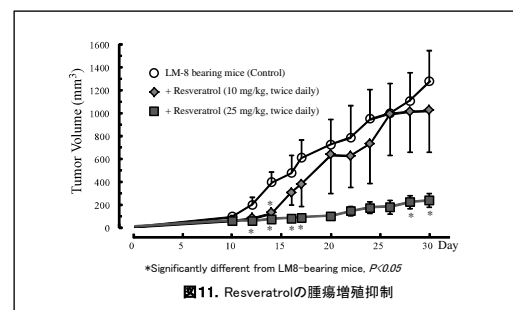
Xanthoangelol および 4-Hydroxyderricin は、IL-4 および IL-13 誘導による M2 Macrophage 分化過程における Stat3 のリン酸化を阻害した(図 10)。



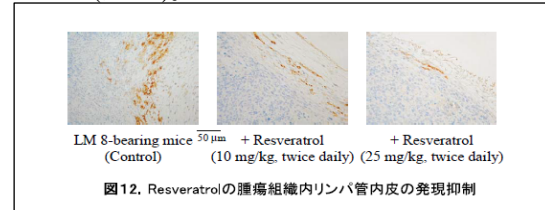
以上の実験事実から、Xanthoangelol および 4-Hydroxyderricin の抗腫瘍・抗転移効果は TAM 中の M2 Macrophage の分化阻害を介している可能性を示唆した。

(3) イタドリ根(*Polygonum cuspidatum* root)から単離した Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) の抗腫瘍・抗転移効果:

我々は、Resveratrol が腫瘍細胞の Apoptosis および G2/M Arrest と共に腫瘍血管新生の抑制による抗腫瘍効果を報告した。本実験では、腫瘍環境制御による抗腫瘍・抗転移効果を検討した。LM8 腫瘍細胞移植マウスを用いて、Resveratrol(25mg/kg)を 30 日間連日投与した結果、癌増殖が抑制された(図 11)。



腫瘍組織中のリンパ管内皮の発現も抑制された(図 12)。



更に、Resveratrol は肺への転移も抑制した(図 13)。

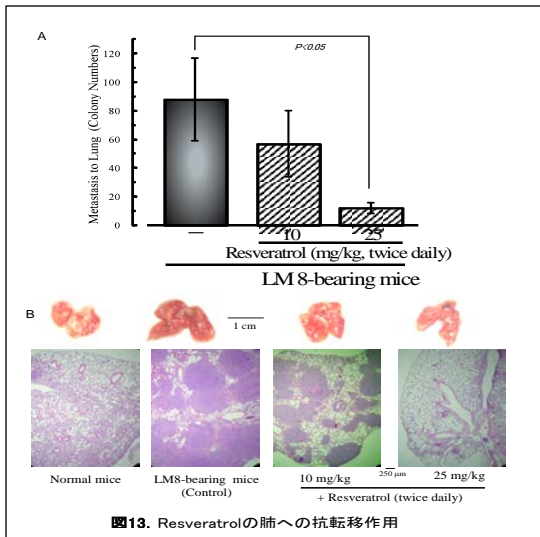


図13. Resveratrolの肺への抗転移作用

M2 Macrophage 分化過程での Resveratrol と反応させた Condition Medium (CM)は、ヒトリンパ管内皮細胞のリンパ管新生を抑制し(図 14)、Resveratrol は Stat3 のリン酸化を抑制した。

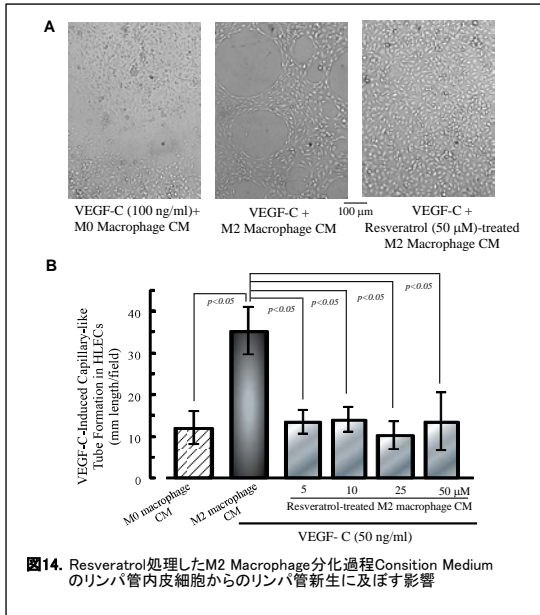


図14. Resveratrol処理したM2 Macrophage分化過程Condition Mediumのリンパ管内皮細胞からのリンパ管新生に及ぼす影響

以上の事実から、Resveratrol の抗腫瘍・抗転移効果は、M2 Macrophage 分化抑制を介した腫瘍誘導リンパ管新生に抑制することが示唆された。

(4) 合成 Stilbene 類の抗腫瘍・抗転移効果：Resveratrol に腫瘍環境制御による抗腫瘍・抗転移効果が認められたので、合成した Stilbene 類 (図 15) の腫瘍環境制御による抗腫瘍・抗転移効果検討した。

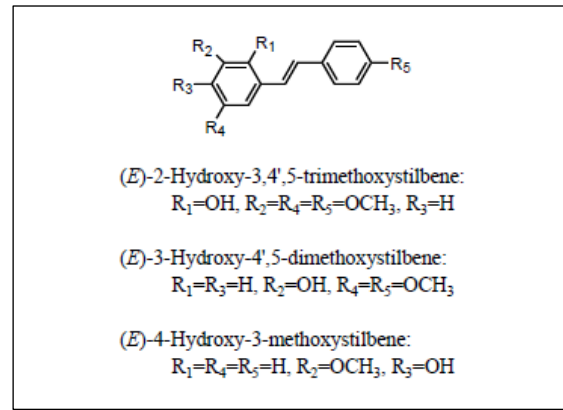
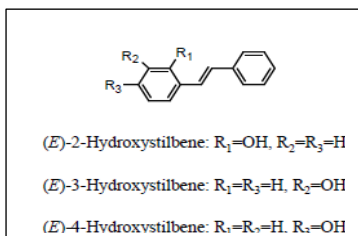


図 15. 合成 Stilbene 類の構造

9 種類の合成 Stilbene の M2 Macrophage 分化後の MCP-1 産生に及ぼす影響を検討した結果、3 種類の Dihydroxystilbene に強い阻害活性が認められた(Table 1)。

Table 1. Effects of nine synthetic stilbenes on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) production in M2-polarized THP-1 macrophages.

Stilbene (50 μM)	MCP-production (pg/mg protein)(%)
None (medium alone)	241.3±4.2(100)
2-OH Stilbene	251.2±5.1(104.1)
3-OH Stilbene	265.3±7.3(109.9)
4-OH Stilbene	227.3±3.9(94.2)
2-OH-3,4',5-Trimethoxy Stilbene	233.2±10.4(96.6)
3-OH,4',5-Dimethoxy Stilbene	216.9±11.5(89.9)
4-OH-3-Methoxy Stilbene	244.1±4.8(101.2)
2,3-DiOH Stilbene	164.6±2.5(68.2)
3,4-DiOH Stilbene	141.6±3.6(58.7)
4,4'-DiOH Stilbene	105.2±3.1(43.6)

Values are the mean±SE of three experiments.

3 種類の Dihydroxystilbene は M2 Macrophage の分化における Stat3 のリン酸化を抑制した(図 16)。

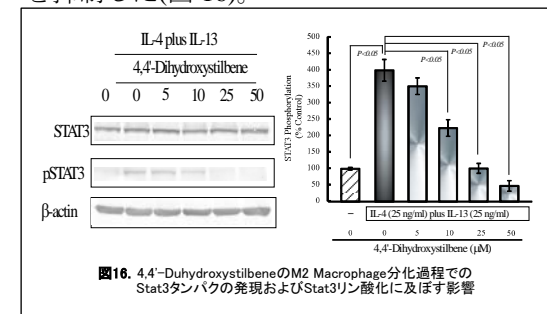


図16. 4,4'-DihydroxystilbeneのM2 Macrophage分化過程でのStat3タンパクの発現およびStat3リン酸化に及ぼす影響

更に、3種類の Dihydroxystilbene は VEGF-C 誘導によるリンパ管内皮細胞からリンパ管腔形成(リンパ管新生)を抑制した(図 17)。

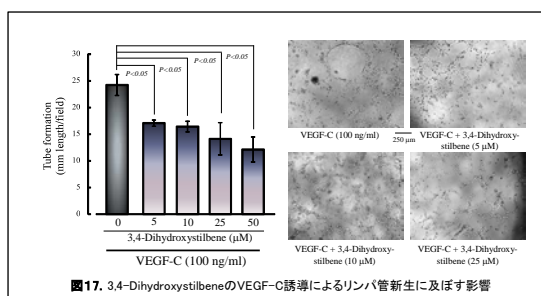


図17. 3,4-DihydroxystilbeneのVEGF-C誘導によるリンパ管新生に及ぼす影響

3種類の Dihydroxystilbene は、高転移腫瘍株 LM8 移植マウスにおいて、顕著な抗腫瘍・抗転移効果を示した(図 18 および図 19)。

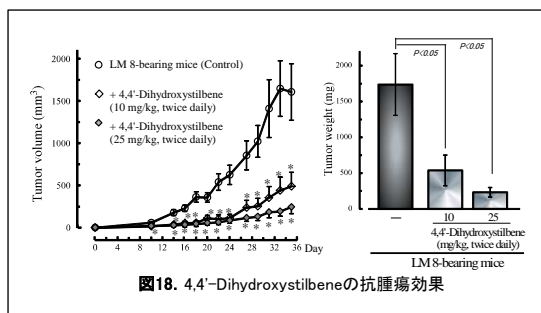


図18. 4,4'-Dihydroxystilbeneの抗腫瘍効果

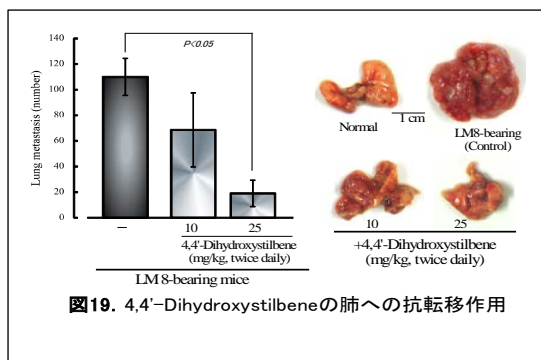


図19. 4,4'-Dihydroxystilbeneの肺への抗転移作用

以上の実験事実から、3種類の Dihydroxystilbene (2,3-, 3,4-, および 4,4'-Dihydroxystilbene)に強い抗腫瘍・抗転移効果が認められ、その作用機構として、腫瘍環境の一つである Tumor-Associated Macrophage (TAM)中の M2 Macrophage の分化阻害および活性化阻害を介したリンパ管新生の阻害作用が関与している可能性が示唆された。

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 4 件)

- (1) Kimura Y, Sumiyoshi M, Baba K. Antitumor and antimetastatic activity of synthetic hydroxystilbenes through inhibition of lymphangiogenesis and M2 macrophage differentiation of tumor-associated macrophages. *Anticancer Res.* 36: 137-148 (2016). 査読有
- (2) Kimura Y, Sumiyoshi M. Resveratrol

prevents tumor growth and metastasis by inhibiting lymphangiogenesis and M2 macrophage activation and differentiation in tumor-associated macrophages. *Nutrition and Cancer* 68: 667-678 (2016). 査読有

- (3) Sumiyoshi M, Taniguchi M, Baba K, Kimura Y. Antitumor and antimetastatic actions of xanthoangelol and 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* roots through the inhibited activation and differentiation of M2 macrophages. *Phytomedicine* 22: 759-767 (2015). 査読有

- (4) Kimura Y, Sumiyoshi M. Antitumor and antimetastatic actions of dihydroxycoumarins (esculetin or fraxetin) through the inhibition of M2 macrophage differentiation in tumor-associated macrophages and/or G1 arrest in tumor cells. *Eur. J. Pharmacol.* 746: 115-125 (2015). 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 善行 (Kimura, Yoshiyuki)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20294796

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

住吉真帆 (Sumiyoshi Maho)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60444767