

# 博士学位論文

新規 NIK 阻害剤 mangiferin の  
細胞死誘導効果及びその機序の解明

平成 29 年 5 月 22 日

武田 朋也

## 序論

がんは様々なシグナル伝達を活性化させることで増殖、生存及び転移を促進する。これらのシグナル伝達因子のうち、nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)は肺がん、大腸がん、胃がんなどの様々な癌種において活性化していることが報告されており [1]、この活性化ががんの発症及び進展に深く関与することが知られている。

NF- $\kappa$ B は p65 (RelA)、RelB、c-Rel、NF- $\kappa$ B1 (p50/p105)及び NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) から構成される転写因子で、通常 inhibitor kappa B (I $\kappa$ B)と結合し、不活性型として細胞質に存在する [2, 3]。そこに、上流からの刺激が加わると、I $\kappa$ B は分解され、NF- $\kappa$ B は核内へ移行し標的遺伝子の発現を制御する。また、I $\kappa$ B の分解には NF- $\kappa$ B-inducing kinase (NIK)や I $\kappa$ B kinase (IKK)が重要な役割を担う。NF- $\kappa$ B の活性化は細胞の生存や増殖に関与する遺伝子群の転写を促進し、がんの進行を亢進することが知られている [4, 5]。また、NF- $\kappa$ B 阻害剤は造血器腫瘍の増殖を抑え、さらに抗がん剤に対する感受性を高めることが示されている [6]。このことは、NF- $\kappa$ B 経路ががん治療の有望なターゲット分子であり、この経路を遮断する薬剤の開発が求められている。

がん患者の予後を低下させる要因として転移が挙げられ、転移は多段階の複雑な過程を経て成立する。この過程において、がん細胞における表現系の変化が必要となり、がん細胞の遊走活性の上昇、血管内への浸潤、血管内壁への接着、転移組織における増殖が重要である。浸潤過程では、がん細胞が発現するタンパク分解酵素である matrix metalloproteinase (MMPs)が重要な役割を担う。MMPs は基底膜を含む細胞外基質の分解に働く酵素で、進行性悪性腫瘍において MMPs の高発現が報告されている [7]。また、接着も重要な転移過程の一つで

あり、very late antigens (VLAs)ががん細胞と細胞外基質の接着に関与している [8]。そのため、MMPs 及び VLAs を抑制することが転移抑制において重要であると考えられる。シグナル伝達因子の活性化も転移に関与することが知られており、特に NF- $\kappa$ B はがんの悪性度と相関するとの報告 [9]や、MMPs 及び VLAs の発現を制御することが示されている [10, 11, 12]。そのため、NF- $\kappa$ B 経路を抑制する薬剤は転移抑制に有効であると考えられる。

Mangiferin は *Mangifera indica* L.などに含まれる成分で、抗炎症作用、抗酸化作用、免疫調節作用などが報告されている [13, 14]。当研究室において、mangiferin が造血器腫瘍に対して細胞死を誘導することを認めている [15]。しかし、mangiferin がどのようなメカニズムで造血器腫瘍に対して細胞死を誘導しているかは不明である。

第 1 章では mangiferin の細胞死誘導機序について検討した。第 2 章では mangiferin と抗がん剤併用による細胞死誘導効果の増強及びその機序の解明を試みた。第 3 章では in vivo における mangiferin の転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果について評価した。

以下に本検討の内容を詳述する。

# 第 1 章

## Mangiferin の細胞死誘導機構の解析

### I. 緒言

NF- $\kappa$ B は炎症免疫応答関連因子、アポトーシス抑制因子、細胞増殖促進因子などの発現を誘導することで、炎症反応、免疫応答、細胞分化や増殖といった様々な生命現象に関与している [16]。そのため、NF- $\kappa$ B 経路の異常は悪性腫瘍をはじめとする炎症性疾患、自己免疫疾患などの病態の発症と維持に関与する [17]。

NF- $\kappa$ B は I $\kappa$ B と複合体を形成することで活性が抑制されており [18]、この活性化には NIK が重要な役割を果たしている [19]。通常、NIK は cIAP/TRAF2/TRAF3 複合体によって分解を受けているが、lipopolysaccharide (LPS)、CD40 ligand 等の上流からの刺激によって TRAF3 が分解され、NIK が安定化することで下流の IKK をリン酸化する。さらに、活性化した IKK により I $\kappa$ B はリン酸化を受け、プロテアソームにより分解されることで NF- $\kappa$ B は核に移行し、がん細胞の生存、増殖に関与する遺伝子群の転写を誘導する [20]。そのため、NF- $\kappa$ B 経路を標的とした治療薬の開発ががん治療において有効であると考えられる。

現在臨床応用されている NF- $\kappa$ B 経路を阻害する薬剤として bortezomib がある。Bortezomib は多発性骨髄腫治療のファーストラインで使用される薬剤であり、プロテアソームを阻害することにより、I $\kappa$ B の発現を安定化し NF- $\kappa$ B の核移行

を抑制する [21]。しかし、著効を示すのは多発性骨髄腫患者の 3 分の 1 であり [22]、異なる分子機構で NF- $\kappa$ B 経路を阻害する薬剤の開発が重要である。

Mangiferin は天然に存在するポリフェノールであり、Anacardiaceae 科や Gentianaceae 科などの植物に多く含まれる [23]。近年、mangiferin は血糖降下作用や肝臓保護作用を有することが明らかにされており [24]、当研究室においても、mangiferin が造血器腫瘍に対して細胞死を誘導することを認めている [15]。しかし、mangiferin がどのようなメカニズムで造血器腫瘍に対して細胞死を誘導しているかは不明である。そこで本章では、多発性骨髄腫細胞株における mangiferin の細胞死誘導機序について検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試薬の調製

Mangiferin (Sigma, MN, USA)は dimethyl sulfoxide (DMSO)に 100 mM となるように溶解後、0.45  $\mu$ m のシリンジフィルター (Iwaki Glass, Tokyo, Japan)でろ過滅菌したものを使用した。

### 2. 細胞培養

ヒト多発性骨髄腫細胞株である IM9 細胞、RPMI8226 細胞及び ARH-77 細胞、ヒト正常 B 細胞である RPMI1788 細胞を使用した。各種細胞は、25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; Wako, Osaka, Japan)、100  $\mu$ g/mL penicillin (Gibco, CA, USA)、100 U/mL streptomycin (Gibco)、及び 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco)を含む RPMI1640 (Sigma)培養液にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### **3. Trypan blue exclusion assay**

各種細胞を 96 well プレートに播種し、mangiferin を添加した。また、control として未添加の細胞、vehicle として 0.1% DMSO 添加の細胞を用意した。1 日間、3 日間、5 日間培養後の生存率を trypan blue exclusion assay により測定した。

### **4. Western blotting**

Mangiferin を添加した IM9 細胞に cell lysis buffer を加え、遠心分離した後、その上清を細胞質分画タンパクの sample とした。細胞質分画回収後のペレットを cell lysis buffer without NP-40 で洗浄した。洗浄後のペレットに nuclear lysis buffer を添加した。その後、遠心分離し、その上清を細胞核分画タンパクの sample とした。タンパク定量は BCA Protein Assay (PIERCE, IL, USA)にて行った。Sample は SDS-PAGE にて泳動し、PVDF membrane (Amersham Biosciences, IL, USA)にタンパクを転写した。この membrane は 3% スキムミルクを含む Tris-buffered saline (TBS; 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl)でブロッキングを行い、目的とするタンパクに特異的な一次抗体を反応させた。反応後、TBS で洗浄し、horseradish peroxidase (HRP)で標識した二次抗体と反応させた。次いで、Luminata Forte Western HRP 基質 (Merck Millipore, MA, USA)を用いて反応させ、タンパク質を検出した。

### **5. Annexin 染色**

Mangiferin を添加した IM9 細胞を回収し、Muse™ Annexin V and dead cell reagent を加えた。反応後、Muse Cell Analyzer (Merck Millipore)により Annexin 陽性細胞数を測定した。

## 6. Caspase-3 活性の測定

Mangiferin を添加した IM9 細胞を回収し、cell lysis buffer を添加した。その後、遠心分離し、上清を sample とした。Sample を Reaction Buffer と混和し、1 mM DEVD-APC 基質を加え、インキュベートした。反応後、その蛍光強度を蛍光分光光度計（励起光 400nm、蛍光 505nm）により測定した。

## 7. ミトコンドリア膜電位の測定

Mangiferin を添加した IM9 細胞を回収し、Mitopotential dye working solution を加え、インキュベートした。その後、Muse Mito Potential 7-AAD dye を添加し、Muse Cell Analyzer (Merck Millipore)によりミトコンドリア膜電位の低下した細胞数を測定した。

## 8. Small interfering RNA (siRNA) transfection

NIK の RNA サイレンシングには、Stealth siRNA (Invitrogen, CA, USA)を用いた。また、negative control として Stealth RNAi Negative Control Duplexes (Invitrogen) を用いた。Stealth siRNA 及び Lipofectamine 3000 (Invitrogen)をそれぞれ無血清培地で希釈し、インキュベートした。その後、両者を混合し、インキュベートしたものを transfection 複合体とした。無血清培地に置き換えた IM9 細胞に、複合体を添加し transfection を行った。Stealth siRNA の終濃度は 20 nM とした。

## 9. 統計学的解析

上記の方法により得られた結果は平均値 ± 標準偏差で示した。また、各群の検定には ANOVA with Dunnett により解析し、 $p < 0.05$  のとき有意差があるとした。

### III. 結果

#### 1. Mangiferin 添加時の細胞死誘導効果の検討

ヒト多発性骨髄腫細胞株である IM9 細胞、RPMI8226 細胞及び ARH-77 細胞とヒト正常 B 細胞である RPMI1788 細胞の mangiferin 添加時の生存率を測定した。3 日後の IM9 細胞の生存率は、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加時において、それぞれ 87.0%、66.3%、53.6%、50.9%、16.2%、5 日後の生存率は 76.5%、46.1%、32.9%、23.5%、9.4%であった(Fig. 1A)。また、RPMI8226 細胞及び ARH-77 細胞においても、mangiferin 添加により濃度依存的な細胞死の誘導を認めた (Fig. 1B and C)。しかし、RPMI1788 細胞では mangiferin 添加による細胞死の誘導は認めなかった (Fig. 1D)。この結果より、mangiferin は多発性骨髄腫細胞株に対して細胞死を誘導することが示唆された。

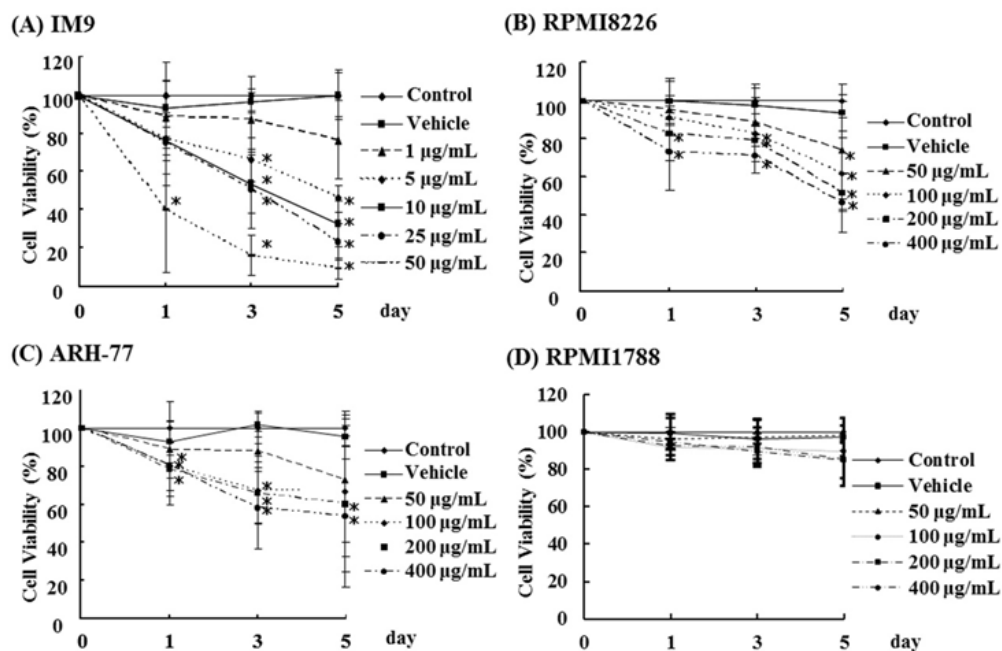


Fig. 1. Mangiferin decreases the cell viability of multiple myeloma (MM) cell lines. (A) IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (1-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or without mangiferin (Control). (B, C, D) RPMI8226, ARH-77, and RPMI1788 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (50-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), or without mangiferin (Control). Then, trypan blue exclusion assay was performed in all cells after 1, 3, and 5 days. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three experiments performed in triplicate. \*  $p < 0.05$  compared with control.



## 2. Mangiferin 添加時の Annexin 陽性細胞数、Caspase-3 活性及びミトコンドリア膜電位の検討

Mangiferin により誘導される細胞死がアポトーシスであるか明らかにするため、Annexin 陽性細胞数、Caspase-3 活性及びミトコンドリア膜電位について検討した。その結果、mangiferin 投与により Annexin 陽性細胞数の増加、caspase-3 の活性化及びミトコンドリア膜電位の低下した細胞数の増加が確認された (Fig. 2)。このことから、mangiferin により誘導される細胞死はアポトーシスであることが示唆された。

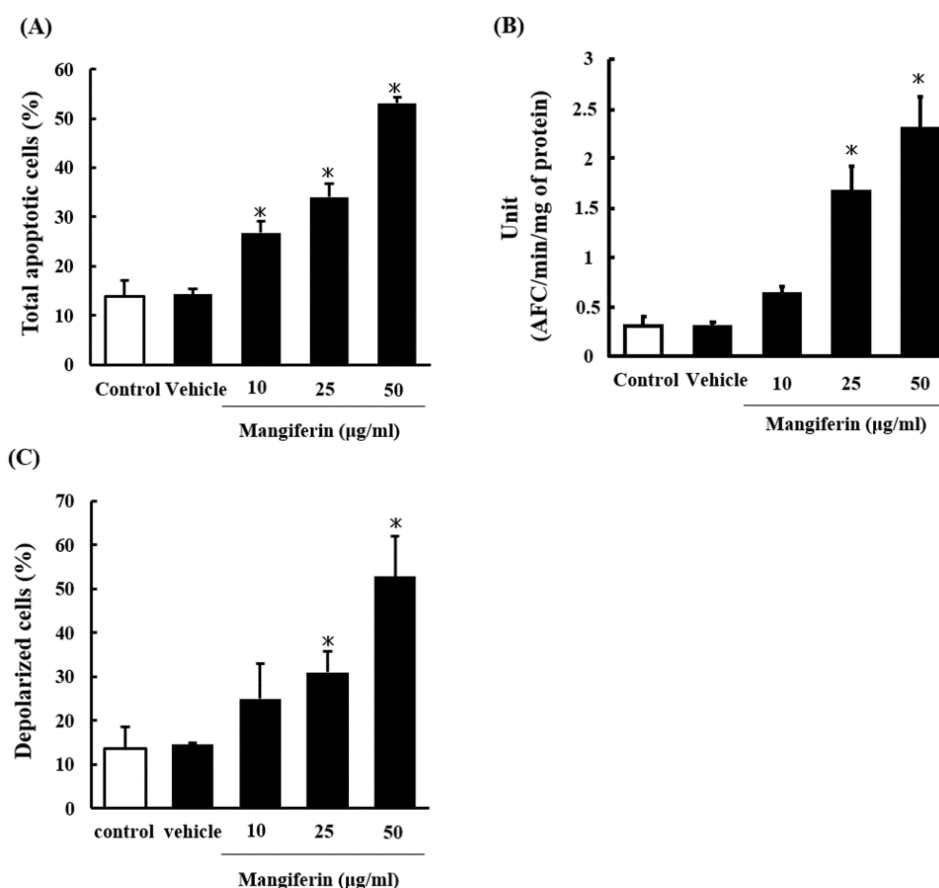


Fig. 2. Mangiferin induces apoptosis, activates caspase-3, and decreases the mitochondrial membrane potential. (A) IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (10-50 µg/ml), or without mangiferin (Control) for 2 days. The number of apoptotic cells in IM9 cells was examined using the Muse™ Annexin-V and Dead Cell Assay kit. (B) IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (10-50 µg/ml), or without mangiferin (Control) for 36 h. The activity of caspase-3 induced by mangiferin in IM9 cells was examined using the caspase-3/ CPP32 fluorometric assay kit. (C) IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (10-50 µg/ml) or without mangiferin (Control) for 2 days. The mitochondrial membrane potential in IM9 cells was investigated using the Muse™ Mitopotential Assay kit. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of four experiments. \* p < 0.05 compared with control.

### 3. Mangiferin 添加時の生存シグナルの活性動態の検討

Mangiferin により誘導される細胞死の機序を明らかにするため、細胞の生存や増殖に関与するシグナル伝達因子の活性動態を western blotting により検討した。その結果、NF- $\kappa$ B の核内での発現低下及び細胞質での発現増加が認められた (Fig. 3)。しかし、ERK1/2、JNK1/2、mTOR の活性動態については変化を認めなかった。このことから、mangiferin により誘導されるアポトーシスは NF- $\kappa$ B の核移行阻害により引き起こされることが示唆された。

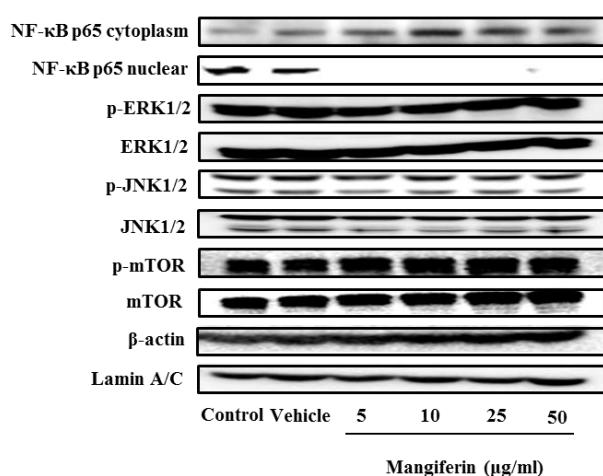


Fig. 3. Mangiferin inhibits the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (5-50  $\mu$ g/ml), or without mangiferin (Control) for 2 days. The expression of NF- $\kappa$ B, p-ERK1/2, p-JNK1/2, and p-mTOR were detected using western blotting. The expression of ERK1/2, JNK1/2, mTOR, Lamin A/C, and  $\beta$ -actin were used as internal controls.

### 4. Mangiferin 添加時の NF- $\kappa$ B 経路の活性動態の検討

Mangiferin の NF- $\kappa$ B 核移行抑制機序を明らかにするため、NF- $\kappa$ B の上流シグナル伝達因子である NIK、IKK 及び I $\kappa$ B の活性動態を western blotting により検討した。その結果、NIK、IKK、I $\kappa$ B の活性低下及び I $\kappa$ B の発現増加を認めた (Fig.4)。このことから、mangiferin は NIK を抑制することで、NF- $\kappa$ B の核移行を阻害することが示唆された。

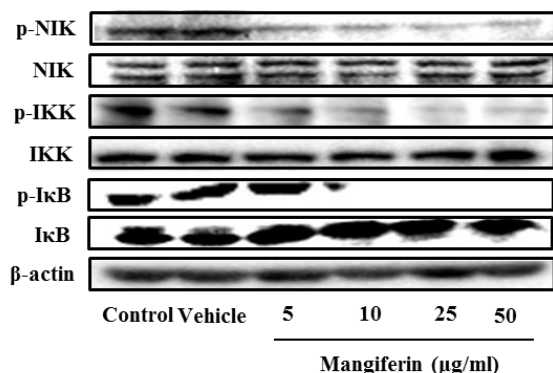
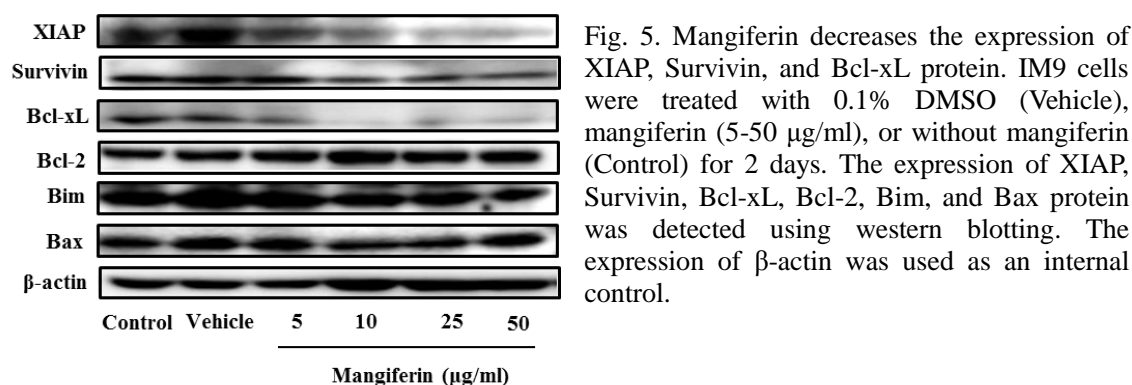


Fig. 4. Mangiferin suppresses the phosphorylation of NIK, IKK and I $\kappa$ B. IM9 cells were treated with 0.1% DMSO (Vehicle), mangiferin (5-50  $\mu$ g/ml), or without mangiferin (Control) for 2 days. The expression of p-NIK, p-IKK, p-I $\kappa$ B and I $\kappa$ B were detected using western blotting. The expression of total NIK, IKK and  $\beta$ -actin were used as an internal control.

## 5. Mangiferin 添加時のアポトーシス関連因子の発現動態の検討

NF- $\kappa$ B は Bcl-2 ファミリー (Bcl-xL, Bcl-2, Bim, Bax) や IAP ファミリー (XIAP, Survivin) などのアポトーシス関連因子の発現を制御することが知られている。そこで、mangiferin 添加時でのアポトーシス関連因子の発現動態を western blotting により検討した。その結果、XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現低下が認められた。しかし、Bcl-2、Bim、Bax については変化が認められなかった (Fig. 5)。このことから、mangiferin により誘導されるアポトーシスは XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現低下により引き起こされる可能性が示唆された。



## 6. NIK siRNA 処理した多発性骨髄腫細胞株における細胞死誘導効果、NF- $\kappa$ B 経路の活性動態及びアポトーシス関連因子の発現動態の検討

上記検討結果から、mangiferin により誘導されるアポトーシスは NIK の抑制が要因であると考えられる。そこで、NIK の抑制が多発性骨髄腫細胞株の細胞死に重要であるか明らかにするため、NIK siRNA 処理した IM9 細胞の生存率及び Annexin 陽性細胞数について検討した。その結果、NIK siRNA 処理により細胞生存率の低下と Annexin 陽性細胞数の増加を認めた (Fig. 6A and B)。次に、NIK siRNA 処理した IM9 細胞における NF- $\kappa$ B 経路の活性動態及びアポトーシス関連因子の発現動態を western blotting により検討したところ、IKK、I $\kappa$ B の活性低下、NF- $\kappa$ B の核移行阻害及び XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現低下を認めた (Fig. 6C)。これらの結果から、mangiferin により誘導されるアポトーシスは NIK の抑制により引き起こされることが示唆された。

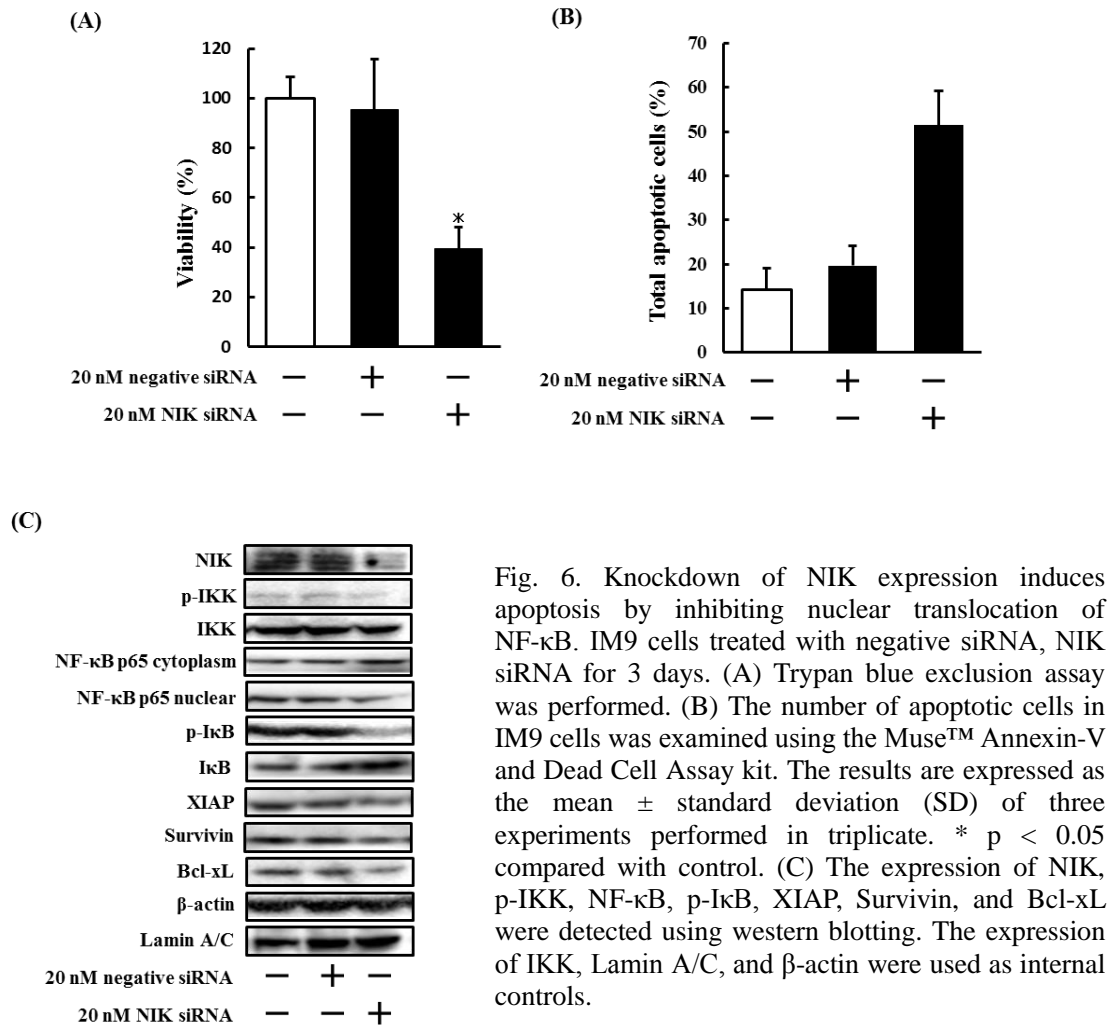


Fig. 6. Knockdown of NIK expression induces apoptosis by inhibiting nuclear translocation of NF-κB. IM9 cells treated with negative siRNA, NIK siRNA for 3 days. (A) Trypan blue exclusion assay was performed. (B) The number of apoptotic cells in IM9 cells was examined using the Muse™ Annexin-V and Dead Cell Assay kit. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of three experiments performed in triplicate. \* p < 0.05 compared with control. (C) The expression of NIK, p-IKK, NF-κB, p-IκB, XIAP, Survivin, and Bcl-xL were detected using western blotting. The expression of IKK, Lamin A/C, and β-actin were used as internal controls.

#### IV. 考察

本章において、mangiferin は多発性骨髄腫細胞株に対して濃度依存的に細胞死を誘導することが認められた。しかし、ヒト正常 B 細胞である RPMI1788 細胞では mangiferin 添加による細胞死誘導は認めなかった。また、mangiferin による細胞死はミトコンドリア膜電位の低下、Caspase-3 の活性化を介したアポトーシスであることを確認した。さらに、mangiferin によるアポトーシス誘導機序について検討したところ、NF-κB の核内での発現低下と細胞質中での発現増加を認めた。しかし、ERK1/2、JNK1/2、mTOR については変化が認められなかった。

このことから、mangiferin は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制することで、多発性骨髄腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。

IKK は IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ 、および IKK $\gamma$  との複合体として存在し、I $\kappa$ B を分解することで NF- $\kappa$ B の核移行を促進することが知られており [19, 25]、NIK は IKK 複合体の重要な調節因子であることが報告されている。本章において、mangiferin は NIK、IKK、I $\kappa$ B の活性低下及び I $\kappa$ B の発現増加を引き起こすことが明らかとなった。このことから、mangiferin は NIK を阻害することにより NF- $\kappa$ B 経路を抑制することが示唆された。

NF- $\kappa$ B は、IAP ファミリー (XIAP 及び Survivin) 及び Bcl-2 ファミリー (Bcl-xL、Bcl-2、Bax、Bim) の発現を調節している [26]。本章において、mangiferin は Bcl-2、Bax、Bim の発現には影響を与えず、XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現を抑制することが明らかとなった。Liang らは、NF- $\kappa$ B 阻害剤 berbamine が Survivin、Bcl-xL の発現を抑制することで、多発性骨髄腫細胞株に対して細胞死を誘導することを示している [27]。当研究室においても、NF- $\kappa$ B 阻害作用を有する DMF が XIAP、Bcl-xL の発現低下により多発性骨髄腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することを認めている [28]。このことから、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を阻害することで XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現を抑制し、多発性骨髄腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。

これまでの検討結果から、mangiferin により誘導される細胞死は NIK の抑制が要因であると考えられる。そこで、NIK siRNA 処理した多発性骨髄腫細胞株について検討したところ、細胞生存率の低下と Annexin 陽性細胞数の増加を認めた。また、IKK、I $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B の活性低下及び XIAP、Survivin、Bcl-xL の発現低下を確認した。このことから、mangiferin によるアポトーシス誘導には NIK の抑制が重要であると考えられる。

本章において、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで、多発性骨髄腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。現在 NIK を標的とした治療薬は臨床応用されておらず、mangiferin は新たな作用機序を有する分子標的薬として期待される。

# Mangiferin enhances the sensitivity of human multiple myeloma cells to anticancer drugs through suppression of the nuclear factor $\kappa$ B pathway

TOMOYA TAKEDA<sup>1</sup>, MASANOBU TSUBAKI<sup>1</sup>, TOSHIKI KINO<sup>1</sup>, AYAKO KAWAMURA<sup>1</sup>, SHOTA ISOYAMA<sup>1</sup>, TATSUKI ITOH<sup>4</sup>, MOTOHIRO IMANO<sup>5</sup>, GENZO TANABE<sup>2</sup>, OSAMU MURAOKA<sup>2</sup>, HIDEAKI MATSUDA<sup>3</sup>, TAKAO SATOU<sup>6</sup> and SHOZO NISHIDA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pharmacotherapy, <sup>2</sup>Laboratory of Pharmaceutical Organic Chemistry, <sup>3</sup>Department of Natural Drugs Resources, Kinki University School of Pharmacy, Kowakae, Higashi-Osaka; <sup>4</sup>Department of Food Science and Nutrition, Kinki University School of Agriculture, Nara; Departments of <sup>5</sup>Surgery and <sup>6</sup>Pathology, Kinki University School of Medicine, Osakasayama, Osaka, Japan

Received November 19, 2015; Accepted March 15, 2016

DOI: 10.3892/ijo.2016.3470

**Abstract.** Multiple myeloma (MM) is still an incurable hematological malignancy with a 5-year survival rate of ~35%, despite the use of various treatment options. The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway plays a crucial role in the pathogenesis of MM. Thus, inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway is a potential target for the treatment of MM. In a previous study, we showed that mangiferin suppressed the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. However, the treatment of MM involves a combination of two or three drugs. In this study, we examined the effect of the combination of mangiferin and conventional anticancer drugs in an MM cell line. We showed that the combination of mangiferin and an anticancer drug decreased the viability of MM cell lines in comparison with each drug used separately. The decrease in the combination of mangiferin and an anticancer drug induced cell viability was attributed to increase the expression of p53 and Noxa and decreases the expression of XIAP, survivin, and Bcl-xL proteins via inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. In addition, the combination treatment caused the induction of apoptosis, activation of caspase-3 and

the accumulation of the cells in the sub-G1 phase of the cell cycle. Our findings suggest that the combination of mangiferin and an anticancer drug could be used as a new regime for the treatment of MM.

## Introduction

Multiple myeloma (MM) is a B cell malignancy characterized by clonal proliferation of plasma cells in the bone marrow (1). MM is the most common hematological malignancy, second only to non-Hodgkin's lymphoma and accounts for 10% of all hematological malignancies and 1% of all cancers (2). MM treatment comprises vincristine/adriamycin/dexamethasone or melphalan/prednisolone chemotherapy and novel agents such as thalidomide, lenalidomide, pomalidomide, and bortezomib (3,4). However, MM remains an incurable disease with a 5-year survival rate of ~35% (5). In addition, most of the drugs used for MM treatment have side effects that limit their utility. Thus, there remains an unmet need for novel therapies for MM treatment.

The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway plays a crucial role in the survival, growth, and drug resistance of different types of cancers, including MM (6,7). Constitutive NF- $\kappa$ B activity is present in human MM cell lines and cells of the MM patients (8). The NF- $\kappa$ B family includes RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (NF- $\kappa$ B1), and p52 (NF- $\kappa$ B2) proteins (9). NF- $\kappa$ B is typically a heterodimer composed of p50 and p65 subunits and is constitutively present in the cytosol and the nucleus. In the cytosol, NF- $\kappa$ B is inactivated by its association with inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (10). Upon stimulation, I $\kappa$ B is phosphorylated by I $\kappa$ B kinases marking it for proteasomal degradation and thereby allowing nuclear translocation of NF- $\kappa$ B (5,11). Then, NF- $\kappa$ B binds to specific DNA sequences and promotes the transcription of its target genes (12). The NF- $\kappa$ B pathway regulates the gene expression of cell cycle regulators (c-Myc, cyclin D, cyclin E, p21, and p27) and anti-apoptotic molecules [B cell leukemia 2 (Bcl-2), B cell leukemia-xL (Bcl-xL), x-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), and c-IAP] (13,14).

*Correspondence to:* Dr Shozo Nishida, Division of Pharmacotherapy, Kinki University School of Pharmacy, Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan

E-mail: nishida@phar.kindai.ac.jp

*Abbreviations:* AML, acute myeloid leukemia; Bax, B cell leukemia-2 associated X; Bcl-2, B cell leukemia-2; Bcl-xL, B cell leukemia-xL; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2; IAP, inhibitors of apoptosis; I $\kappa$ B, inhibitor of  $\kappa$ B; JNK1/2, c-Jun N-terminal protein kinase 1/2; MM, multiple myeloma; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; PUMA, p53 upregulated modulator of apoptosis; XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein

*Key words:* multiple myeloma, mangiferin, NF- $\kappa$ B, anticancer drug, p53, Noxa, X-linked inhibitor of apoptosis protein, survivin, Bcl-xL

Recent studies have reported that NF- $\kappa$ B inhibitors induced apoptosis in hematopoietic tumor cells through downregulation of anti-apoptotic proteins (15). Therefore, the inhibition of NF- $\kappa$ B signaling is a potential target for the treatment of MM.

Recently, plant and plant-derived drugs have been recognized as one of the most attractive approaches for cancer therapy (16). In addition, many drugs derived from plants have been shown to be useful and effective in sensitizing tumors to conventional agents, prolonging survival time, and preventing the side effects of chemotherapy (17,18). Mangiferin, 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone-C2- $\beta$ -D-glucoside, is a compound extracted from plants belonging to the *Anacardiaceae* and *Gentianaceae* families, including *Mangifera indica* L. (19). Mangiferin has been reported to have various bioactivities, such as anti-oxidant, antitumor, antidiabetic, anti-inflammatory, and immunomodulatory activities (19). Previous studies have revealed that mangiferin has anticancer effects in acute myeloid leukemia (AML) cell lines (20). In addition, we showed that mangiferin induced apoptosis by inhibiting the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. However, the treatment of MM involves a combination of two or three drugs, including adriamycin, vincristine, and melphalan. In this study, we examined the effect of the combination of mangiferin and conventional anticancer drugs in MM cell lines.

## Materials and methods

**Materials.** Mangiferin (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>) and melphalan were purchased from Sigma (St. Paul, MN, USA), and dissolved in dimethyl sulfoxide. These reagents were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and filtered through 0.45- $\mu$ m syringe filters (Iwaki Glass, Tokyo, Japan) before use in the experiments described below.

Adriamycin and vincristine were purchased from Sigma. These reagents were dissolved in PBS and used for the various assays described below.

**Cell culture.** IM9 cells and RPMI8226 were obtained from Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan). IM9 cells were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 100  $\mu$ g/ml penicillin (Gibco), 100 U/ml streptomycin (Gibco), and 25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid (Wako, Osaka, Japan). All cell lines were maintained at 37°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>.

**Trypan blue exclusion assay.** The cells were plated in 96-well plates at 2x10<sup>4</sup> cells/ml and treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control). After incubation, the cells were stained with trypan blue and the number of stained cells was counted at days one, three, and five.

## Western blotting

**Preparation of nuclear extracts for NF- $\kappa$ B.** The cells treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control) were washed with cold PBS and lysed using a lysis buffer containing 100 mM Tris-HCl

(pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1  $\mu$ M pepstatin, 1  $\mu$ M leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 1  $\mu$ M calpain inhibitor, phosphatase inhibitor cocktail I/II, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, and the supernatant, which contained the cytoplasmic extracts, was stored at -80°C. The nuclear pellet was resuspended in cold nuclear extraction buffer for 30 min. The extract was centrifuged at 14,000 rpm for 5 min, and the supernatant containing the nuclear extract was obtained. The proteins were measured using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Total cellular proteins (30  $\mu$ g of protein) from the cytoplasmic or the nuclear extract were separated using 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gels. The proteins were transferred to polyvinyl difluoride (PVDF) membranes (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked with 5% skim milk and incubated overnight at 4°C with rabbit anti-human NF- $\kappa$ B p65 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) and rabbit anti-human lamin A/C antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA). After binding to an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, the proteins were visualized using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

**Preparation of whole cell lysates.** The cells treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control) were washed with cold PBS and lysed with a lysis buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 1  $\mu$ M pepstatin, 1  $\mu$ M leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 1  $\mu$ M calpain inhibitor, phosphatase inhibitor cocktail I/II, and 1 mM PMSF. The proteins were measured using the BCA protein assay kit (Pierce). The extracts (30  $\mu$ g of protein) were separated using 10% SDS polyacrylamide gels. The proteins were then transferred to PVDF membranes (Amersham). The membranes were blocked with 5% skim milk and incubated overnight at 4°C with each of the following antibodies: rabbit anti-human phospho-p44/42 mitogen-activated protein kinase (MAPK, ERK1/2), rabbit anti-human p44/42 MAPK (ERK1/2), mouse anti-human phospho-I $\kappa$ B, rabbit anti-human I $\kappa$ B, rabbit anti-human phospho-stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase (JNK1/2), rabbit anti-human JNK1/2, rabbit anti-human cyclin D, rabbit anti-human cyclin E, rabbit anti-human XIAP, rabbit anti-human survivin (Cell Signaling Technology), mouse anti-human  $\beta$ -actin (Sigma), rabbit anti-human p53, rabbit anti-human p21, rabbit anti-human p27, rabbit anti-human PUMA, rabbit anti-human NOXA, rabbit anti-human Bcl-xL, rabbit anti-human Bax, rabbit anti-human Bim, and rabbit anti-human Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnologies). After binding of an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, the proteins were visualized using Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) according to the manufacturer's instructions.

**Flow cytometry.** The cells treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control) were washed with cold PBS, and fixed in 70% ethanol. The cells were resuspended in PBS and 50  $\mu$ g/ml propidium iodide was added. Then, the samples were measured on a BD-LSR

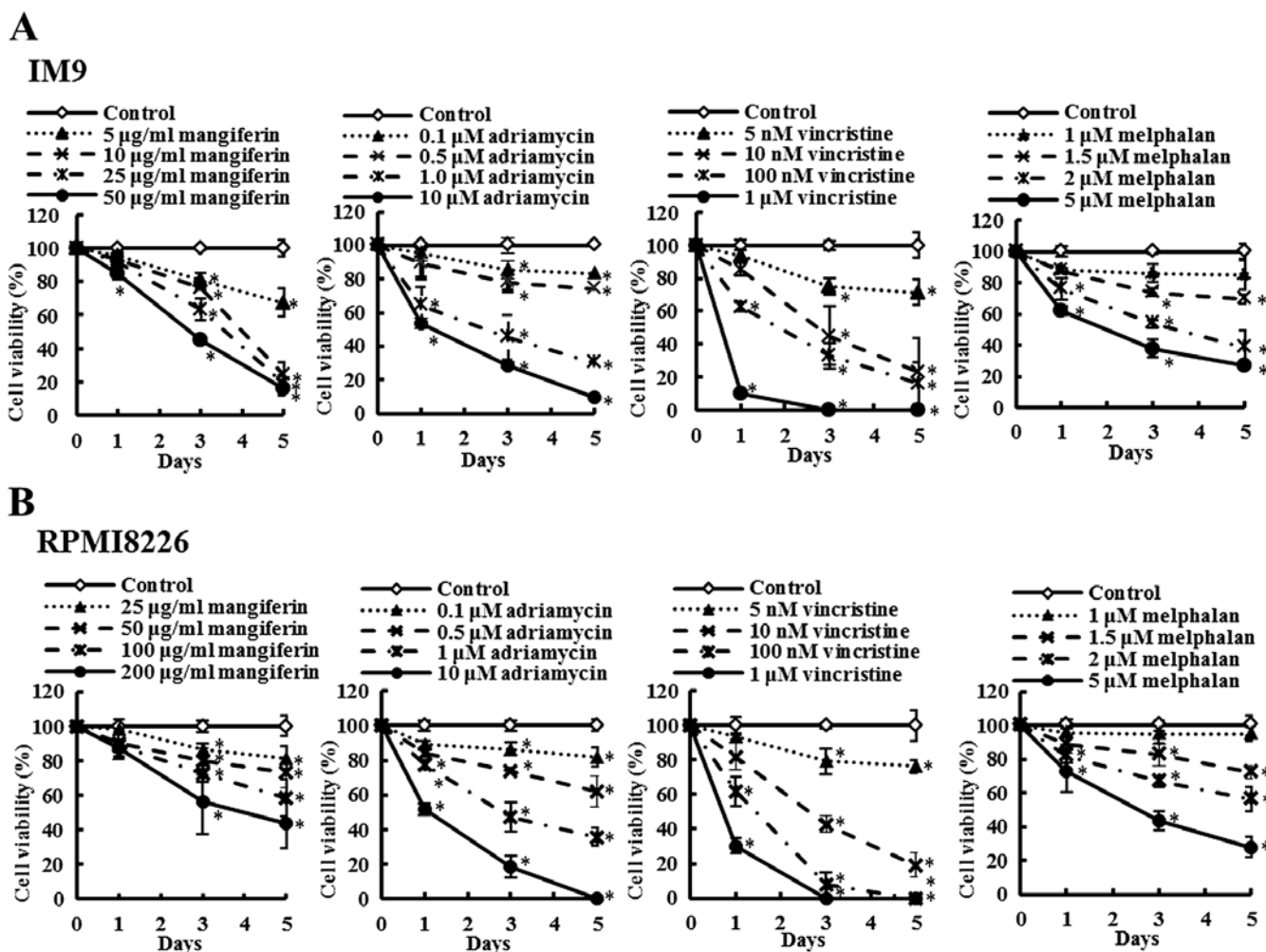


Figure 1. Mangiferin, adriamycin, vincristine, and melphalan decrease the viability of IM9 cells and RPMI8226 cells. (A) IM9 cells were treated with mangiferin (5-50  $\mu\text{g/ml}$ ), adriamycin (0.1-10  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM-1  $\mu\text{M}$ ), and melphalan (1-5  $\mu\text{M}$ ). (B) RPMI8226 cells were treated with mangiferin (25-200  $\mu\text{g/ml}$ ), adriamycin (0.1-10  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM-1  $\mu\text{M}$ ), and melphalan (1-5  $\mu\text{M}$ ). Then, trypan blue exclusion assay was performed in IM9 cells and RPMI8226 cells after one, three, and five days. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$  compared with control.

flow cytometer (BD Biosciences, CA, USA). Cell cycles were analyzed on Cell Quest software (BD Biosciences).

**Analysis of apoptosis by flow cytometry.** Measurement of cells undergoing apoptosis was performed with the Muse™ Annexin V and Dead Cell Assay kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's instructions. The cells were treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control) for 48 h. Then, Muse Annexin V and dead cell reagent was added. After incubation for 20 min at room temperature, apoptotic cells were applied to a Muse Cell Analyzer (Merck Millipore).

**Measurement of the proteolytic activity of caspase-3.** The activity of caspase-3 was determined using the caspase-3/ CPP32 fluorometric assay kit (BioVision Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cells were treated with mangiferin, anticancer drugs, a combination of both, or without mangiferin (control) for 36 h. Then, the cells were washed in PBS and lysed using the lysis buffer provided in the kit. The cell lysates were centrifuged at 14,000 rpm for

5 min, and the reaction buffer containing 1 mM Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin was added to the supernatants and incubated at 37°C for 2 h. Subsequently, the absorbance was measured using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japan) at an emission wavelength of 505 nm and an excitation wavelength of 400 nm.

**Statistical analysis.** All results are expressed as means  $\pm$  standard deviation of several independent experiments. Multiple comparisons of the data were performed using analysis of variance with Dunnett's test. P-values <5% were considered significant.

## Results

**Mangiferin, adriamycin, vincristine, and melphalan decrease the viability of the MM cell line.** The effects of mangiferin and the three anticancer drugs (adriamycin, vincristine, and melphalan) on the viability of the MM cell lines (IM9 and RPMI8226) as determined by the trypan blue exclusion assay are shown in Fig. 1. IM9 cells were treated in the absence



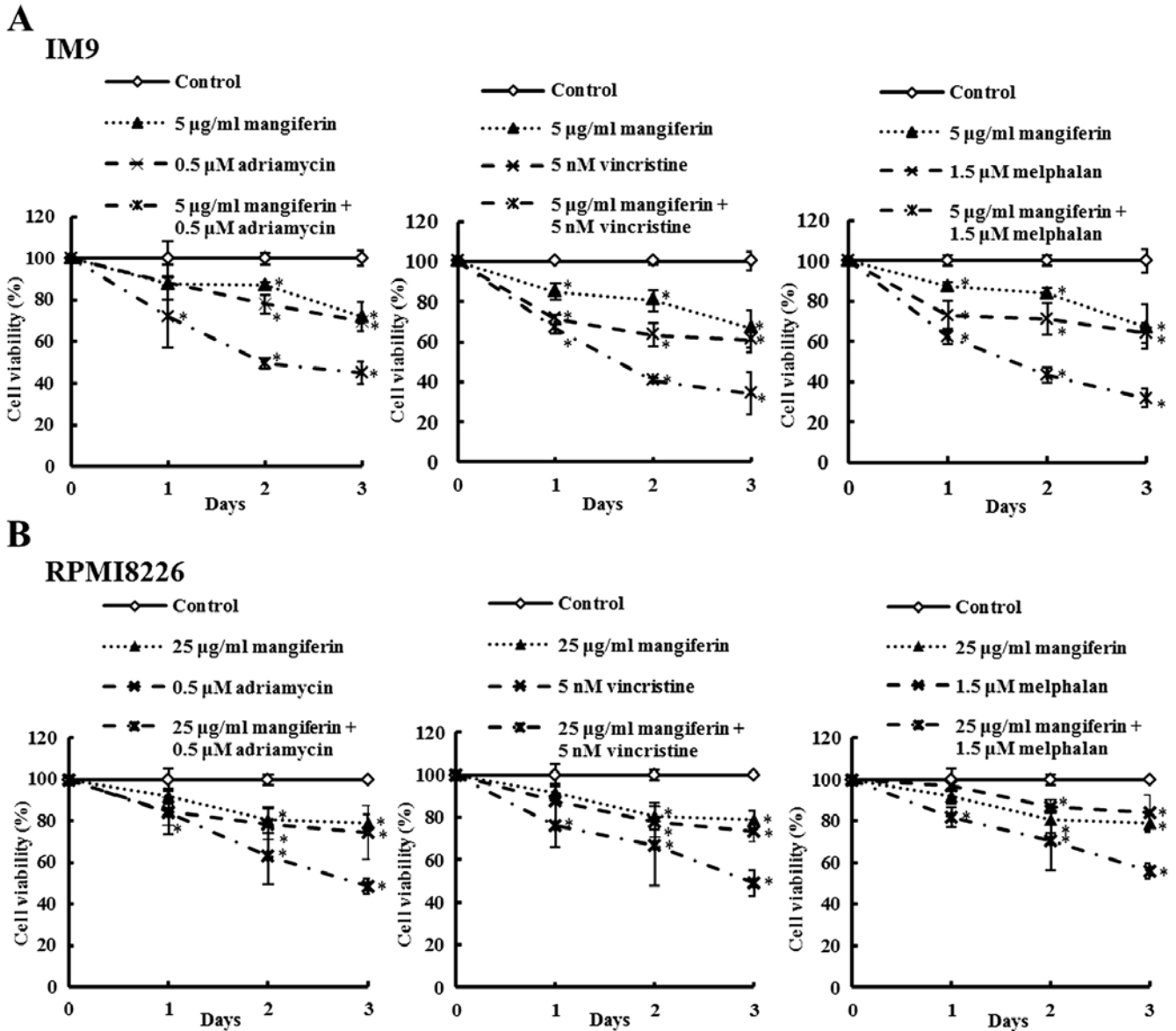


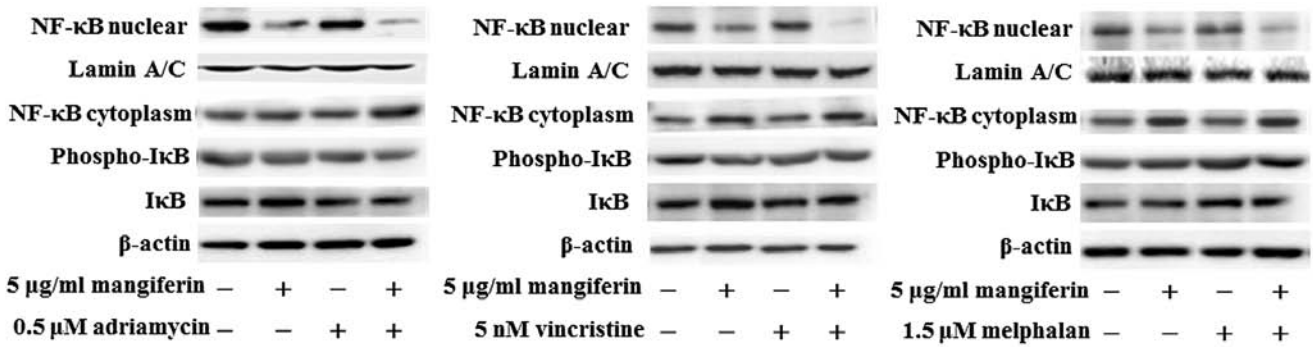
Figure 2. Mangiferin enhances the effect of anticancer drugs on MM cell lines. (A) IM9 cells were treated with mangiferin (5  $\mu\text{g/ml}$ ) or adriamycin (0.5  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5  $\mu\text{M}$ ), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug. (B) RPMI8226 cells were treated with mangiferin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) or adriamycin (0.5  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5  $\mu\text{M}$ ), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug. Then, trypan blue exclusion assay was performed in IM9 cells and RPMI8226 cells after one, two, and three days. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of three experiments performed in triplicate. \* $p < 0.05$  compared with control.

(control) or presence of mangiferin (5-50  $\mu\text{g/ml}$ ), adriamycin (0.1-10  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM-1  $\mu\text{M}$ ), or melphalan (1-5  $\mu\text{M}$ ). After three days, the viability of IM9 cells treated with 5, 10, 25, and 50  $\mu\text{M}$  mangiferin was 80.5, 76.3, 63.3 and 45.3%, respectively, whereas that after five days was 67.2, 24.5, 19.3 and 16.3%, respectively. After three days, the viability of IM9 cells treated with 5, 10, 25, and 50  $\mu\text{M}$  adriamycin was 85.5, 78.0, 45.4 and 28.9%, respectively, whereas that after five days was 83.1, 74.3, 30.2 and 9.7%, respectively. Vincristine and melphalan showed results similar to those observed with adriamycin. In addition, RPMI8226 cells also showed results similar to those observed with IM9 cells (Fig. 1B). These results indicated that mangiferin, adriamycin, vincristine, and melphalan decreased the viability of MM cell lines in a concentration-dependent manner.

*Mangiferin enhances the sensitivity of human multiple myeloma cells to anticancer drugs.* The effects of mangiferin, the three anticancer drugs, and the combination of each anticancer drug and mangiferin on the viability of the MM cell lines (IM9 and RPMI8226) were determined by trypan blue exclusion assay and are shown in Fig. 2. IM9 cells were treated with either mangiferin (5  $\mu\text{g/ml}$ ), adriamycin (0.5  $\mu\text{M}$ ), vincristine (5 nM), melphalan (1.5  $\mu\text{M}$ ), or combination of mangiferin with an anticancer drug. After three days, the viability of IM9 cells treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  mangiferin, 0.5  $\mu\text{M}$  adriamycin, or combination of both was 72.0, 69.8 and 45.0%, respectively. The combination of mangiferin and vincristine or melphalan showed results similar to those observed with adriamycin. In addition, RPMI8226 cells also showed results similar to those observed with IM9

**A**

**IM9**



**B**

**RPMI8226**

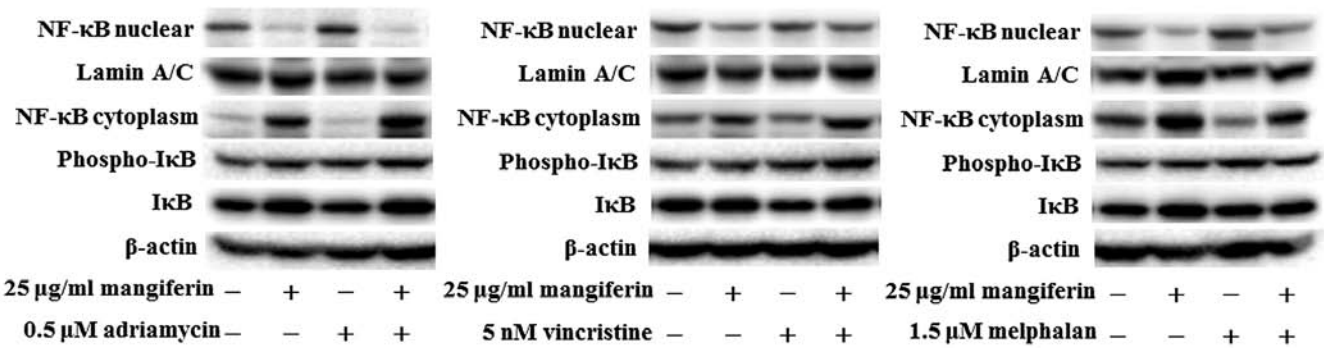


Figure 3. The combination of mangiferin and an anticancer drug suppresses the nuclear translocation of NF-κB. (A) IM9 cells were treated with mangiferin (5 μg/ml) or adriamycin (0.5 μM), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5 μM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. (B) RPMI8226 cells were treated with mangiferin (25 μg/ml) or adriamycin (0.5 μM), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5 μM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. The expression of NF-κB, and, phospho-IκB was detected using western blotting. The expression of IκB, Lamin A/C, and β-actin were used as internal controls.

cells (Fig. 2B). These results show that the combination of mangiferin and an anticancer drug significantly reduced the viability of the MM cell line in comparison to the use of each of these drugs separately.

*The combination of mangiferin and an anticancer drug suppresses the nuclear translocation of NF-κB.* In a previous study, we showed that mangiferin inhibits the nuclear translocation of NF-κB in AML cell lines (20). However, mangiferin did not affect the levels of ERK1/2, Akt, and p38MAPK phosphorylation. To clarify the molecular mechanisms underlying the effects of combination of mangiferin and other anticancer drugs, we investigated the nuclear translocation of NF-κB and expression of phosphorylated IκB and IκB proteins by using western blotting. Our results showed that the combination of mangiferin and each of the other anticancer drugs significantly suppressed the nuclear translocation of NF-κB (Fig. 3). Further, we observed no changes in the levels of ERK1/2 and JNK1/2 phosphorylation (Fig. 4). These results indicated that the decrease in the combination of mangiferin and an anticancer drug induced cell viability was attributed to inhibition of the NF-κB pathway.

*The combination of mangiferin and an anticancer drug increases the expression of p53 and Noxa and decreases the*

*expression of XIAP, survivin, and Bcl-xL proteins.* NF-κB is a nuclear factor known to activate the expression of genes involved in cell proliferation and cell survival (anti-apoptotic proteins and pro-apoptotic proteins). Therefore, we examined the expression of proteins involved in cell proliferation and cell survival by using western blotting. Our results showed that the combination of mangiferin and an anticancer drug upregulated the expression of p53 and Noxa and downregulated that of XIAP, survivin, and Bcl-xL proteins in comparison with mangiferin alone (Figs. 5 and 6). However, we observed no changes in the expression of cyclin D, cyclin E, p27, p21, Bcl-2, Bax, Bim, and PUMA proteins.

*The combination of mangiferin and an anticancer drug causes the accumulation of cells in the sub-G1 phase of the cell cycle.* p53 plays important roles in various phases of the cell cycle. Thus, we examined cell cycle regulation in IM9 cells treated with a combination of mangiferin and each of the other anticancer drugs by flow cytometry. Our results showed that the combined treatment increased the accumulation of cell population in the sub-G1 phase (Fig. 7). These results are indicative of apoptosis.

*The combination of mangiferin and an anticancer drug induces apoptosis by activating caspase-3.* We measured

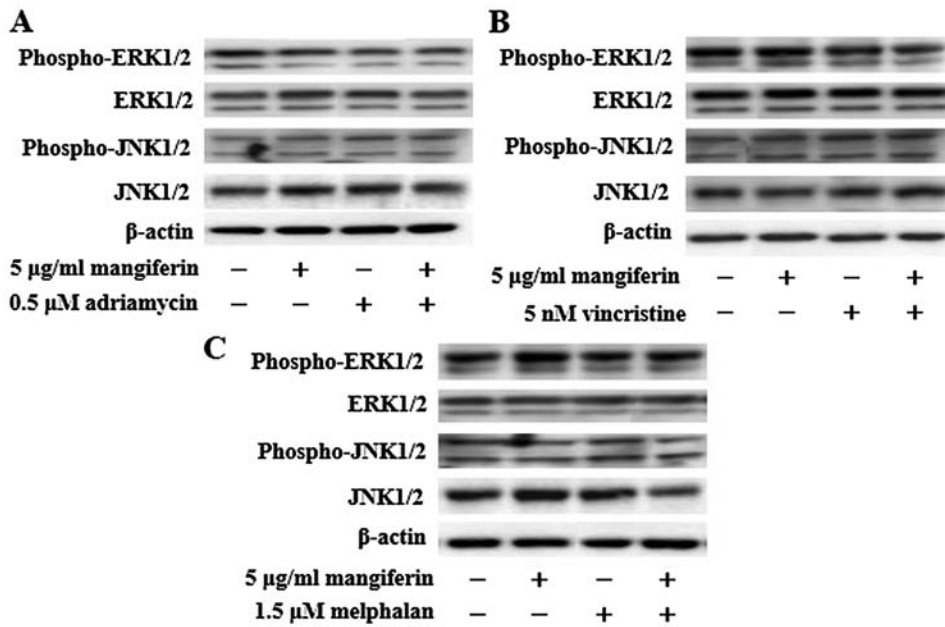


Figure 4. The combination of mangiferin and an anticancer drug do not change the levels of ERK1/2 and JNK1/2 phosphorylation. IM9 cells were treated with mangiferin (5  $\mu$ g/ml) or (A) adriamycin (0.5  $\mu$ M), (B) vincristine (5 nM), and (C) melphalan (1.5  $\mu$ M), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. The expression of phospho-ERK1/2, and phospho-JNK1/2 was detected using western blotting. The expression of ERK1/2, JNK1/2, and  $\beta$ -actin were used as internal controls.

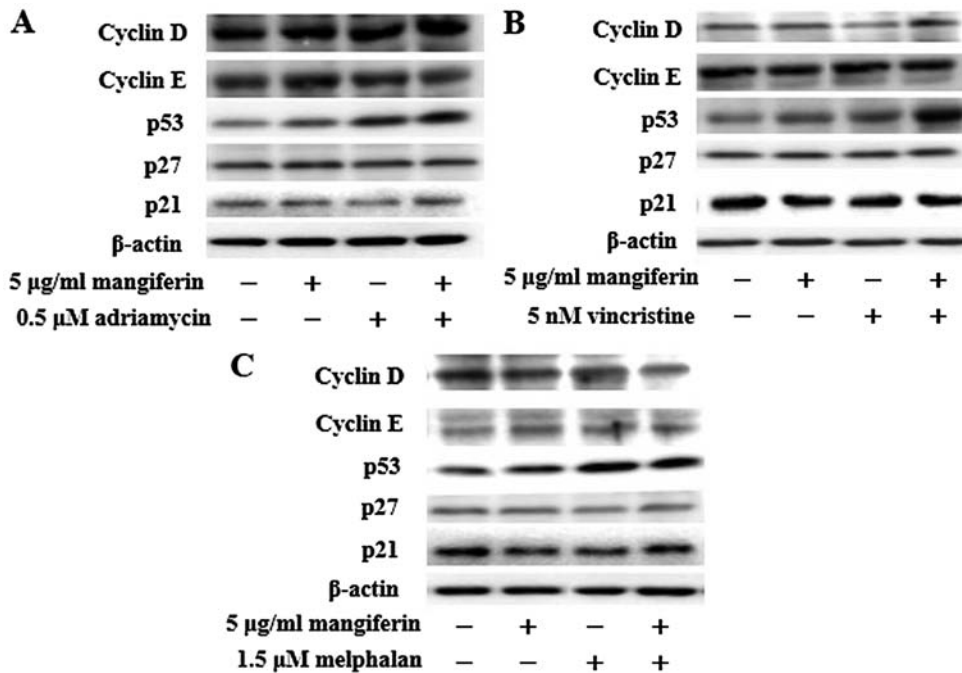


Figure 5. The combination of mangiferin and an anticancer drug increases the expression of p53. IM9 cells were treated with mangiferin (5  $\mu$ g/ml) or (A) adriamycin (0.5  $\mu$ M), (B) vincristine (5 nM), and (C) melphalan (1.5  $\mu$ M), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. The expression of cyclin D, cyclin E, p53, p27, and p21 were detected using western blotting. The expression of  $\beta$ -actin was used as internal control.

apoptotic cells using the Muse™ Annexin V and Dead Cell Assay kit. IM9 cells were treated with a combination of mangiferin and each of the other anticancer drugs for two days. Our results showed that mangiferin increased the number of apoptotic cells in a concentration-dependent manner (Fig. 8A). Apoptosis is induced by an interaction between various initiator and effector caspases. Caspase-3 is a crucial effector of

the apoptosis pathway. We investigated caspase-3 activation in IM9 cells treated with a combination of mangiferin and each of the other anticancer drugs by using the caspase-3/ CPP32 fluorometric assay kit. The combination of mangiferin and an anticancer drug activated caspase-3 (Fig. 8B). These results showed that the combined treatment induced apoptosis by activating caspase-3.

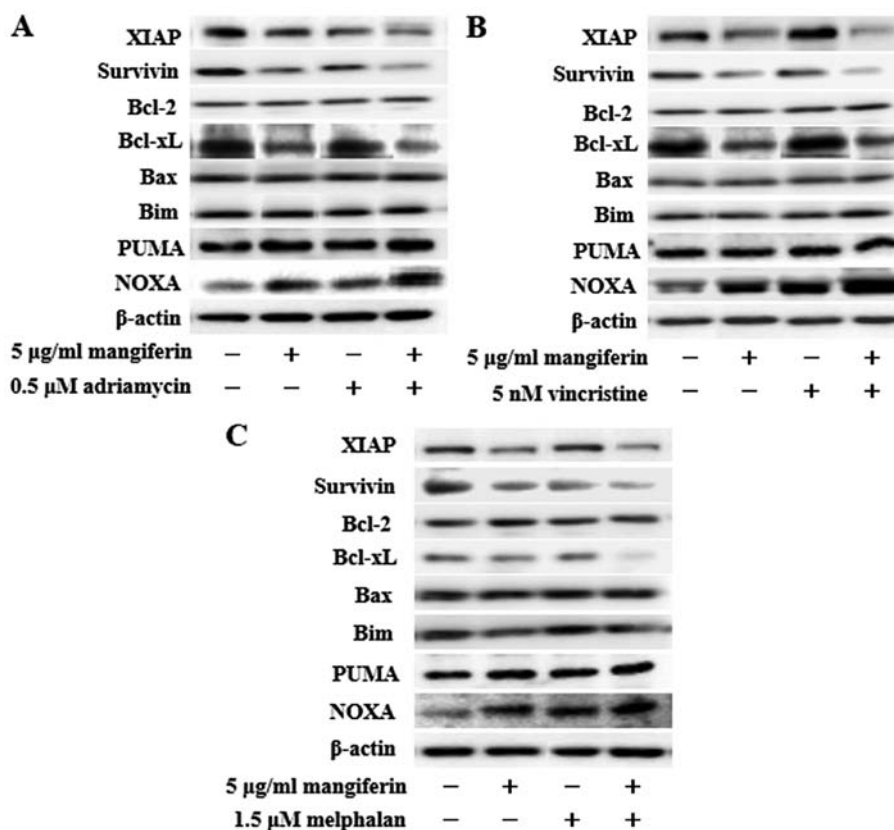


Figure 6. The combination of mangiferin and an anticancer drug increase the expression of Noxa, and decrease the expression of XIAP, survivin, and Bcl-xL proteins. IM9 cells were treated with mangiferin (5 μg/ml) or (A) adriamycin (0.5 μM), (B) vincristine (5 nM), and (C) melphalan (1.5 μM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. The expression of XIAP, survivin, Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bim, PUMA, and Noxa were detected using western blotting. The expression of β-actin was used as internal control.

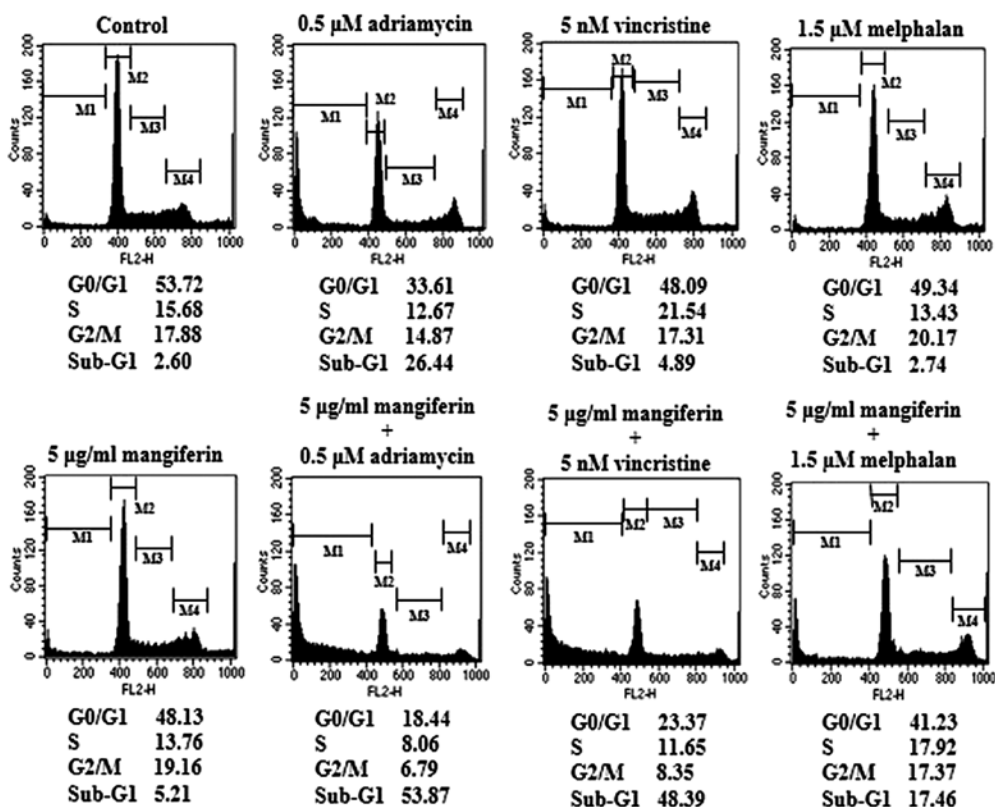


Figure 7. The combination of mangiferin and an anticancer drug causes the accumulation of the cells in the sub-G1 phase of the cell cycle. IM9 cells were treated with mangiferin (5 μg/ml) or adriamycin (0.5 μM), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5 μM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for three days. Cell cycle distribution was analyzed at an hour after PI staining.

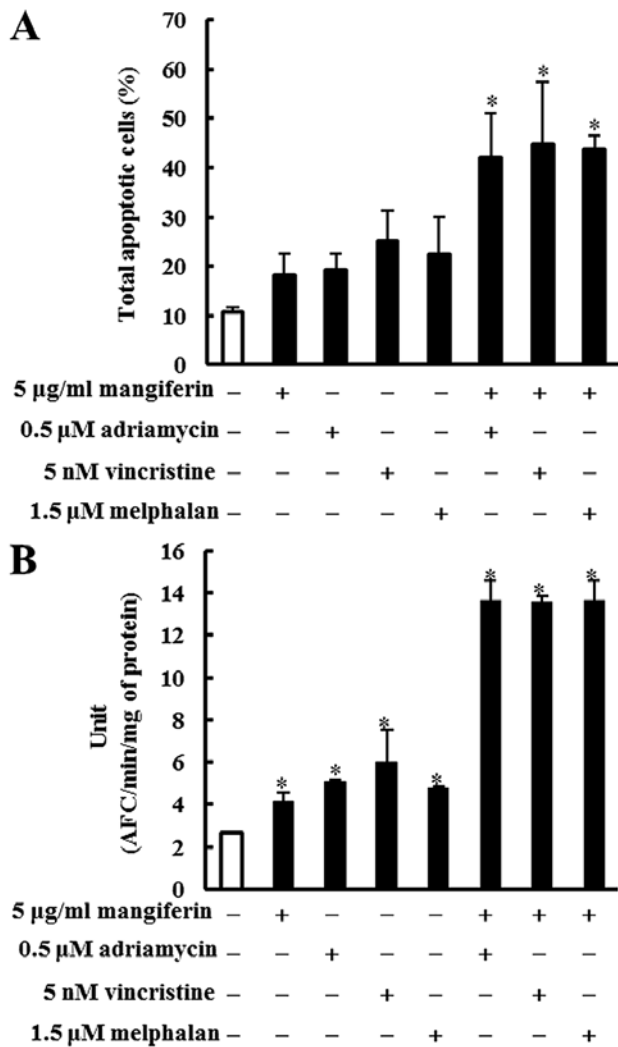


Figure 8. The combination of mangiferin and an anticancer drug induces apoptosis by activating caspase-3. (A) IM9 cells were treated with mangiferin (5 µg/ml) or adriamycin (0.5 µM), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5 µM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for two days. The number of apoptotic cells in IM9 cells was examined using the Muse Annexin V and Dead Cell Assay kit. (B) IM9 cells were treated with mangiferin (5 µg/ml) or adriamycin (0.5 µM), vincristine (5 nM), and melphalan (1.5 µM), or a mixture of mangiferin with an anticancer drug for 36 h. The activity of caspase-3 induced by mangiferin in IM9 cells was examined using the caspase-3/ CPP32 fluorometric assay kit. The results are expressed as the mean ± standard deviation (SD) of four experiments. \* $p < 0.05$  compared with control.

## Discussion

Despite the development of increasingly effective therapies, MM remains an incurable disease with an average survival of 3-5 years following diagnosis. In addition, most of the compounds used for MM treatment have side effects that limit their utility. Presumably, the side effects of these compounds could be decreased by reducing their dose and using them in combination with another drug (21). The nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway plays a crucial role in the pathogenesis of MM (22,23). Thus, inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway is a potential target for the treatment of MM. We have previously shown that mangiferin induced apoptosis in AML cell lines via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway (20). Additionally, it

was reported that mangiferin in combination with oxaliplatin counteract the development of resistance to oxaliplatin in colon cancer cells by reducing active NF- $\kappa$ B (24). However, the effect of the combination of mangiferin and conventional anticancer drugs in MM cell lines remain to be clarified. In particular, the molecular mechanism has not been elucidated thus far. In this study, we examined the effect of the combination of mangiferin and conventional anticancer drugs in MM cell lines.

We showed that mangiferin, adriamycin, vincristine, and melphalan decrease the viability of MM cell lines. The combination of mangiferin and each of the above-mentioned anticancer drugs significantly reduced the viability of the MM cell line in comparison with each of these drugs used alone. Furthermore, our results showed that the combination treatment significantly suppressed the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. However, we observed no changes in the levels of ERK1/2 and JNK1/2 phosphorylation. In agreement with previous reports, constitutive activation of NF- $\kappa$ B promoted multiple myeloma cell growth and survival, and the NF- $\kappa$ B inhibitor dimethyl fumarate induced apoptosis in MM cell lines (15,25). In addition, other studies showed that celestrol induces chemosensitization through downregulation of NF- $\kappa$ B in MM cell lines (17). These results indicate that the combination of mangiferin and other anticancer drugs exert their effects on MM through downregulation of NF- $\kappa$ B pathway.

NF- $\kappa$ B initiates the transcriptional activation of pro-survival genes and proliferation-promoting genes (26). We observed that the combination of mangiferin and each of the other anticancer drugs significantly increased the expression of p53 and Noxa and decreased the expression of XIAP, survivin, and Bcl-xL, proteins. In addition, the combination treatment caused the induction of apoptosis, activation of caspase-3 and the accumulation of the cells in the sub-G1 phase of the cell cycle. The tumor suppressor p53 induces apoptosis by transactivation of its downstream apoptotic regulators such as Noxa (27). Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis protein family, protects cells from caspase-dependent apoptotic pathways. Survivin overexpression has been reported in various hematopoietic and solid cancers (28-30). XIAP is the most potent endogenous direct inhibitor of caspases and is thus considered a key physiological regulator of cell death. MM cells express high levels of XIAP regulated by the NF- $\kappa$ B pathway (31). The Bcl-2 family member Bcl-xL is an anti-apoptotic protein; Bcl-xL overexpression has been reported in MM cell lines (32,33). These results suggest that the combination of mangiferin and an anticancer drug induces apoptosis by increasing the expression of p53 and Noxa and decreasing that of XIAP, survivin, and Bcl-xL proteins via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway.

In conclusion, our results showed that the combination of mangiferin and an anticancer drug decreased the viability of MM cell lines in comparison with each of these drugs used separately. The decrease in the combination of mangiferin and an anticancer drug induced cell viability was attributed to the induction of apoptosis, activation of caspase-3, and the accumulation of the cells in the sub-G1 phase of the cell cycle via inhibition of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B. Importantly, 40% of multiple myeloma patients show constitutive activation of the NF- $\kappa$ B pathway. Our findings showed that the combina-

tion of mangiferin and an anticancer drug selectively inhibited the NF- $\kappa$ B pathway without inhibiting other signaling factors. In addition, we found that mangiferin enhanced the effect of conventional anticancer drugs (adriamycin, vincristine, and melphalan) commonly used in multiple myeloma treatment. Our results provided evidence of the potential of the combination of mangiferin and an anticancer drug as a new regime for the treatment of MM.

### Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and by Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT)-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2014-2018.

### References

- Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG and Anderson KC: Multiple myeloma. *Lancet* 374: 324-339, 2009.
- Bladé J, Cibeira MT and Rosiñol L: Novel drugs for the treatment of multiple myeloma. *Haematologica* 95: 702-704, 2010.
- Rajkumar SV: Treatment of multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 479-491, 2011.
- Wang X, Zhang M, Wang M, He P, Liu X, Chen L, Xi J, Wang M, Li J, Liu H, *et al*: Arsenic trioxide combined with VCMP or VAD chemotherapy in patients with refractory or relapsed multiple myeloma in a single institution of China. *Indian J Hematol Blood Transfus* 30: 259-264, 2014.
- Paramore A and Frantz S: Bortezomib. *Nat Rev Drug Discov* 2: 611-612, 2003.
- Sethi G, Sung B and Aggarwal BB: Nuclear factor-kappaB activation: From bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 21-31, 2008.
- Tsubaki M, Takeda T, Ogawa N, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Ishizaka T, Satou T, *et al*: Overexpression of survivin via activation of ERK1/2, Akt, and NF- $\kappa$ B plays a central role in vincristine resistance in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 39: 445-452, 2015.
- Cormier F, Monjanel H, Fabre C, Billot K, Sapharikas E, Chereau F, Bordereaux D, Molina TJ, Avet-Loiseau H and Baud V: Frequent engagement of RelB activation is critical for cell survival in multiple myeloma. *PLoS One* 8: e59127, 2013.
- Karin M and Greten FR: NF-kappaB: Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 5: 749-759, 2005.
- Ma C, Zuo W, Wang X, Wei L, Guo Q and Song X: Lapatinib inhibits the activation of NF- $\kappa$ B through reducing phosphorylation of I $\kappa$ B- $\alpha$  in breast cancer cells. *Oncol Rep* 29: 812-818, 2013.
- Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, *et al*: Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* 114: 1046-1052, 2009.
- Hayden MS and Ghosh S: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344-362, 2008.
- Panwalkar A, Verstovsek S and Giles F: Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer* 100: 1578-1589, 2004.
- Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B and Pestell RG: NF-kappaB and cell-cycle regulation: The cyclin connection. *Cytokine Growth Factor Rev* 12: 73-90, 2001.
- Tsubaki M, Ogawa N, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Satou T and Nishida S: Dimethyl fumarate induces apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear translocation and down-regulation of Bcl-xL and XIAP. *Biomed Pharmacother* 68: 999-1005, 2014.
- Olaku O and White JD: Herbal therapy use by cancer patients: A literature review on case reports. *Eur J Cancer* 47: 508-514, 2011.
- Jeong SJ, Koh W, Kim B and Kim SH: Are there new therapeutic options for treating lung cancer based on herbal medicines and their metabolites? *J Ethnopharmacol* 138: 652-661, 2011.
- Wang LH, Li Y, Yang SN, Wang FY, Hou Y, Cui W, Chen K, Cao Q, Wang S, Zhang TY, *et al*: Gambogic acid synergistically potentiates cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK/HO-1 signalling. *Br J Cancer* 110: 341-352, 2014.
- Luo F, Lv Q, Zhao Y, Hu G, Huang G, Zhang J, Sun C, Li X and Chen K: Quantification and purification of mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H(2)O(2)-induced stress. *Int J Mol Sci* 13: 11260-11274, 2012.
- Shoji K, Tsubaki M, Yamazoe Y, Satou T, Itoh T, Kidera Y, Tanimori Y, Yanae M, Matsuda H, Taga A, *et al*: Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF- $\kappa$ B in HL-60 cells. *Arch Pharm Res* 34: 469-475, 2011.
- Slawinska-Brych A, Zdzisinska B, Mizerska-Dudka M and Kandfer-Szerszen M: Induction of apoptosis in multiple myeloma cells by a statin-thalidomide combination can be enhanced by p38 MAPK inhibition. *Leuk Res* 37: 586-594, 2013.
- Kannaiyan R, Hay HS, Rajendran P, Li F, Shanmugam MK, Vali S, Abbasi T, Kapoor S, Sharma A, Kumar AP, *et al*: Celestrol inhibits proliferation and induces chemosensitization through down-regulation of NF- $\kappa$ B and STAT3 regulated gene products in multiple myeloma cells. *Br J Pharmacol* 164: 1506-1521, 2011.
- Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, Takeda T, *et al*: Inhibition of the tumour necrosis factor-alpha autocrine loop enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to anticancer drugs. *Eur J Cancer* 49: 3708-3717, 2013.
- du Plessis-Stoman D, du Preez J and van de Venter M: Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes increased apoptosis and downregulation of NF $\kappa$ B in cancer cell lines. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 8: 177-184, 2011.
- Trocoli A and Djavaheri-Mergny M: The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res* 1: 629-649, 2011.
- DiDonato JA, Mercurio F and Karin M: NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* 246: 379-400, 2012.
- Zhu HJ, Liu L, Fan L, Zhang LN, Fang C, Zou ZJ, Li JY and Xu W: The BH3-only protein Puma plays an essential role in p53-mediated apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 54: 2712-2719, 2013.
- Tsubaki M, Satou T, Itoh T, Imano M, Komai M, Nishinobo M, Yamashita M, Yanae M, Yamazoe Y and Nishida S: Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells. *Leuk Res* 36: 1315-1322, 2012.
- Tsubaki M, Komai M, Itoh T, Imano M, Sakamoto K, Shimaoka H, Takeda T, Ogawa N, Mashimo K, Fujiwara D, *et al*: By inhibiting Src, verapamil and dasatinib overcome multidrug resistance via increased expression of Bim and decreased expressions of MDR1 and survivin in human multidrug-resistant myeloma cells. *Leuk Res* 38: 121-130, 2014.
- Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic-Martinovic V, Martinovic T, Filipovic B, Stanisavljevic D, Zivkovic R, Hajder J, Stanisavljevic N and Mihaljevic B: Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Med Oncol* 29: 3515-3521, 2012.
- Desplanques G, Giuliani N, Delsignore R, Rizzoli V, Bataille R and Barillé-Nion S: Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica* 94: 87-93, 2009.
- Lin J, Wu Y, Yang D and Zhao Y: Induction of apoptosis and antitumor effects of a small molecule inhibitor of Bcl-2 and Bcl-xL, gossypol acetate, in multiple myeloma *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep* 30: 731-738, 2013.
- Xu L, Yang D, Wang S, Tang W, Liu M, Davis M, Chen J, Rae JM, Lawrence T and Lippman ME: (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 4: 197-205, 2005.

## 第3章

### 新規 NIK 阻害剤 mangiferin による 転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果

#### I. 緒言

悪性腫瘍は多くの効果的な薬剤や治療法の出現にも関わらず未だ根治することが困難な疾患で、その原因として転移が挙げられる。そのため、転移を抑制することががん患者の予後改善につながると考えられるが、現在転移を抑制する治療法は国内外において開発されていない。

がんの転移は、原発巣からの遊離、血管内への侵入、血管内壁への接着、組織への浸潤という多段階の過程を経て成立するため、治療には分子標的を基盤としたアプローチが重要である。このうち浸潤過程は、MMPs が重要な役割を果たす [38]。MMPs は宿主の基底膜や extracellular matrix (ECM) などの組織構築を破壊するタンパク分解酵素で、特に分泌型の MMP-1、MMP-2、MMP-9 や膜結合型の MMP-14 ががんの進行や浸潤に関与することが示されている [39]。これらは乳癌や肺癌など種々の悪性腫瘍において確認され、がん細胞の浸潤に深く関与することが報告されている [40]。また接着過程は VLA s が重要であり、特に VLA-4、VLA-5、VLA-6 は腫瘍細胞の転移及び接着に関与することが知られている [41]。そのため、MMPs 及び VLA s を抑制することが転移抑制において重要であると考えられる。

転移には様々な細胞内シグナル伝達因子が関与し、特に NF- $\kappa$ B は乳癌や前立腺癌、悪性黒色腫などにおいて高発現していることが知られている [42, 43]。NF- $\kappa$ B は核内に移行することで遺伝子の転写活性を促進し、Bcl-2、Bcl-xL のような抗アポトーシス因子を発現することにより細胞の生存に関与している [44]。さらに、NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化しているがん細胞では MMPs が高発現しており、がん細胞の浸潤能を増加させることが知られている [45]。このことから、NF- $\kappa$ B は転移抑制および腫瘍増殖抑制のターゲット分子として有用であると考えられる。

第 1 章において、mangiferin は NIK を抑制することで NF- $\kappa$ B 経路を阻害することが示された。そこで、本章ではマウス由来の悪性黒色腫細胞株である B16 melanoma BL6 (B16BL6)細胞を用いて、in vivo における mangiferin の転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果について検討した。

## II. 実験方法

### 1. 試薬の調製

Mangiferin (Sigma)は DMSO に溶解後、0.45  $\mu$ m のシリンジフィルター (Iwaki Glass)でろ過滅菌したものを使用した。

### 2. 使用動物及び使用細胞株

使用動物には 6 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを用いた。また、使用細胞株はマウス由来の悪性黒色腫細胞株 B16BL6 細胞を用いた。B16BL6 細胞は、25 mM HEPES (Wako)、100  $\mu$ g/mL penicillin (Gibco)、100 U/mL streptomycin (Gibco)、及



び 10% FBS (Gibco)を含む RPMI1640 (Sigma)培養液にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 3. Mangiferin 投与による転移抑制効果

B16BL6 細胞をマウスの footpad に皮下注射した。3 週間後、原発巣を切除し、mangiferin を 1 日 1 回経口投与した。なお、control として 0.1% DMSO を経口投与した。経口投与は原発巣切除翌日から 3 週間継続して行い、その後マウスを解剖し、肺の転移結節数を算定した。

### 4. Mangiferin 投与による腫瘍増殖抑制効果

B16BL6 細胞をマウスの footpad に皮下注射し、翌日から mangiferin を 1 日 1 回連日経口投与した。なお、control として 0.1% DMSO を経口投与した。腫瘍体積は 17 日間測定し、その後原発巣を切除し、sample として回収した。

### 5. Western blotting

実験方法 4. で切除した原発巣に lysis buffer を添加した。その後、遠心分離し、その上清を細胞質分画タンパクの sample とした。細胞質分画回収後のペレットを lysis buffer without NP-40 で洗浄した。洗浄後のペレットに nuclear lysis buffer を添加した。その後、遠心分離し、その上清を細胞核分画タンパクの sample とした。タンパク定量は BCA Protein Assay (PIERCE)にて行い、これを sample とした。Sample は SDS-PAGE にて泳動し、PVDF membrane (Amersham Biosciences) にタンパクを転写した。この membrane は 3% スキムミルクを含む TBS (10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl)でブロッキングを行い、目的とするタンパクに特異的な一次抗体を反応させた。反応後、TBS で洗浄し、HRP で標識した二次

抗体と反応させた。次いで、Luminata Forte Western HRP 基質 (Merck Millipore) を用いて反応させ、タンパク質を検出した。

## 6. Total RNA extraction and quantitative real-time PCR

実験方法 4. で切除した原発巣に TRIzol reagent (Invitrogen) を添加し、total RNA を抽出した。次に、抽出した total RNA は SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) により cDNA を合成した。抽出した cDNA、SYBR Premix Ex Taq (Takara Biomedical, Siga, Japan)、VLAs、MMPs に特異的にデザインされたプライマーを用いて、ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, CA, USA) により MMPs 及び VLAs mRNA 発現を定量した。なお、MMPs 及び VLAs mRNA の発現は GAPDH mRNA 発現により標準化した。

## 7. Collagenase 活性

実験方法 4. で切除した原発巣から回収した sample に FITC でラベルした基質を加え、インキュベートした。反応後、氷冷した酵素反応停止剤を加え、蛍光強度を蛍光分光光度計 (励起光 495 nm、蛍光 520 nm) にて測定した。

## 8. Mangiferin 投与による生存期間への影響

B16BL6 細胞をマウスの尾静脈から注射し、翌日から mangiferin を 1 日 1 回連日経口投与した。なお、control として 0.1% DMSO を経口投与した。経口投与は尾静脈注射翌日からマウスが死亡するまで継続して行った。

## 9. 統計的解析

上記の方法により得られた結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。各群の検定に

は ANOVA with Dunnett、生存曲線の検定には Kaplan・マイヤー法を用い、 $p < 0.05$  のとき有意差があるとした。

### III. 結果

#### 1. Mangiferin 投与による転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果

Mangiferin 投与により、B16BL6 細胞の肺転移を抑制するか自然転移モデルにより検討した。その結果、mangiferin 投与群では肺転移結節数の減少が認められた (Fig. 1A)。次に、mangiferin 投与により腫瘍増殖を抑制するか検討した。その結果、control と比較して腫瘍増殖の抑制が確認された (Fig. 1B)。

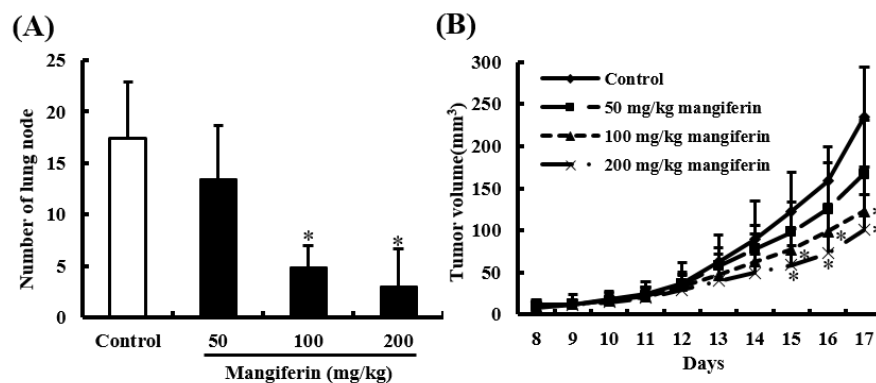


Fig. 1. Mangiferin inhibits spontaneous metastasis and tumor growth. Mice footpads were inoculated with B16BL6 cells. (A) Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after removal of the footpad tumor. The animals were sacrificed at 21 days after tumor removal, and metastasis nodules in the lungs were counted. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 10 mice. \*  $p < 0.05$  compared to control. (B) Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after inoculation. The results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of 10 mice. \*  $p < 0.05$  compared to control.

#### 2. Mangiferin 投与による生存シグナルの活性動態の検討

第 1 章において、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することが示され

た。そこで、マウスの原発巣から回収した sample を用いて、NF- $\kappa$ B 経路の活性動態を western blotting により検出した。その結果、NIK、IKK、I $\kappa$ B 及び NF- $\kappa$ B の活性低下が認められた (Fig. 2A)。また、mangiferin が NF- $\kappa$ B 経路以外の生存シグナルに影響するか検討したところ、Akt、p38、ERK1/2、mTOR の活性動態については変化が認められなかった (Fig. 2B)。このことから、mangiferin 投与による転移及び腫瘍増殖の抑制には NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路阻害が要因となることが示唆された。

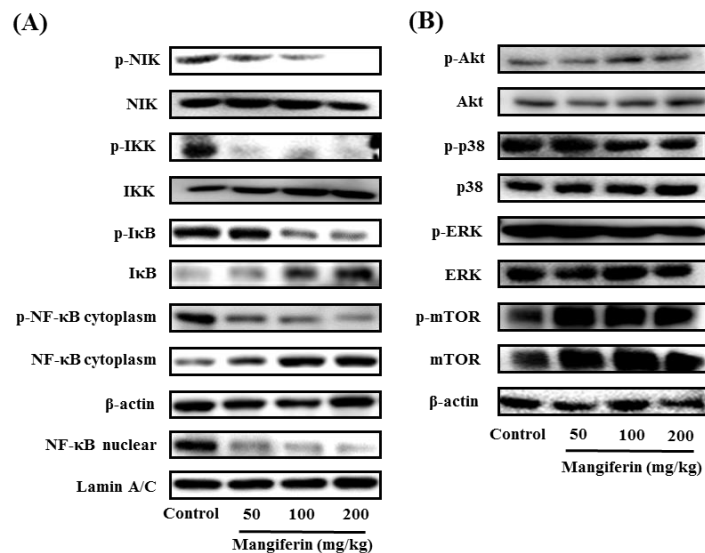


Fig. 2. Mangiferin specifically suppresses the NF- $\kappa$ B pathway. Mice footpads were inoculated with B16BL6 cells. Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after inoculation. After 21 days, the primary tumors were harvested. (A, B) The expression of phosphorylated and total NIK, IKK, I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, Akt, p38, ERK, and mTOR were detected by western blotting. The expression of  $\beta$ -actin and Lamin A/C were used as internal controls.

### 3. Mangiferin 投与による MMPs 及び VLAs の発現動態

MMPs や VLAs は、がん細胞の浸潤、運動、接着に関与することが知られている。また、NF- $\kappa$ B の活性化は MMPs 及び VLAs の発現を誘導することも報告されている [47]。そこで、マウスの原発巣から回収した sample を用いて、MMPs と VLAs の発現動態について検討した。その結果、control と比較して mangiferin 投与群において MMP-1、MMP-2、MMP-9 および MMP-14 mRNA 発現低下が認

められた (Fig. 3A-D)。さらに、Type I型コラゲナーゼ活性と Type IV 型コラゲナーゼ活性について検討したところ、mangiferin 投与群において Type I型コラゲナーゼ活性及び Type IV 型コラゲナーゼ活性の低下を確認した。また、MMP-14 タンパクの発現低下も認められた (Fig. 3E-G)。

VLA<sub>s</sub> の発現動態について検討したところ、control と比較して mangiferin 投与により VLA-4、VLA-5、VLA-6 mRNA 及びタンパクの発現低下が認められた (Fig. 4)。このことから、mangiferin 投与による転移抑制には MMPs と VLA<sub>s</sub> の発現低下が関与する可能性が示唆された。

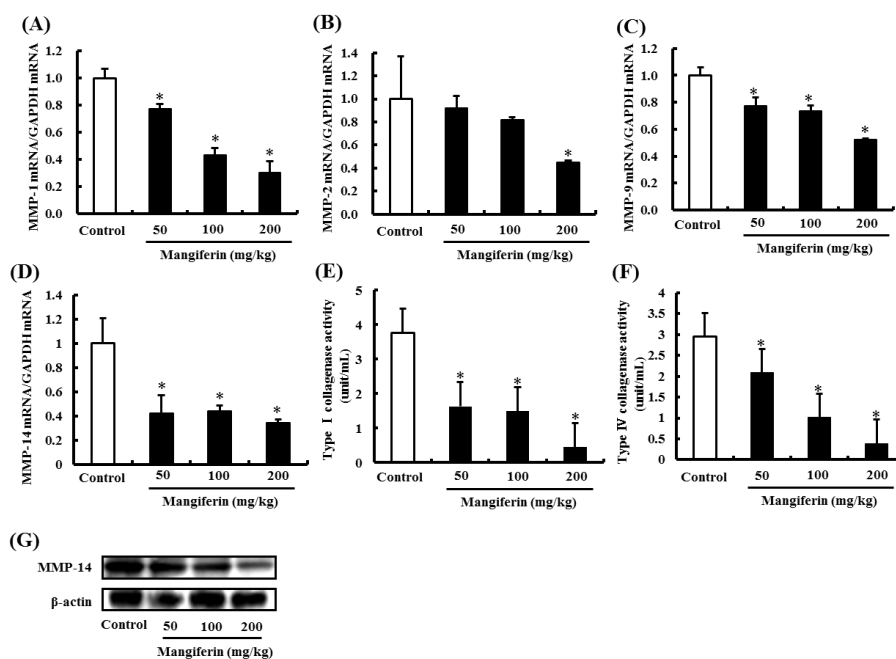


Fig. 3. Mangiferin inhibits the expression and activity of MMPs. Mice footpads were inoculated with B16BL6 cells. Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200mg/kg) began 1 day after inoculation. After 21 days, the primary tumors were harvested. (A-D) Total RNA was extracted, and the (A)MMP-1, (B)MMP-2, (C)MMP-9, and (D)MMP-14 mRNA levels were determined by real-time PCR. The results are expressed as ratios of test: control after normalization to the GAPDH mRNA levels. The results are representative of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to control. (E, F) Activity levels of (E) type I collagenase (MMP-1) and (F) the type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in the primary tumors. The results are representative of 3 independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to control. (G) The expression of MMP-14 was detected by western blotting. The expression of  $\beta$ -actin was used as internal controls.

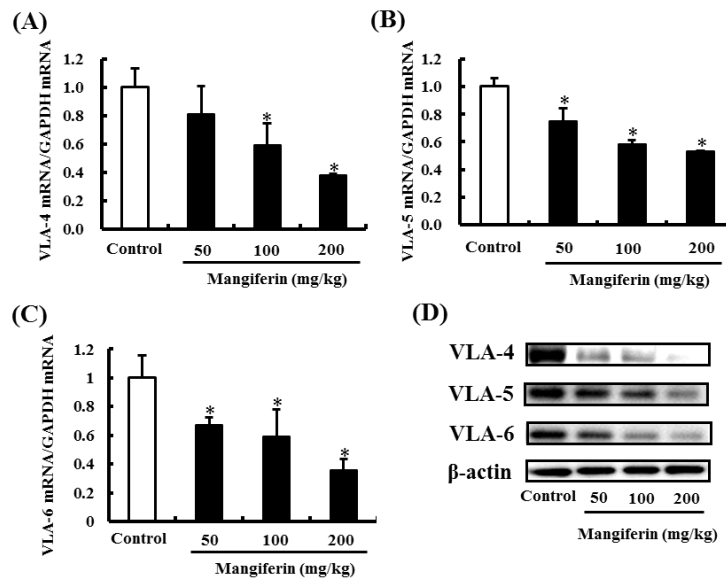


Fig. 4. Mangiferin inhibits the expression of VLAs. Mice footpads were inoculated with B16BL6 cells. Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after inoculation. After 21 days, the primary tumors were harvested. (A-C) Total RNA was extracted, and the (A) VLA-4 mRNA, (B) VLA-5 mRNA, and (C) VLA-6 mRNA levels were determined by real-time PCR. The results are expressed as ratios of test: tumor control after normalization to the GAPDH mRNA levels. The results are representative of 5 independent experiments. \*  $p < 0.05$  compared to control. (D) The expression of VLA-4, VLA-5, and VLA-6 protein were detected by western blotting. The expression of  $\beta$ -actin was used as internal controls.

#### 4. Mangiferin 投与によるアポトーシス関連因子の活性動態の検討

Mangiferin 投与による腫瘍増殖の抑制は、NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路の阻害によりアポトーシスが誘導された可能性が考えられる。そこで、マウスの原発巣から回収した sample を用い、mangiferin 投与群でのアポトーシス関連因子の発現動態を western blotting により検討した。その結果、PUMA、リン酸化 p53、p53 の発現増加及び Survivin、Bcl-xL の発現低下が認められた (Fig. 5)。しかし、Bax、Bim、NOXA については変化が認められなかった。アポトーシス誘導の過程において、Caspase-3 及び PARP1 の切断が引き起こされる。そこで、mangiferin 投与群の Caspase-3 及び PARP1 の断片化を western blotting により検討した。その結果、Caspase-3 及び PARP1 の切断を確認した (Fig. 5)。これらのことから、mangiferin による腫瘍増殖抑制効果は PUMA、リン酸化 p53、p53 の発現増加及

び Survivin、Bcl-xL の発現低下が関与する可能性が考えられる。

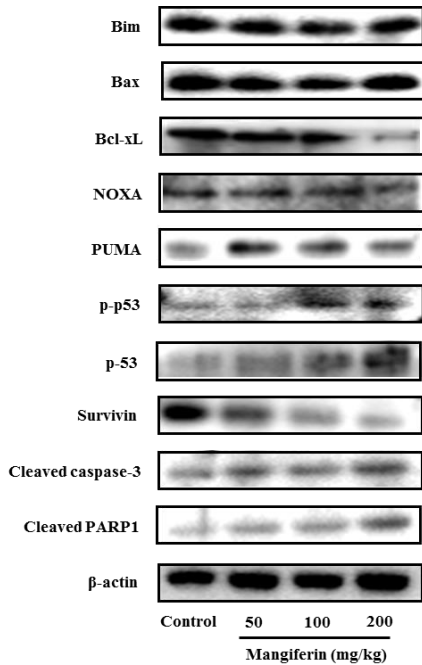


Fig. 5. Mangiferin increases the expression of cleaved caspase-3, cleaved PARP-1, PUMA, p53, and phosphorylated p53 proteins, and decreases the expression of Survivin and Bcl-xL proteins. Mice were inoculated on footpad with B16BL6 cells. Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after inoculation. After 21 days, the primary tumors were harvested. The expression levels of Bim, Bax, Bcl-xL, NOXA, PUMA, p53, phosphorylated p53, Survivin, cleaved caspase-3, and cleaved PARP-1 were detected by western blotting. The expression of  $\beta$ -actin was used as internal controls.

## 5. Mangiferin 投与による生存期間への影響

Mangiferin 投与によりマウスの生存期間を延長するか検討した。その結果、control と比較して mangiferin 投与群で生存期間の延長が確認された (Fig. 6)。

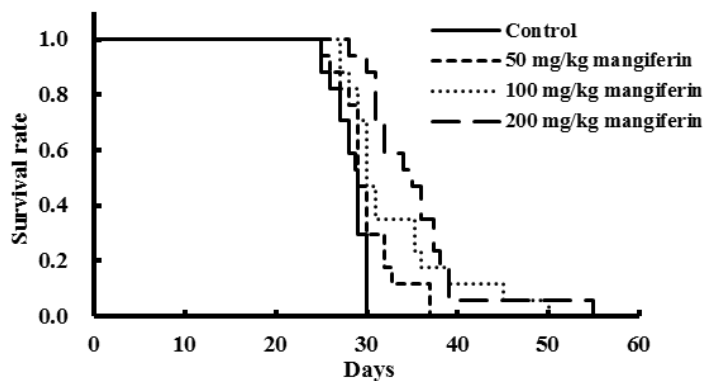


Fig. 6. Mangiferin prolongs survival in a metastasis model. B16BL6 melanoma cells were injected into the tail vein of mice. Treatment with 0.1% DMSO (Control) or mangiferin (50, 100, and 200 mg/kg) began 1 day after inoculation. The survival duration (SD) was significantly longer in the mangiferin-treated group than in the control-treated group ( $p < 0.05$ , log-rank test).

## IV. 考察

がんの予後不良となる要因として転移があげられる。そのため、転移を制御することががん治療における重要なポイントである。転移性のヒト悪性黒色腫細胞株において、NF- $\kappa$ B の発現増加により細胞の転移能が亢進することが報告されている [46]。また、転移性乳癌細胞株において特異性銅キレート剤である tetrathiomolybdate により NF- $\kappa$ B の活性を阻害した結果、腫瘍増殖及び肺転移を抑制することが示されている [47]。これらの報告は、NF- $\kappa$ B が転移を抑制する標的分子として有用である可能性を示唆している。

第 1 章において、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することが明らかとなった。そこで、本章では *in vivo* における mangiferin の転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果について検討した。その結果、Mangiferin 投与により転移抑制効果及び腫瘍増殖抑制効果を認めた。さらに、mangiferin 投与群において NIK、IKK、I $\kappa$ B 活性低下及び NF- $\kappa$ B の核移行阻害が確認された。また、Akt、p38、ERK1/2、mTOR の活性動態について変化を認めなかった。このことから、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで転移及び腫瘍増殖を抑制することが示唆された。

がん転移にはがん細胞の組織浸潤能が重要であることが知られており、この浸潤についてはがん細胞が発現する MMPs が重要な役割を担っている。がん細胞は種々の MMPs を発現することで基底膜を破壊して脈管内外へと浸潤し、転移が成立すると考えられている [48]。本検討において、mangiferin は MMP-1、MMP-2、MMP-9 及び MMP-14 mRNA 発現を抑制することを示し、Type I collagenase 活性及び Type IV collagenase 活性の低下、MMP-14 の発現低下を認めた。このことから、mangiferin は MMPs の発現・活性を阻害することで転移を抑



制することが考えられる。

がん細胞の血管や標的臓器への接着も重要な要因の一つである。接着因子として主にごん細胞側に発現する VLA<sub>s</sub> が挙げられる。がん細胞は接着により周辺細胞及び ECM と情報伝達を行い、細胞機能を制御していることが知られており、転移と細胞接着およびシグナル伝達因子は密接に関連していると考えられる。本章において、mangiferin は VLA-4、VLA-5、および VLA-6 mRNA 及びタンパク発現の抑制を認めた。このことから、mangiferin は VLA<sub>s</sub> の発現を抑制することで転移を抑制する可能性が示唆された。

NF- $\kappa$ B はアポトーシスの調節を行う Bcl-2 ファミリーや IAP ファミリーなどの遺伝子発現を調節することが報告されており [49]、mangiferin 投与による腫瘍増殖の抑制には NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路の阻害によりアポトーシスが誘導された可能性が考えられる。本章より、mangiferin は PUMA、リン酸化 p53、p53 の発現増加及び Survivin、Bcl-xL の発現低下が認められ、アポトーシス誘導の指標となる Caspase-3 及び PARP1 の切断を確認した。このことから、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで PUMA、p53 の発現増加及び Survivin、Bcl-xL の発現低下を介し、活性化型 Caspase-3 及び PARP1 の切断量を増加させ、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。

本章において、control 群と比較して mangiferin 投与群において有意な腫瘍体積の減少が認められ、200 mg/kg 投与群では 17 日目において平均腫瘍体積が約 134 mm<sup>3</sup> 減少していた。また、mangiferin 投与群は有意なマウスの生存期間延長が認められ、200 mg/kg 投与群では生存期間が約 25 日間延長していた。これらは有効な結果と考えられ、mangiferin が分子標的薬としての臨床応用に期待できる。

以上のことから、mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで転移及

び腫瘍増殖を抑制し、生存期間を延長することが明らかとなった。このことから、mangiferin は転移性悪性腫瘍に対する転移・増殖を抑制する分子標的薬として有用であることが考えられる。

## 総括

本研究では、mangiferin 投与によるがん細胞に対する細胞死誘導効果及びその機序の解明を *in vitro* 及び *in vivo* にて検討した。

1. Mangiferin は NIK/IKK/NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで、多発性骨髄腫細胞株に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。現在 NIK を標的とした治療薬は臨床応用されておらず、mangiferin は新たな作用機序を有する分子標的薬として期待される。

2. Mangiferin は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制することにより、抗がん剤の感受性を高めることが示唆された。このことは、mangiferin と抗がん剤の併用が多発性骨髄腫などの NF- $\kappa$ B が恒常的に活性化している悪性腫瘍に対する新しい治療戦略として期待される。

3. Mangiferin は NIK/IKK/ NF- $\kappa$ B 経路を抑制することで転移及び腫瘍増殖を抑制し、生存期間を延長することが明らかとなった。このことから、mangiferin は転移性悪性腫瘍に対する転移・増殖を抑制する分子標的薬として有用であることが考えられる。

最後に、mangiferin が NIK を標的とした分子標的薬として臨床応用につながることを期待する。

## 引用文献

1. Sethi G, Sung B, Aggarwal B.B. Nuclear factor-kappaB activation: From bench to bedside. *Exp Biol Med*, 233, 21-31, 2008.
2. Ramakrishnan P, Wang W, Wallach D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NFkappaB- inducing kinase. *Immunity*, 21, 477-489, 2004.
3. Donato J.A, Mercurio F, Karin M. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev*, 246, 379-400, 2012.
4. Markovina S, Callander N.S, O'Connor S.L, Kim J, Werndli J.E, Raschko M, Leith C.P, Kahl B.S, Kim K, Miyamoto S. Bortezomib-resistant nuclear factor kappaB activity in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res*, 6, 1356-1364, 2008.
5. Ni H, Ergin M, Huang Q, Qin J.Z, Amin H.M, Martinez R.L, Saeed S, Barton K, Alkan S. Analysis of expression of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) in multiple myeloma: downregulation of NF-kappa B induces apoptosis. *Br J Haematol*, 115, 279-286, 2001.
6. Sung B, Ahn K.S, Aggarwal B.B. Noscaphine, a benzyloquinoline alkaloid, sensitizes leukemic cells to chemotherapeutic agents and cytokines by modulating the NF-kappaB signaling pathway. *Cancer Res*, 70, 3259-3268, 2010.

7. Nelson A.R, Fingleton B, Rothenberg M.L, Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*, 18, 1135-1149, 2000.
8. Danen E.H, Yamada K.M. Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol*, 189, 1-13, 2001.
9. Dutton-Regester K, Hayward N.K. Reviewing the somatic genetics of melanoma: from current to future analytical approaches. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25, 144-154, 2012.
10. Philip S, Bulbule A, Kundu G.C. Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem*, 276, 44926-44935, 2001.
11. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G.C. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem*, 279, 38921-38935, 2004.
12. Ritchie C.K, Giordano A, Khalili K. Integrin involvement in glioblastoma multiforme: possible regulation by NF-kappaB. *J Cell Physiol*, 184, 214-221, 2000.

13. Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, Divya H, Nishigaki I. Mangiferin in cancer chemoprevention and treatment: pharmacokinetics and molecular targets. *J Recept Signal Transduct Res*, 1, 1-9, 2014.
14. García D, Leiro J, Delgado R, Sanmartín M.L, Ubeira F.M. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) and mangiferin modulate mouse humoral immune responses. *Phytother Res*, 17, 1182-1187, 2003.
15. Shoji K, Tsubaki M, Yamazoe Y, Satou T, Itoh T, Kidera Y, Tanimori Y, Yanae M, Matsuda H, Taga A, Nakamura H, Nishida S. Mangiferin induces apoptosis by suppressing Bcl-xL and XIAP expressions and nuclear entry of NF- $\kappa$ B in HL-60 cells. *Arch Pharm Res*, 34, 469-475, 2011.
16. Sérandour A.L, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Théret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNF $\alpha$ -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology*, 41, 478-486, 2005.
17. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. *Cell*, 109, 81-96, 2002.
18. Philippe O, Rio M, Carioux A, Plaza J.M, Guigue P, Molinari F, Boddaert N, Bole-Feysot C, Nitschke P, Smahi A, Munnich A, Colleaux L. Combination of Linkage Mapping and Microarray-Expression Analysis Identifies NF- $\kappa$ B Signaling Defect as a Cause of Autosomal-Recessive Mental Retardation. *Am J Hum Genet*, 85, 903-908, 2009.

19. Takada Y, Kobayashi Y, Aggarwal B.B. Evodiamine abolishes constitutive and inducible NF-kappaB activation by inhibiting IkappaB alpha kinase activation, thereby suppressing NF-kappaB-regulated antiapoptotic and metastatic gene expression, up-regulating apoptosis, and inhibiting invasion. *J Biol Chem*, 280, 17203-17212, 2005.
20. Gomez-Bougie P, Wuillème-Toumi S, Ménoret E, Trichet V, Robillard N, Philippe M, Bataille R, Amiot M. Noxa Up-regulation and Mcl-1 Cleavage Are Associated to Apoptosis Induction by Bortezomib in Multiple Myeloma. *Cancer Res*, 67, 5418-5424, 2007.
21. Meister S, Frey B, Lang V.R, Gaip U.S, Schett G, Schlötzer-Schrehardt U, Voll R.E. Calcium channel blocker verapamil enhances endoplasmic reticulum stress and cell death induced by proteasome inhibition in myeloma cells. *Neoplasia*, 12, 550-561, 2010.
22. Luo F, Lv Q, Zhao Y, Hu G, Huang G, Zhang J, Sun C, Li X, Chen K. Quantification and purification of mangiferin from Chinese Mango (*Mangifera indica* L.) cultivars and its protective effect on human umbilical vein endothelial cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced stress. *Int J Mol Sci*, 13, 11260-11274, 2012.
23. Li H, Huang J, Yang B, Xiang T, Yin X, Peng W, Cheng W, Wan J, Luo F, Li H, Ren G. Mangiferin exerts antitumor activity in breast cancer cells by regulating matrix metalloproteinases, epithelial to mesenchymal transition, and  $\beta$ -catenin signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272, 180-190, 2013.

24. Zarnegar B, Yamazaki S, He J.Q, Cheng G. Control of canonical NF-kappaB activation through the NIK-IKK complex pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 3503-3508, 2008.
25. Hayden M.S, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 132, 344-362, 2008.
26. Desplanques G, Giuliani N, Delsignore R, Rizzoli V, Bataille R, Barillé-Nion S. Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica*, 94, 87-93, 2009.
27. Liang Y, Xu R.Z, Zhang L, Zhao X.Y. Berbamine, a novel nuclear factor kappaB inhibitor, inhibits growth and induces apoptosis in human myeloma cells. *Acta Pharmacol Sin*, 30, 1659-1665, 2010.
28. Tsubaki M, Ogawa N, Takeda T, Sakamoto K, Shimaoka H, Fujita A, Itoh T, Imano M, Satou T, Nishida S. Dimethyl fumarate induces apoptosis of hematopoietic tumor cells via inhibition of NF- $\kappa$ B nuclear translocation and down-regulation of Bcl-xL and XIAP. *Biomed Pharmacother*, 68, 999-1005, 2014.
29. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, 18, 621-663, 2000.
30. Karin M, Cao Y, Greten F.R, Li Z.W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander



to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2, 301-310, 2002.

31. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441, 431-436, 2006.

32. Che X.F, Zheng C.L, Owatari S, Mutoh M, Gotanda T, Jeung H.C, Furukawa T, Ikeda R, Yamamoto M, Haraguchi M, Arima N, Akiyama S. Overexpression of survivin in primary ATL cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in ATL cell lines. *Blood*, 107, 4880-4887, 2006.

33. du Plessis-Stoman D, du Preez J, van de Venter M. Combination treatment with oxaliplatin and mangiferin causes increased apoptosis and downregulation of NFκB in cancer cell lines. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 8, 177-184, 2011.

34. Khoo K.H, Verma C.S, Lane D.P. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nat Rev Drug Discov*, 13, 217-236, 2014.

35. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles F. Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer*, 100, 1578-1589, 2004.

36. Markovic O, Marisavljevic D, Cemerikic-Martinovic V, Martinovic T, Filipovic B, Stanisavljevic D, Zivković R, Hajder J, Stanisavljevic N, Mihaljevic B. Survivin expression in patients with newly diagnosed nodal diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *Med Oncol*, 29, 3515-3521, 2012.

37. Xu L, Yang D, Wang S, Tang W, Liu M, Davis M, Chen J, Rae J.M, Lawrence T, Lippman M.E. (-)-Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 4, 197-205, 2005.
38. Hsieh M.J, Lin C.W, Yang S.F, Chen M.K, Chiou H.L. Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF- $\kappa$ B and AP-1 activity in human liver cancer cells. *Br J Pharmacol*, 171, 3037-3050, 2014.
39. Moro N, Mauch C, Zigrino P. Metalloproteinases in melanoma. *Eur J Cell Biol*, 93, 23-29, 2014.
40. Bond M, Fabunmi R.P, Baker A.H, Newby A.C. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: An absolute requirement for transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett*, 435, 29–34, 1998.
41. Friedl P, Brocker E.B. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57, 41-64, 2000.
42. Watanabe M, Dewan M.Z, Okamura T, Sasaki M, Itoh K, Higashihara M, Mizoguchi H, Honda M, Sata T, Watanabe T, Yamamoto N, Umezawa K, Horie R. A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, 114, 32-38, 2005.

43. Cormier F, Monjanel H, Fabre C, Billot K, Sapharikas E, Chereau F, Bordereaux D, Molina T.J, Avet-Loiseau H, Baud V. Frequent engagement of RelB activation is critical for cell survival in multiple myeloma. *PLoS One*, 8, e59127, 2013.
44. Debatin K.M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 53, 153-159, 2004.
45. Min C, Eddy S.F, Sherr D.H, Sonenshein G.E. NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem*, 104, 733-744, 2008.
46. McNulty S.E, del Rosario R, Cen D, Meyskens F.L, Yang S. Comparative expression of NFkappaB proteins in melanocytes of normal skin vs. benign intradermal naevus and human metastatic melanoma biopsies. *Pigment Cell Res*, 17, 173-180, 2004.
47. Pan Q, Bao L.W, Merajver S.D. Tetrathiomolybdate inhibits angiogenesis and metastasis through suppression of the NFkappaB signaling cascade. *Mol Cancer Res*, 1, 701-706, 2003.
48. Ling H, Zhang Y, Ng K.Y, Chew E.H. Pachymic acid impairs breast cancer cell invasion by suppressing nuclear factor-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Breast Cancer Res Treat*, 126, 609-620, 2011.
49. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 27, 693–733, 2009.