

薬学研究科・薬物治療学研究室

1. 研究課題名

「アポトーシス誘導効果を有する機能性分子の探索とその作用機序の解明及び骨肉腫の血管新生におけるターゲット分子の検索」

2. 研究チームメンバー

西田 升三	近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・教授
椿 正寛	近畿大学薬学部医療薬学科薬物治療学・助教

3. 研究成果

がんは様々なシグナル伝達因子を活性化させることにより増殖、生存、転移、およびがん固有の病態を発現させる。このことから補完代替医療における医薬シーズの抗腫瘍作用を検討する上で、がん細胞でのシグナル伝達および分子標的のターゲットとなりえる因子を検索しなければならない。当研究室では天然薬物から見出した化合物のアポトーシス誘導作用および骨肉腫の血管新生におけるターゲット分子について解析したので報告する。

3-1. Mangiferin による NF- κ B 阻害を介したアポトーシス誘導効果

急性骨髄性白血病 (AML) の治療成績は現在までに改善されつつあり、この要因として新しいレジメンや看護サポートのような患者ケアの改善や腫瘍の特性を利用した抗悪性腫瘍薬の開発などが挙げられる。しかし、65 歳以下の患者の 5 年生存率は 50% 以下、65 歳以上の患者では 5 年生存率は 20% 以下であり、寛解を示した 50% 以上の患者においても再発することが示されている。さらに、抗がん剤による治療は副作用が出現するため患者の QOL は著しく低下する。

AML を治癒するために新しい治療薬の開発が現在行われており、NF- κ B は AML の新しい分子標的となる因子である。NF- κ B の恒常的活性化及び異常調節は多くの疾患に関与し、また、この活性化は腫瘍形成を促進することが知られている。NF- κ B の構成タンパクである ν -Rel は c -Rel の点突然変異であり、がん遺伝子として同定されている。さらに、NF- κ B はアポトーシス誘導経路の阻害、抗アポトーシス因子の遺伝子及びタンパク発現を誘導することが報告されている。NF- κ B の恒常的活性化及び核局在について多くの研究がなされているが、AML における NF- κ B の役割については明らかになっていない。NF- κ B の恒常的活性化及びこの活性化によって誘導される抗アポトーシス因子による細胞保護効果を明らかにすることができれば、AML の治療ターゲットとして NF- κ B は有用である可能性が考えられる。

Mangiferin、1, 3, 6, 7-tetrahydroxyxanthone-C2- β -D-glucoside (C-glucosyl xanthone)、は天然に存在するポリフェノールであり、植物において合成され、特に Thymelaeaceae families (e.g., *Phaleria cumingii*, Ongael) の葉に多く存在する。しかし、腫瘍細胞に対する効果は明らかとなっていない。今回、ヒト AML 細胞株である HL-60 細胞を用いて、mangiferin によるアポトーシス誘導効果及びその機序の解明を試みた。

まず、我々は HL-60 細胞に対し、mangiferin 添加での細胞死を誘導する濃度について検討した。Mangiferin を終濃度 10、25、50、及び 100 μ g/mL で処理し、1、2、及び 3 day 培養後の生

細胞数を測定した。この測定値を control に対する細胞生存率として表した。その結果、各濃度の 3 day 後の細胞生存率は 103.4、103.4、89.9、及び 42.4%であった。このことから mangiferin は濃度及び時間依存的に細胞死を誘導することが明らかとなった (Fig. 1A)。また、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin 添加により AML 細胞株である KG-1 細胞及び KY821 細胞に細胞死を誘導することを認めたが、NIH3T3 細胞、ST2 細胞、及び MC3T3-E1 細胞には影響を及ぼさなかった (Fig. 1B)。

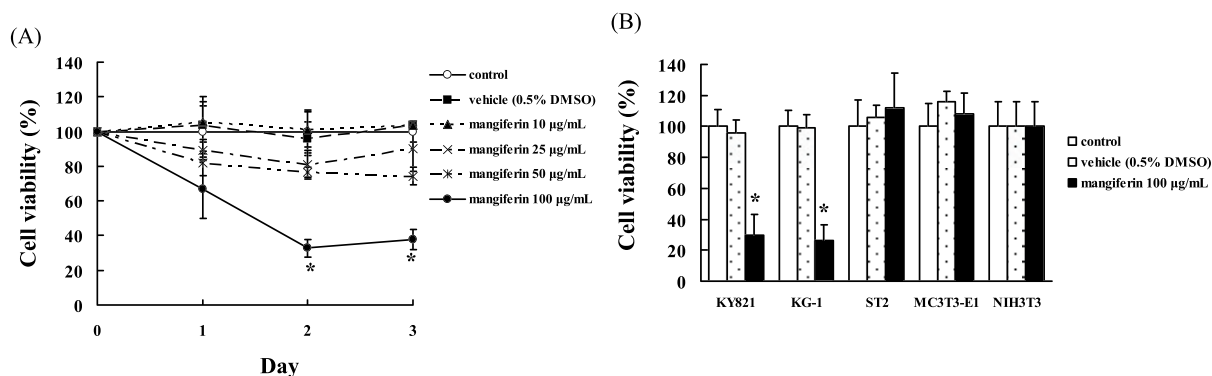


Fig. 1. The effect of mangiferin on the viability of HL-60 cells, which was measured by trypan blue dye assay. (A) The cells were treated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin for 1, 2, and 3 days. Mangiferin induced a time-dependent inhibition of cell viability. The results are expressed as a percentage of vehicle. The results are representative of 5 independent experiments. * $P < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test). (B) Effect of mangiferin on various cell lines. The cell viabilities of various cells treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin for 3 days were measured by trypan blue dye assay. The results are representative of 5 independent experiments. * $P < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

次に Mangiferin による細胞死誘導がアポトーシスであるか否か検討を行った。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin を 2 day 処理した HL-60 細胞にて検討した結果、核の断片化 (DNA fragmentation) を認めた (Fig. 2A)。また、mangiferin が caspase-3 活性を上昇させるか否か検討した結果、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin を 2 day 処理した HL-60 細胞で著しい活性化を確認した (Fig. 2B)。

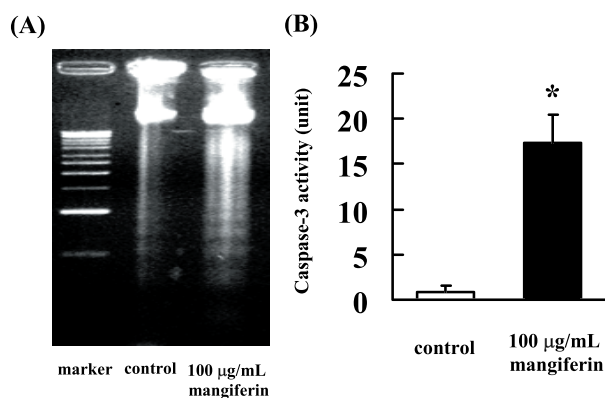


Fig. 2. (A) Mangiferin causes apoptosis of HL-60 cells. The HL-60 cells were cultured in the presence or absence of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mangiferin for 2 days. The cells were harvested, and DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis. (B) Induction of caspase-3-like activity was associated with mangiferin-induced cell death. Caspase-3 activity (measured on the basis of proteolytic cleavage of the caspase-3 substrate DEVD-AFC) is expressed in terms of picomoles per hour per mg of protein. The results are representative of 5 independent experiments. * $P < 0.01$ vs. controls (ANOVA with Dunnett's test).

Mangiferin が生存シグナル因子に対して影響を与えるか検討を行った。その結果、mangiferin は持続的に NF- κB p65 の核移行を阻害することが明らかとなった。また、I- $\kappa\text{B}\alpha$ 発現を増加することも認めた。しかし、ERK、Akt、及び p38MAPK の活性については影響を及ぼさなかった (Fig. 3A)。さらに、mangiferin が I- $\kappa\text{B}\alpha$ mRNA 発現を変化させるかについて検討した結果、I- $\kappa\text{B}\alpha$ mRNA 発現には変化が認められなかった (Fig. 3B)。

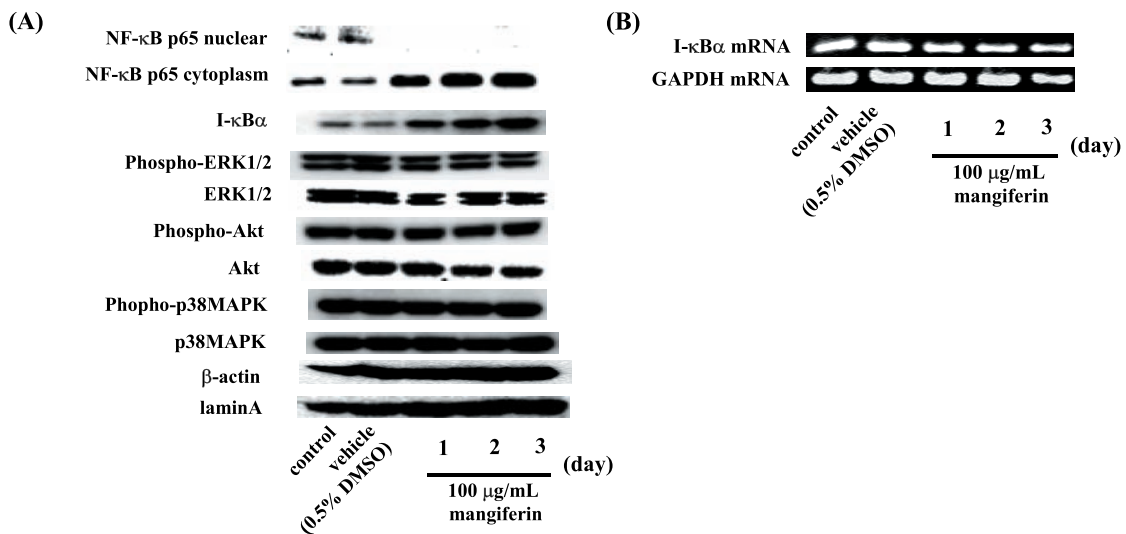


Fig. 3. Mangiferin specifically suppresses the nuclear entry of NF-κB p65 in HL-60 cells. The HL-60 cells were treated with 100 μg/mL mangiferin for 1, 2, or 3 days. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), phosphorylated p38MAPK (phospho-p38MAPK), NF-κB p65, I-κBα, ERK, Akt, and p38MAPK. (B) Equal amounts of total RNA were reverse-transcribed to generate cDNAs that were used for PCR analysis of I-κBα mRNA expression in HL-60 cells.

NF-κB 核移行阻害によるアポトーシス誘導機序を検討するため、mangiferin 処理時における Bcl-2 family タンパク及び caspase inhibitor タンパクの発現動態を確認した。その結果、Bcl-xL 及び XIAP の発現低下が認められた。また、Bcl-2、Bax、Bim、及び survivin について、変化は認められなかった (Fig. 4)。

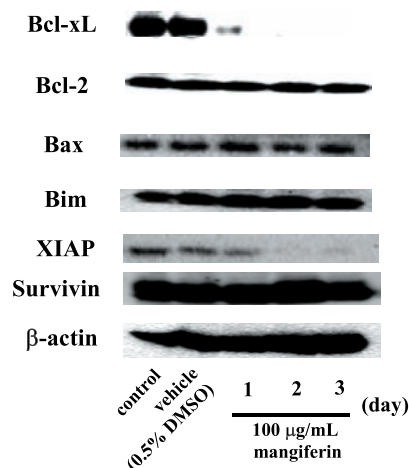


Fig. 4. Mangiferin specifically suppress Bcl-xL and XIAP expressions in HL-60 cells. HL-60 cells were treated with 100 μg/mL mangiferin for 1, 2, or 3 days. Whole-cell lysates were generated and immunoblotted with antibodies against Bcl-xL, Bcl-2, Bax, Bim, XIAP, and survivin. As an internal standard, anti-β-actin mouse monoclonal antibody was used as the primary antibody to detect β-actin protein.

以上のことから、mangiferin は NF-κB の核移行阻害を介して Bcl-xL 及び XIAP の発現を抑制することで HL60 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示唆された。これらの結果はマンギフェリンが急性骨髄性白血病をはじめとする NF-κB が活性化しているような癌に対して効果が期待できる可能性を示している。

3-2. 骨肉腫の血管新生におけるターゲット分子の検索とそれらを抑制する薬剤の検討

腫瘍血管新生は腫瘍の進行に重要な役割を担っている。固形腫瘍における血管新生は腫瘍増殖及び転移において重要な過程の一つである。骨肉腫における血管新生を促進させる因子として vascular endothelial growth factor (VEGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、hepatocyte growth factor (HGF)、及び transforming growth factor-beta (TGF- β) が知られている。そのためこれらの因子を抑制する薬剤は血管新生阻害薬として有用である可能性が期待できる。

Ras や Rho などの低分子 G タンパクは様々な遺伝子の発現に関与することが知られており、腫瘍の生存、進行、及び転移を促進することが示されている。そのため、Ras や Rho などの低分子 G タンパクは血管新生阻害薬の新しいターゲット分子となる可能性が期待できる。このことから我々は低分子Gタンパク阻害薬である statins による血管新生促進因子分泌抑制効果及びその機序についてマウス骨肉腫細胞株 LM8 細胞を用いて検討し、低分子 G タンパクが腫瘍血管新生抑制のターゲット分子となりうるか否か検討を試みた。

我々は細胞増殖を抑制しない濃度の statins 前処理において LM8 細胞での bFGF、HGF、TGF- β mRNAs 発現及びタンパク分泌を阻害することを明らかにした。また、VEGF mRNA 発現及びタンパク分泌には影響を及ぼさないことを認めた (Fig. 5)。

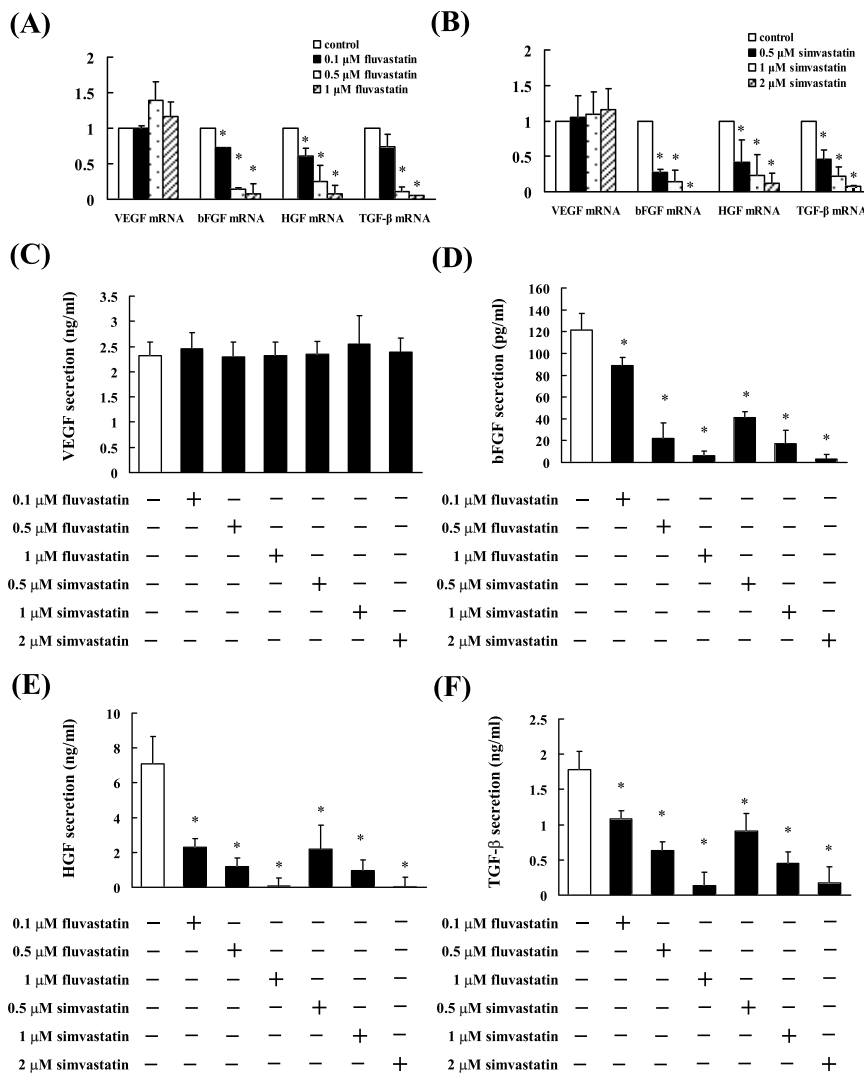


Fig. 5. Inhibitory effects of statins on the mRNA expression and protein secretion of bFGF, HGF, and TGF- β . LM8 cells were treated with various concentrations of statins for 3 days. (A,B) Total RNA was extracted, and the VEGF, bFGF, HGF, and TGF- β mRNA levels were determined by real-time PCR. The results are expressed as the test:control ratio after correction according to the GAPDH mRNA levels. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test). (C-F) LM8 cells were treated with various concentration of fluvastatin or simvastatin for 3 days. Culture supernatant was collected in culture and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. These results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test).

StatinsはHMG-CoA還元酵素を阻害するため、メバロン酸経路中で生合成されるMVA、FPP、GGPP、squalene、ubiquinone、isopentenyladenine、及びdolicholによる血管新生促進因子抑制効果の解除を確認し、メバロン酸経路中で血管新生促進因子抑制効果に関与する下流の経路について検討した。その結果、statins存在下に培養したLM8細胞では血管新生促進因子抑制効果が確認され、MVA及びGGPP併用により血管新生促進因子抑制効果が解除された (Fig. 6)。

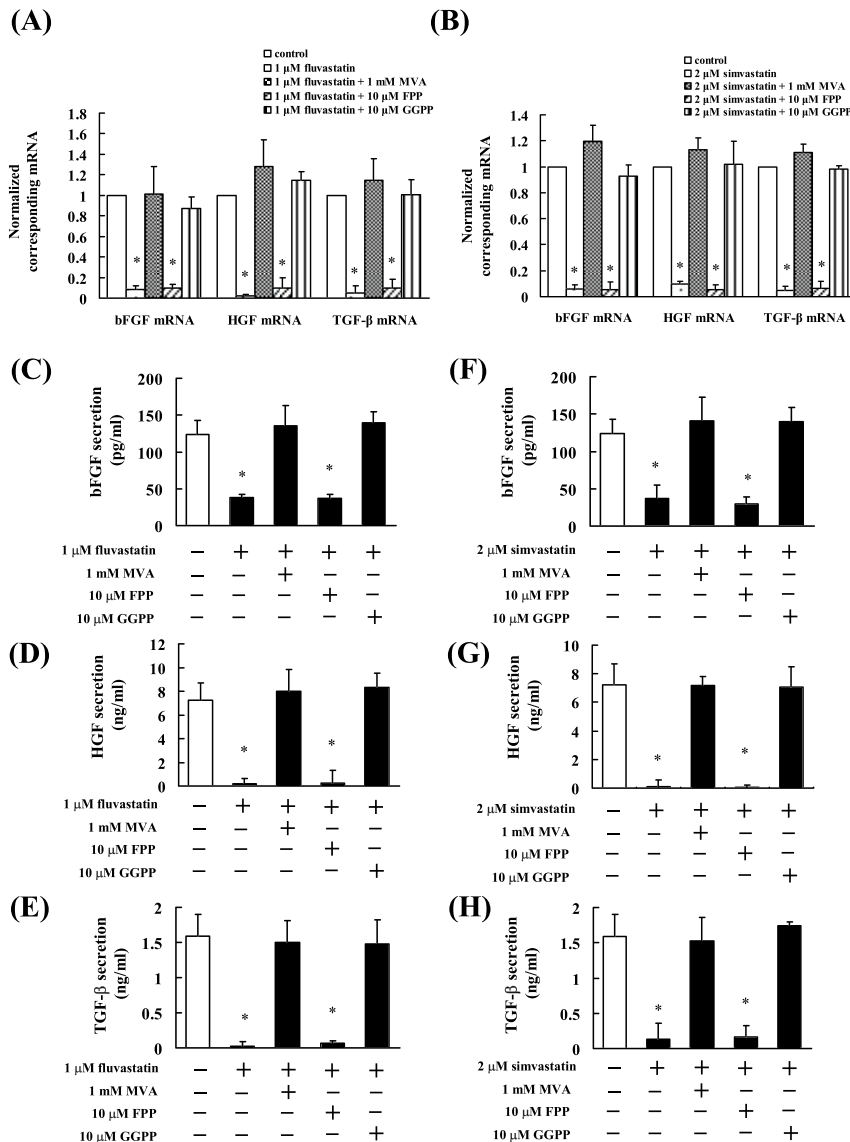


Fig. 6. bFGF, HGF, and TGF-β mRNA expression and protein secretion in LM8 cells to which statins were administered with or without the addition of MVA, FPP, and GGPP. (A,B) Total RNA was extracted, and the bFGF, HGF, and TGF-β mRNA levels were determined by real-time PCR. The results are expressed as the test:control ratio after correction according to the GAPDH mRNA levels. The results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test). (C-H) LM8 cells were treated with various concentration of fluvastatin or simvastatin for 3 days. Culture supernatant was collected in culture and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. These results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.01$ vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test).

Statinsによる血管新生促進因子抑制効果にGGPPの産生阻害が関与していることが示唆されたため、GGPPから低分子Gタンパクへの経路の関与について検討を行った。その結果、K-Ras及びRhoの細胞膜への局在が低下していることを明らかにした (Fig 7A,B)。また、K-Rasの下流シグナル伝達因子であるERK1/2及びAktの活性が減少していることも確認した (Fig. 7A,B)。そこで実際にFPP及びGGPPによりこれらの活性低下が解除されるか検討を行ったところ、GGPP併用添加のみK-Ras、Rho、ERK1/2、及びAktの抑制の解除が認められた (Fig. 7C,D)。これらのことから、statinsはGGPPの産生阻害を介してK-Ras、Rho、ERK1/2、及びAktの活

性を低下させることが示唆された。

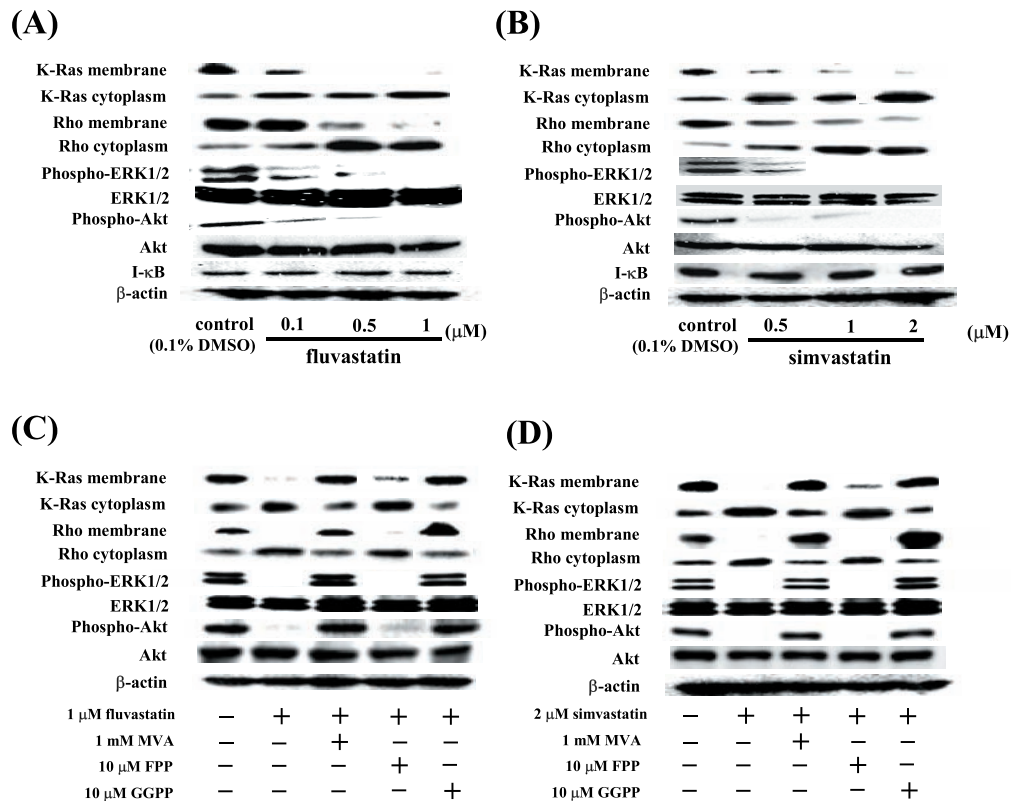


Fig. 7. Statins specifically suppress the Ras/MEK/ERK, Ras/PI3K/Akt pathways, and Rho pathway. LM8 cells were treated with various concentration of fluvastatin or simvastatin for 3 days. (A,B) K-Ras and Rho levels in the membrane and cytoplasmic fractions were determined by immunoblotting analysis, using anti-K-Ras antibody and anti-Rho antibody. Phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), ERK1/2, Akt, I-κB, and β-actin levels were determined by immunoblotting analysis of the whole-cell lysate. (C,D) K-Ras, Rho, ERK1/2, and Akt activation in LM8 cells to which statins were administered with or without the addition of MVA, FPP, and GGPP. K-Ras and Rho levels in the membrane and cytoplasmic fractions were determined by immunoblotting analysis, using anti-K-Ras antibody and anti-Rho antibody. Phosphorylated ERK1/2 (phospho-ERK1/2), phosphorylated Akt (phospho-Akt), ERK1/2, Akt, I-κB, and β-actin levels were determined by immunoblotting analysis of the whole-cell lysate.

次に statins による血管新生促進因子阻害が Ras/MEK/ERK 経路、Ras/PI3K/Akt 経路、及び Rho/ROCK 経路のいずれの抑制であるか確認するために、U0126 (MEK 阻害剤)、LY294002 (PI3K 阻害剤)、及び Y27632 (ROCK 阻害剤)を用いて検討を行った。その結果、bFGF では U0126 及び LY294002 により発現、分泌が阻害され、HGF では U0126 で発現、分泌抑制を認めた。また、TGF-β では LY294002 で発現が著しく阻害され、U0126 では若干の阻害を確認した。しかし、Y27632 ではいずれの因子の阻害も認められなかった (Fig. 8)。

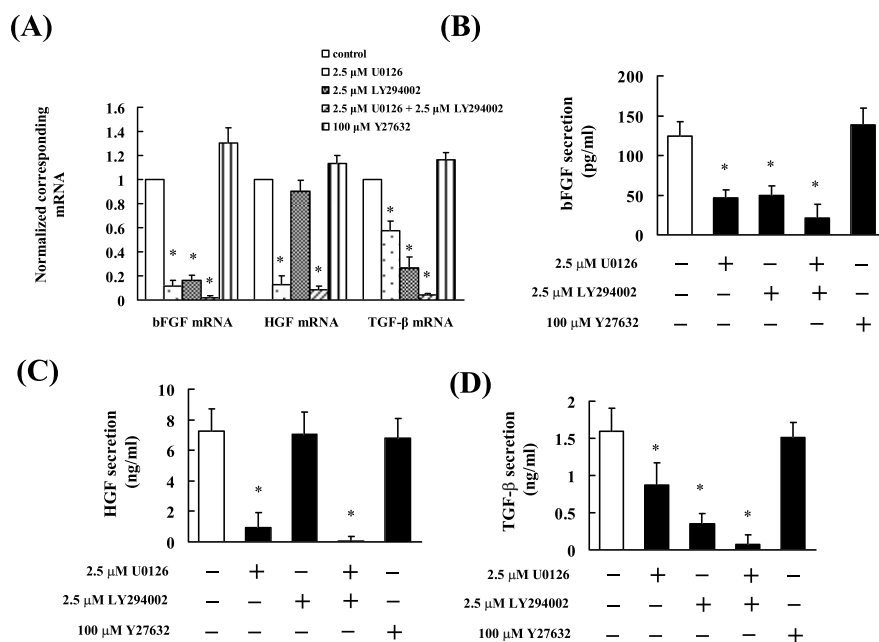


Fig. 8. U0126 and LY294002 inhibited the mRNA expression and protein secretion of bFGF, HGF, and TGF- β . LM8 cells were treated with 2.5 μ M U0126, 2.5 μ M LY294002, or 100 μ M Y27632 for 3 days. (A) Total RNA was extracted, and the bFGF, HGF, and TGF- β mRNA levels were determined by real-time PCR. The results are expressed as the test:control ratio after correction according to the GAPDH mRNA levels. The results are representative of 5 independent experiments. * p < 0.01 vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test). (B-D) Culture supernatant was collected in culture and analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. These results are representative of 5 independent experiments. * p < 0.01 vs. control (0.1% DMSO-treated) (ANOVA with Dunnett's test).

以上の結果から statins が Ras/MEK/ERK 経路及び Ras/PI3K/Akt 経路を抑制することで bFGF、HGF、及び TGF- β の発現、分泌を阻害することを示唆した。このことから statins が腫瘍血管新生における阻害薬として有用である可能性が示唆された。また、腫瘍血管新生におけるターゲット因子は Ras、ERK、Akt であり、今回得た結果からこれらを抑制するような天然物シードの検索を今後、行っていく予定である。