

財団法人 日中医学協会

2010 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

2011 年 03 月 11 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った調査・共同研究について報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名： 喬 善楼

所属機関名：中部大学

所属部署名：生命健康科学部

職名：准教授

所 在 地：愛知県春日井市松本町 1200

電 話：0568-51-1111

内線：8115



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 喬 善楼

職名：准教授

所属機関名：中部大学

部署名：生命健康科学部

中国側研究者氏名：李 曉涛

職名：教授

所属機関名：華東師範大学

部署名：生命医学研究所

4. 当該研究における発表論文等

投稿準備中。

脱共役タンパク質 UCP2 を標的にした大腸癌漢方治療法の研究

日本側研究者氏名 喬 善楼 准教授

所属機関 中部大学 生命健康科学部

中国側研究者氏名 李 曉濤 教授

所属機関 華東師範大学 生命医学研究所

要旨

食生活の欧米化に伴い、近年日本を始め、中国でも大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学における癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法などは、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。癌治療における最近の動向の1つとして、癌細胞に特有の解糖代謝亢進(ワールブルグ効果)に基づき、癌細胞だけを殺す理想的な新しい癌治療法への関心が高くなっている。我々はワールブルグ効果を制御する可能性のあるUCP2を注目し、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている漢方薬から、UCP2抑制を示した白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)を見出した。さらに、蛇舌草、半枝蓮による大腸癌細胞のミトコンドリア膜電位低下、細胞内ROSの増加、またはAktの活性低下などが明らかになった。半枝蓮、白花蛇舌草の抗癌薬物としての歴史的な背景に加え、今回明らかにしたUCP2抑制の結果は、将来UCP2に抑制作用のある成分を特定し、癌細胞だけを殺す理想の薬開発につながると期待される。[キーワード：大腸癌；漢方；UCP2]

緒言：

食生活の欧米化に伴い、日本では欧米諸国に多い大腸癌が非常に増えている。近年中国でも、大腸癌の発病率が急増している。特に沿海地区の都市部では顕著な傾向が認められる。西洋医学癌治療には、外科手術、放射線療法、抗癌剤による化学療法、ならびに免疫療法などがあり、今日の癌治療はこれらの方法を組み合わせて行われている。しかしこれらの治療法は、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常の細胞や組織にもダメージが及ぶという欠点がある。最近、癌治療における漢方薬の有効性は、さまざまな基礎研究によって、科学的に立証され、国際的に見直され大きな注目を集めている。一方、大腸癌などの細胞は、酸素が充分にある環境でも嫌氣的にエネルギー(ATP)を生産す傾向があり、ワールブルグ効果と呼ばれている。しかし、なぜ癌細胞がこのような非効率な方法によるエネルギー生産(好氣的エネルギー生産のおよそ1/20の効率)を行っているのかについては、ノーベル賞科学者オットー・ワールブルグ博士によるワールブルグ効果の発見後、80年以上も経つが、今でも未解決な部分が多い。UCP2は細胞の代謝経路(解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン)の再プログラミング[1]、またはP53を介して好氣性代謝と嫌氣性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。従ってUCP2は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。本研究は、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている生薬として、三稜(Sanleng)、莪朮(Ezhu)、白花蛇舌草(Baihuasheshecao)、半枝蓮(Banzhilian)などを用い、UCP2抑制作用のある漢方薬を探索し、更に抗大腸癌作用機序について検討したので報告する。

材料及び方法：

1、生薬としての三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を大晃生薬有限会社より購入し、それぞれ50gを精製水500mlで3時間熱湯抽出、次に抽出液を減圧下で乾燥した。乾燥品を50mMリン酸ナトリウム緩衝液に溶解し、抽出物を最終濃度100mg/mlとなるように調整した。

2、細胞および細胞培養：SW480細胞(Human colon adenocarcinoma cell line)を使用した。細胞は、10%牛胎児血清(以下FBS、GIBCO社)、streptomycin(Invitrogen社)100U/ml、およびpenicillin(invitrogen社)0.1mg/mlを含むRPMI1640(wako社)を用いて、5%CO₂内、でインキュベートした。細胞の剥離は0.25% Trypsin

1mM EDTA によった。細胞数を 2×10^5 個/ml に調整したのち、三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮を添加して 24 時間インキュベートしたものを実験系に用いた。

3、細胞内活性酸素の測定：細胞内 ROS の測定として、非蛍光の DCFH-DA (2, 7'-dichloro fluorescein diacetate) が ROS に反応して蛍光の DCF に変化することから、その蛍光を測定することによって生成された ROS 量を求めた。

4、ミトコンドリア膜電位の解析：細胞のミトコンドリア膜の電位(potential)を観察するために $2 \mu\text{M}$ rhodamine123 を含む Medium で 10 分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。結果、Mm1 細胞のミトコンドリア膜電位は M1 細胞より弱いことが明らかとなった。

5、MTT Assay: *In vitro* の抗腫瘍効果の評価は、MTT 試薬 (3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide; Sigma) を用いた。細胞浮遊液を、96 穴マイクロプレート (Costar) に生細胞 10^5 cells/0.1mL/well となるよう調整分注した上、漢方添加 (対照は漢方非添加) 後 48 時間培養し、MTT 試薬を添加して生細胞量の測定を行った。

6、Western blot 法：細胞溶解液 (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate) を用いた。総蛋白 $25 \mu\text{g}$ を 5-15% SDS-PAGE を用いて電気泳動した後、PVDF 膜に転写して 3% アルブミンで約 1 時間室温にてブロッキングを行った後、Akt/Ser473 (AnaSpec 社, 1:250), NFkB (BD Bioscience 社, 1:250)、UCP2 抗体 (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と一晩反応させた。0.05% の Tween 20 含んだ PBS にて 3 回洗浄後ペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG (SantaCruz 社, 1:1000 希釈) と室温で 1 時間反応させ、洗浄後 ECL 法にて発色させ、FUJIFILMLAS-3000 (露光時間: 2 分、検出感度: High) で検出した。

結果：

1、細胞生存率に及ぼす漢方薬の影響。三稜、莪朮、白花蛇舌草、半枝蓮添加における SW480 細胞の生存率を調べ、対照との比較から、漢方添加による増殖抑制率を算出した (図 1)。白花蛇舌草は濃度依存的に SW480 細胞の生存率が顕著に減少した。莪朮と半枝蓮処理した細胞は軽度 (30~40%) の増殖抑制作用を示したが、三稜は効果が認められなかった。

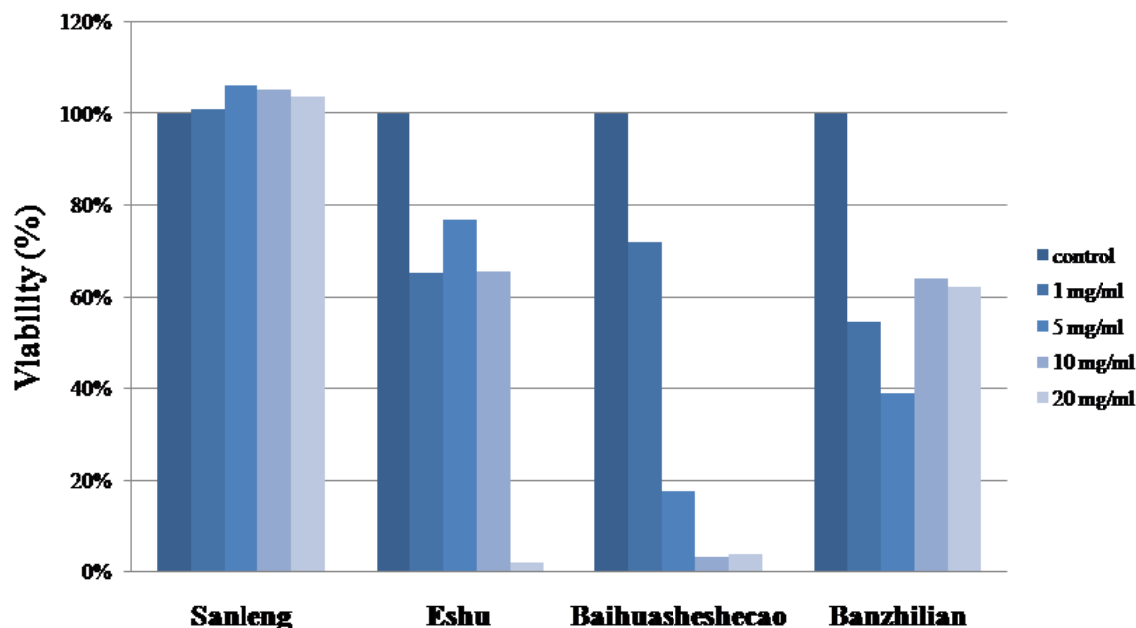


Fig. 1

2、細胞内活性酸素におよぼす漢方の影響。漢方による癌細胞抑制作用に ROS が関与するかを検討したところ、白花蛇舌草と半枝蓮添加群では、SW480 細胞内 ROS の顕著な増加が認められた (図 2)。一方三稜、莪朮処理した

場合は軽度な ROS の産生が確認できた。

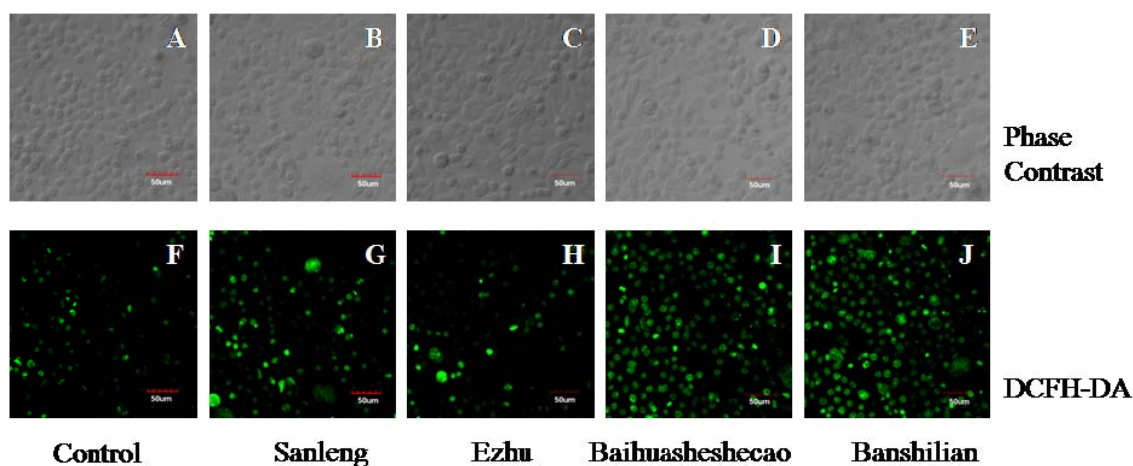


Fig. 2

3、W480 細胞のミトコンドリア膜電位におよぼす漢方の影響。MTT Assay および細胞内活性酸素産生の結果より、本研究は白花蛇舌草と半枝蓮に注目し、細胞のミトコンドリア膜の電位(potential)を観察するために 5 μM MitoTracker を含む Medium で 10 分間培養しミトコンドリアを蛍光標識した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、SW480 細胞のミトコンドリア膜電位は白花蛇舌草、半枝蓮処理によって低下することが明らかとなった (図 3)。

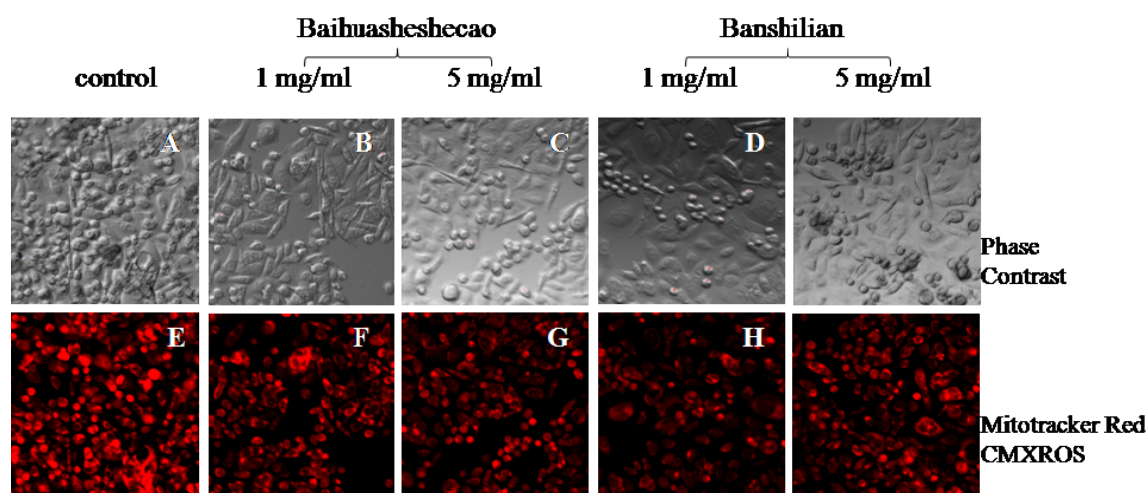


Fig. 3

4、UCP2 の発現におよぼす白花蛇舌草と半枝蓮の影響。UCP2 は白花蛇舌草と半枝蓮処理濃度が上がるにつれ発現が減少した。Akt では経時的にリン酸化が減少した (図 4)。NF-κB 蛋白量の変化は白花蛇舌草と半枝蓮添加前後で変化は認められなかった。

考察：

正常細胞は、エネルギー産生に主にクエン酸回路（クレブス回路）を用いるが、癌細胞はこれとは異なり、嫌気性解糖系を経て生産されるエネルギーに多くを依存している特異的代謝現象ワールブルグ効果がある[3]。現在癌検出法である PET 検査は、癌細胞がグルコースを正常細胞よりも大量に消費する特異的代

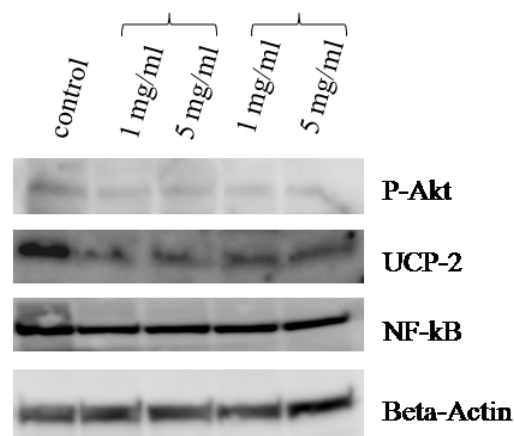


Fig. 4

謝現象を利用している。この機序については、未解決の点が多い。最近 UCP2 は細胞の代謝経路（解糖由来のピルビン酸、脂肪酸、グルタミン）の再プログラミング[1]、または P53 を介して好気性代謝と嫌気性代謝を決定する可能性が示唆されている[2]。UCP はミトコンドリア内膜に存在し、ミトコンドリアの電子伝達系と ATP の合成は、内膜を介するプロトン濃度勾配を解消する特殊なチャンネルであり、今は UCP2, 3, 4, 5 など UCP ファミリーを成している[4]。UCP2 は 1997 年クローニングされ、生体各臓器に広くその発現が認められた。UCP2 が大腸癌を含め、胆管癌[5]、甲状腺オンコサイトーマ、肝癌細胞株[6]、Hela 細胞[7]、大腸癌細胞株 (Caco2, SW480)、乳癌細胞株 (MCF7) [8]、抗癌剤耐性癌細胞株などに高発現していることが明らかとなった[9-11]。大腸癌分化度は UCP2 の発現量に比例することがわかっている[11]。我々もマウス骨髄白血病細胞において正常より UCP2 タンパクは 10 倍以上上昇する報告をした[12]。また、UCP2 ノックアウトマウスにおいて大腸癌が出来やすいことが報告され、その原因として大腸粘膜上皮に活性酸素の蓄積と NF- κ B の活性化が示唆された[13]。これらの一連の研究は、UCP2 は細胞内の活性酸素を感知・制御することにより、癌細胞増殖促進に深く関与していると推測される[14, 15]。UCP2 は大腸癌治療の新しいターゲットとして十分考えられる。UCP2 の antagonist として、漢方薬で使用されているクチナシ果物抽出エキスクチナシの主成分である (genipin) が有名、癌細胞においては UCP2 抑制効果がなかった（未発表データ）。今回、我々は、大腸癌に対する抗腫瘍作用が知られている 生薬として莢朮、三稜、白花蛇舌草、半枝蓮のうち、半枝蓮と白花蛇舌草の UCP2 抑制作用を見出した。

白花蛇舌草と半枝蓮は中国の民間療法として外傷・化膿性疾患・各種感染症や肺癌や胃癌などの治療に使用されてきた。培養癌細胞を用いた実験で、白花蛇舌草によるヒトの乳癌細胞や前立腺癌細胞の増殖を抑える効果も報告されている。半枝蓮には、癌細胞の増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、抗変異原性作用、抗炎症作用、発癌過程を抑制する抗プロモーター作用などが報告されている[16]。さらに最近、米国では進行乳癌患者に対する臨床試験も実施され、半枝蓮の有効性を示唆する結果が得られている[17]。半枝蓮の熱水抽出エキス BZL101 は嫌気性解糖系を阻害し、癌細胞をエネルギー不足に追い込む[18]。これにより癌細胞には細胞死が起こるが、正常細胞はほとんどダメージを受けない。大腸癌株 SW480 における半枝蓮と白花蛇舌草による UCP2 タンパクの低下は、酸化的リン酸化を亢進させ、ミトコンドリアに大量の ROS が産生されるため、腫瘍抑制に繋がる可能性が示唆される。

また癌細胞サバイバルメカニズムとして多くの細胞で観察されているものに、PI3K/Akt/mTOR シグナルの亢進がある[19]。Akt には 2 つの調節ドメインが知られており、PDK1 により Thr308 が、Ser473 は PDK2 などいくつかのキナーゼによりリン酸化される。このリン酸化が癌化、増殖および Bcl-2 ファミリー-Bad、caspase-9、Forkhead transcription factor、I κ B キナーゼなどのリン酸化による抗アポトーシス活性を含む Akt の活性化に重要である。従って Akt 活性の抑制は、癌化学療法の重要な標的となる。本研究では半枝蓮、白花蛇舌草処理による Akt Ser473 リン酸化レベルの低下は、大腸癌の増殖抑制にも寄与する可能性が示唆された。

以上の結果から、半枝蓮、白花蛇舌草は単味生薬としても *in vitro* での抗大腸癌作用があり、そのメカニズムとして、ミトコンドリアの UCP2 発現抑制、ミトコンドリア膜電位の低下、ROS の増加、または Akt の活性制御によるものと考えられる。

References

1. Samudio I, M Fiegl and M Andreeff (2009) Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer Res* 69:2163-2166
2. Matoba S, JG Kang, WD Patino, A Wragg, M Boehm, O Gavrilova, PJ Hurley, F Bunz and PM Hwang (2006) p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312:1650-1653
3. Warburg O, F Wind and E Negelein (1927) The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8:519-530
4. Krauss S, CY Zhang and BB Lowell (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:248-261
5. Berthiaume EP and J Wands (2004) The molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*

6. Carretero MV, L Torres, U Latasa, ER Garcia-Trevijano, J Prieto, JM Mato and MA Avila (1998) Transformed but not normal hepatocytes express UCP2. *FEBS Lett* 439:55-58
7. Mills EM, D Xu, MM Fergusson, CA Combs, Y Xu and T Finkel (2002) Regulation of cellular oncosis by uncoupling protein 2. *J Biol Chem* 277:27385-27392
8. Fine EJ, A Miller, EV Quadros, JM Sequeira and RD Feinman (2009) Acetoacetate reduces growth and ATP concentration in cancer cell lines which over-express uncoupling protein 2. *Cancer Cell Int* 9:14
9. Harper ME, A Antoniou, E Villalobos-Menuet, A Russo, R Trauger, M Vendemelio, A George, R Bartholomew, D Carlo, A Shaikh, J Kupperman, EW Newell, IA Beshpalov, SS Wallace, Y Liu, JR Rogers, GL Gibbs, JL Leahy, RE Camley, R Melamed and MK Newell (2002) Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 16:1550-1557
10. Savagner F, B Franc, S Guyetant, P Rodien, P Reynier and Y Malthiery (2001) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4920-4925
11. Horimoto M, MB Resnick, TA Konkin, J Routhier, JR Wands and G Baffy (2004) Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer. *Clin Cancer Res* 10:6203-6207
12. Nishio K, S Qiao and H Yamashita (2005) Characterization of the differential expression of uncoupling protein 2 and ROS production in differentiated mouse macrophage-cells (Mm1) and the progenitor cells (M1). *J Mol Histol* 36:35-44
13. Derdak Z, P Fulop, E Sabo, R Tavares, EP Berthiaume, MB Resnick, G Paragh, JR Wands and G Baffy (2006) Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress. *Carcinogenesis* 27:956-961
14. Mattiasson G, M Shamloo, G Gido, K Mathi, G Tomasevic, S Yi, CH Warden, RF Castilho, T Melcher, M Gonzalez-Zulueta, K Nikolich and T Wieloch (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068
15. Teshima Y, M Akao, SP Jones and E Marban (2003) Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93:192-200
16. Kim EK, KB Kwon, MJ Han, MY Song, JH Lee, YS Ko, BC Shin, J Yu, YR Lee, DG Ryu, JW Park and BH Park (2007) Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* 20:123-128
17. Perez AT, B Arun, D Tripathy, MA Tagliaferri, HS Shaw, GG Kimmick, I Cohen, E Shtivelman, KA Caygill, D Grady, M Schactman and CL Shapiro A phase 1B dose escalation trial of *Scutellaria barbata* (BZL101) for patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 120:111-118
18. Fong S, M Shoemaker, J Cadaoas, A Lo, W Liao, M Tagliaferri, I Cohen and E Shtivelman (2008) Molecular mechanisms underlying selective cytotoxic activity of BZL101, an extract of *Scutellaria barbata*, towards breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 7:577-586
19. Tsuruo T, M Naito, A Tomida, N Fujita, T Mashima, H Sakamoto and N Haga (2003) Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci* 94:15-21