

財団法人 日中医学協会

2012 年度共同研究等助成金報告書－調査・共同研究－

平成 25 年 3 月 10 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： 袁 博
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部
所属部署名： 臨床ゲノム生化教室 職名： 助教
所 在 地： 東京都八王子市堀之内 1432-1
電 話： 0426765738 内線：



1. 助成金額： 900,000 円

2. 研究テーマ

フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

3. 研究組織：

日本側研究者氏名： 袁 博	職名： 助教
所属機関名： 東京薬科大学・薬学部	部署名： 臨床ゲノム生化学教室
中国側研究者氏名： 胡 曉梅	職名： 教授
所属機関名： 中国中医科学院・西苑医院	部署名： 血液科

4. 当該研究における発表論文等

原著(*:corresponding author, †: equal contributor)

1. Iriyama, N., Yuan, B[†]., Hatta, Y., Horikoshi, A., Yoshino, Y., Toyoda, H., Aizawa, S., Takeuchi, J., Granulocyte colony-stimulating factor potentiates differentiation induction by all-trans retinoic acid and arsenic trioxide and enhances arsenic uptake in the acute promyelocytic leukemia cell line HT93A. Oncol Rep. 28, 1875-1882 (2012).
2. Iriyama, N., Yuan, B^{*}., Yoshino, Y., Hatta, Y., Horikoshi, A., Aizawa, S., Takeuchi, J., Toyoda, H., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts.

Oncol Rep. (in press).

3. Hu, X.M., Tanaka, S., Onda, K., **Yuan, B.**, Toyoda, H., Ma, R., Liu, F., Toshihiko, H., Arsenic disulfide induced apoptosis and concurrently promoted erythroid differentiation in cytokine-dependent MDS-progressed leukemia cell line F-36p with complex karyotype including monosomy 7. Chin J Integr Med. (in press).
4. Kikuchi, H., **Yuan, B***, Nishimura, Y., Imai, M., Furutani, R., Kamoi, S., Seno, M., Fukushima, S., Hazama, S., Hirobe, C, Ohyama, K., Hu, X.M., Hirano, T., Toyoda, H., Cytotoxicity of Vitex agnus-castus fruits extract and its major component, casticin correlate with differentiation status in leukemic cell lines. Chin Med. (Under review)
5. Yoshino, Y., **Yuan, B***, Aoyama, R., Murota, R., Moriyama, C., Sato, A., Toyoda, H., Enhanced cytotoxic effects of arsenite in combination with delphinidin against a human leukemia cell line, HL-60. Preparation.

著書

1. **Yuan, B***, Imai, M., Kikuchi, H., Fukushima, S., Hazama, S., Akaike, T., Yoshino, Y., Ohyama, K., Hu, X.M., Pei, X.H., Toyoda, H., Cytocidal Effects of Polyphenolic Compounds, Alone or in Combination with, Anticancer Drugs Against Cancer Cells: Potential Future Application of the Combinatory Therapy. Ed. by Tobias M. Ntuli. Apoptosis and Medicine. InTech. Rijeka, 2012, pp. 155-174.

フラボノイド併用による三酸化ヒ素の新規抗がん作用に関する基盤的研究

研究者氏名	助教 袁 博
日本所属機関	東京薬科大学薬学部
中国研究者氏名	教授 胡 曉梅
中国所属機関	中国中医科学院西苑医院

要 旨

骨髓性白血病細胞 HL-60 および急性前骨髄球性白血病(APL)細胞 NB4 に対するデルフィニジン(Del)と三酸化ヒ素(As^{III})の単独および併用効果について検討した。Del が両細胞に濃度依存的に細胞毒性を誘導したが、健常者由来末梢血単核球(PBMCs)の増殖に殆ど影響を与えなかった。Del と As^{III} の併用がそれぞれ単独処理より、 As^{III} 低感受性細胞 HL-60 のみならず、高感受性細胞 NB4 にもより強い殺細胞作用を示した。一方、PBMCs における両者の併用による殺細胞作用が顕著ではなかった。HL-60 に対する併用による殺細胞作用増強機構を検討したところ、それぞれの単独処理に比較し、両者の併用がミトコンドリア膜電位(MMP)の低下、Bid, caspase-9, -8 および-3 の活性化をより顕著に誘導した。さらに、Del がグルタチオン(GSH)枯渇剤である BSO(buthionine sulfoximine)と同様に細胞内 GSH 量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度 As^{III} に惹起された GSH の上昇が Del 存在下でコントロール以下まで低下した。また、Del が NF- κ B(nuclear factor- κ B)活性を阻害したこと、NF- κ B 阻害剤である JSH-23 および PDTC(pyrrolidine dithiocarbamate)が Del と同様に、HL-60 に対する As^{III} の細胞毒性を増強したことが観察された。これらのことから、HL-60 における Del と As^{III} の併用による殺細胞作用増強機構に、ミトコンドリア障害に起因する caspase 活性化が関与するアポトーシスの誘導が密接に関係することが考えられた。さらに、Del が NF- κ B 活性を抑制することにより、細胞内 GSH を低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。

Key Words フラボノイド、デルフィニジン、三酸化ヒ素、併用療法、HL-60

緒 言：

再発性・難治性 APL に優れた治療効果を示す As^{III} は、固形がん細胞を含む種々のがん細胞に殺細胞効果を発揮し、注目を集めている^{1,2)}。一方、その臨床副作用である APL 分化症候群などが知られている。また、APL 以外のがん細胞の低感受性が As^{III} の臨床応用拡大を阻む要因の一つとなっている。フラボノイドの一種であるアントシアニジンは、有色性のフルーツ・野菜に豊富に含まれる化合物であり、がん細胞増殖を抑制することが報告され、ヒト由来正常細胞に対する低毒性も知られている。そこで、 As^{III} の他のがん細胞への適応拡大を目的とし、 As^{III} の殺細胞効果を維持・増強しつつ、投与量の減量、副作用の軽減をもたらす可能性のあるアントシアニジンの一種である Del (Fig. 1) について詳細な検討を行った。

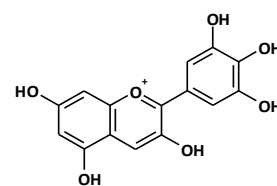


Fig. 1 Chemical structure of Del

対象と方法：

本研究では、HL-60、NB4 および PBMCs において、Del と As^{III} の単独および併用処理時に誘導される細胞増殖抑制は XTT 法で検討した。細胞周期は PI(propidium iodide)の核染色を用いた FACS 解析により検討した。ミトコンドリア膜電位(MMP)の低下は Rhodamine 123 を用いて検討した。アポトーシス誘導は Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析およびアガロースゲル電気泳動法により検討した。Bid, Bad, caspase-9, -8 および-3 の発現・活性化はウエスタンブロット(WB)法で検討した。細胞内 GSH の量は色素 MCB(monochlorobimane)を用いて検討した。NF- κ B の DNA 結合活性はゲルシフトアッセイにより評価した。尚、PBMCs を用いた研究は東京薬科大学倫理委員

会で認められており、健常者からインフォームドコンセントを得た。

結 果：

I. Del による As^{III} の細胞毒性の増強

1) 5 種類のアントシアニン (Del、マルビジン、ペオニジン、シアニン、ペラルゴニン) で HL-60、PMMCs を 48h 処理した。Table 1 で示したように、5 種類アントシアニンのうち、Del が PMBCs の増殖に殆ど影響を与えず、HL-60 に最も強い殺細胞作用を示した。また、8.0 μ M Del が約 20% の細胞増殖阻害率を示した。

2) As^{III} と Del 単独、あるいは併用で細胞を 48h 処理した。As^{III} が濃度依存的に HL-60、NB4 および PMBCs に細胞毒性を示し、それぞれの IC₅₀ は 11.2、2.4、9.9 μ M であった。さらに、8.0 μ M Del の共存下でそれぞれの IC₅₀ は 1.5、1.4、8.2 μ M となった (Table 2)。また、最も併用効果が示されたのは、5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del の併用だったので、併用による殺細胞作用増強機構を詳細に検討するために、5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del を用いた。

Table 1. IC₅₀ values for cytotoxicity induced by each anthocyanidin

	HL-60	PBMCs
Delphinidin	10.9 μ M	> 50 μ M
Malvidin	25.4 μ M	> 50 μ M
Peonidin	29.5 μ M	> 50 μ M
Cyanidin	31.6 μ M	> 50 μ M
Pelargonidin	85.2 μ M	> 100 μ M

Table 2. IC₅₀ values for cytotoxicity induced by As(III) alone and the combination of As(III) and Del

Cells	Treatment	IC ₅₀
HL-60	As(III) alone	11.2 μ M
	As(III) + delphinidin 8 μ M	1.5 μ M
NB4	As(III) alone	2.4 μ M
	As(III) + delphinidin 8 μ M	1.4 μ M
PBMCS	As(III) alone	9.9 μ M
	As(III) + delphinidin 8 μ M	8.2 μ M

II. 細胞周期に対する Del と As^{III} の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del の併用で 24、48h 処理したところ、G₀/G₁、S、G₂/M 期の細胞数は、コントロールと比較して有意な変化が認められなかった。一方、Sub G₁ 期の細胞数は、コントロールと比較して顕著に増加した (Fig. 2)。

III. MMP に対する Del と As^{III} の併用時の影響

1) HL-60 を 5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del の単独、あるいは併用で 6h 処理したところ、Del 単独処理では MMP がある程度下がったが、As^{III} 単独処理では MMP の低下が殆どなかった。また、それぞれ単独処理と比べ、併用処理では顕著な MMP 低下が認められた (Fig. 3)。

IV. Del と As^{III} の併用によるアポトーシスの誘導

1) HL-60 を 5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del の単独、あるいは併用で 12、24、48h 処理したところ、それぞれ単独処理では、わずかな DNA の断片化が確認されたが、併用では、明確な DNA の断片化が確認された (Fig. 4)。さらに、Annexin V/PI 染色を用いた FACS 解析により同様な結果が得られた。

2) HL-60 を 5.0 μ M As^{III} と 8.0 μ M Del の単独、あるいは併用で 6、12、24h 処理した後、WB 法で Bid、Bad caspase-9、8、3 の活性化を検討した。それぞれ単独処理と比べ、両者の併用では処理 6h 後において、すべてのタンパク質

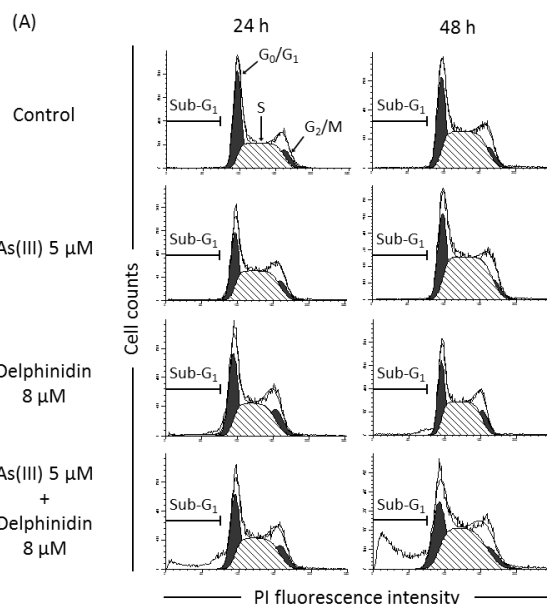


Fig. 2 Effects of As(III) and Del, alone or in combination, on cell cycle in HL-60 cells.

の活性化が観察された。また、caspase-9、8、3の活性化は処理12、24h後においても観察された。

V. Delによる細胞内GSHの量の低下

1) Delは、ポジコンのGSH枯渇剤であるBSOと同様に、有意にGSH量を低下させた。興味深いことに比較的低濃度のAs^{III}によって上昇したGSH量がDelの存在下でコントロール以下まで有意に低下した(Fig. 5A)。

2) As^{III}単独処理群と比べ、Del共存下の殺細胞作用増強効果と同様に、BSOも濃度依存的にAs^{III}の殺細胞作用を増強させた(Fig. 5B)。

VI. 細胞内GSH量の低下および殺細胞作用にNF-κB関与の可能性

1) HL-60細胞を5.0 μM As^{III}と8.0 μM Delの単独、あるいは併用で、または、ポジコンとしてNF-κB活性阻害剤であるJSH-23、NF-κB活性化誘導剤であるTNF-αでそれぞれ48h処理した。NF-κB活性はDel単独処理では、JSH-23処理と同様に抑制された。また、As^{III}単独処理によりNF-κB活性がある程度高まったが、Delの併用により顕著に低下した。これらの結果はFig. 5Aで示すGSHの結果と良く相関した。

2) JSH-23が濃度依存的にGSHの量が低下し、同時にJSH23との併用によりAs^{III}の殺細胞作用は有意に増強された。同様な現象はNF-κB阻害剤であるPDTCにおいても観察された。

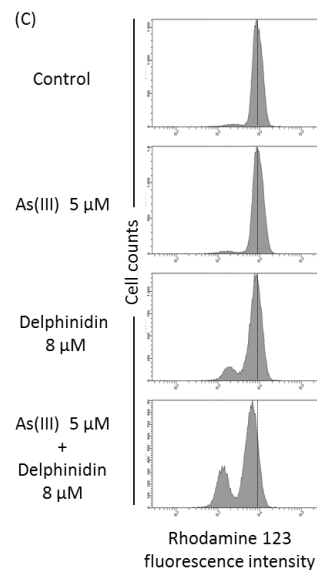


Fig. 3 Loss of MMP in HL-60 cells treated with As(III) and Del, alone or in combination.

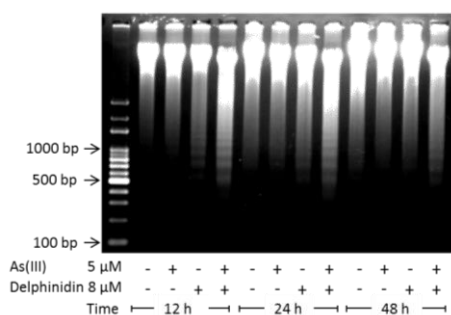


Fig. 4 Apoptosis induction of As(III) and Del, alone or in combination, in HL-60 cells.

考 察:

本論文に用いられた5種類のアントシアニジンのうち、DelがPBMCsの増殖に殆ど影響を与えないだけでなく、HL-60に最も強い殺細胞作用を示したことから、Delが腫瘍細胞選択的な殺細胞作用を有することが示唆された。NB4細胞と比べ、HL-60細胞がAs^{III}に対する低感受性であることが知られている³⁾。本研究において、HL-60およびNB4細胞におけるAs^{III}のIC₅₀はそれぞれ11.2と

2.4 μMであったことから、NB4よりHL-60はAs^{III}の低感受性細胞であることが改めて確かめられた。興味深いことに、8 μM Delの共存下で、As^{III}に対するHL-60のIC₅₀は11.2 μMから1.5 μMとなった。また、1.5 μM As^{III}と

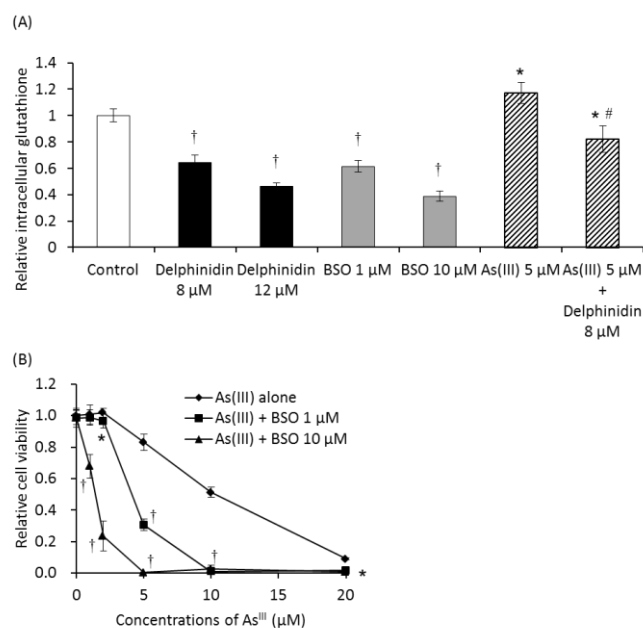


Fig. 5 Contribution of Del-induced reduction of GSH content to enhanced cytotoxic effects of As(III) in combination with delphinidin in HL-60 cells. (A) After treatment with Del, BSO, As(III), alone or in combination for 48 h, the alteration of GSH was investigated. *, $p < 0.05$ and †, $p < 0.001$ vs. control; #, $p < 0.05$, As(III)-alone vs. As(III)+Del. **(B)** After exposure to various concentrations of As(III) in the presence or absence of BSO for 48 h, cell viability of HL-60 was determined. *, $p < 0.05$ and †, $p < 0.001$, As(III)-alone vs. As(III)+BSO (1 or 10 μM).

いう濃度は臨床上で到達できる濃度であり、十分な治療効果が期待できると報告されている^{2,4)}。さらに、この併用はPBMCsより、むしろHL-60、NB4をより効率良く殺細胞作用を示すことから、今後難治性がん治療へのAs^{III}とDe1の臨床応用の可能性が考えられた。今現在、臨床上の効果については、共同研究者の胡先生が進めているところである。

As^{III}とDe1の併用が細胞周期に影響を与えず、顕著にMMPの低下、caspasesの活性化、DNAの断片化を誘導したことから、ミトコンドリア障害に起因するcaspases活性化が関与するアポトーシスの誘導が殺細胞増強機構に大きく寄与することが示唆された。また、興味深いことに、Bidの活性化が観察されたことから、intrinsic pathwayとextrinsic pathwayのcross talkがアポトーシス誘導に関与する可能性が示唆された。

GSHは亜ヒ酸と抱合体の形成や酸化ストレスの消去を通じて、亜ヒ酸の抵抗性に大きく寄与することが知られている。本研究では、5 μ Mと比較的低濃度As^{III}はGSH量を増加させ、この増加がHL-60のAs^{III}耐性に寄与している可能性が考えられた。また、De1がGSH枯渇剤であるBSOと同様に、GSH量を減少させただけでなく、比較的低濃度As^{III}に惹起されたGSH上昇を是正した。さらに、De1がNF- κ B阻害剤であるJSH-23と同様に、NF- κ Bの活性を阻害した。NF- κ Bは細胞内GSH量の調節に重要な役割をしていることが報告されている⁵⁾。以上ことから、De1がNF- κ B活性を抑制することにより、細胞内GSHを低下させ、殺細胞増強機構に寄与することが示唆された。本研究結果がDe1とAs^{III}の併用がHL-60のAs^{III}感受性を増大させ、がん治療へのAs^{III}の応用拡大につながる有用な知見を与えると思われる。

これまでに、私たちはトランスポーターであるAQP9がAs^{III}の細胞毒性、治療効果に大きく関与することを報告した^{2,6,7)}。この観点から併用時のAQP9の発現、細胞内ヒ素の蓄積を検討しているところである。

参考文献：

- [1]. Litzow M.R., Arsenic trioxide, Expert Opin. Pharmacother. **9**, 1773-1785 (2008).
- [2]. Yuan B., Yoshino Y., Kaise T., Toyoda H., Application of arsenic trioxide therapy for patients with leukemia. Ed. by Sun Hongzhe. In Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth. John Wiley & Sons, New York, 2010, pp. 263-292.
- [3]. Rojewski M.T., Baldus C., Knauf W., et al., Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation, Br. J. Haematol. **116**, 555-563 (2002).
- [4]. Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., et al., Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide, N. Engl. J. Med. **339**, 1341-1348 (1998).
- [5]. Peng Z., Geh E., Chen L., et al., Inhibitor of kappaB kinase beta regulates redox homeostasis by controlling the constitutive levels of glutathione, Mol. Pharmacol. **77**, 784-792 (2010).
- [6]. Yoshino Y., Yuan B., Kaise T., et al., Contribution of aquaporin 9 and multidrug resistance-associated protein 2 to differential sensitivity to arsenite between primary cultured chorion and amnion cells prepared from human fetal membranes, Toxicol. Appl. Pharmacol. **257**, 198-208 (2011).
- [7]. Iriyama N., Yuan B., Yoshino Y., et al., Aquaporin 9, a promising predictor for cytotoxic effect of arsenic trioxide in acute promyelocytic leukemia cell lines and primary blasts, Oncol Rep. (in press).

学会発表：

- [1] "EFMC-ISMIC 2012 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry" conference. Berlin, Germany. (2012.9.2-6)
- [2] "11th Meeting of Consortium for Globalization of Chinese Medicine" conference. Macau, China. (2012.8.20-23)

作成日：2012年3月10日