

医研 284

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation  
(アンスラキノン誘導体エモジンは extracellular signal-regulated kinase 1/2 リン酸化抑制を介して腫瘍関連血管新生を抑制する)

氏名 兼成 達也 印 

## 論文要旨

【背景】固形腫瘍の成長には持続的な血流が必要とされ、血管新生が惹起されなければそれ以上増大することができない。成人正常組織では血管新生は厳密に制御されており、また本来遺伝的に安定なため腫瘍細胞をターゲットとした治療と比べ、血管新生をターゲットとした戦略は治療抵抗性が生じにくいと考えられている。その為抗血管新生治療が有望な癌治療戦略として見なされてきている。

大黄は古来より世界中で緩下剤として使用されてきた。また中国では炎症性疾患や感染症に対しても使われており、その根茎に含まれる anthraquinone 誘導体の emodin は様々な腫瘍に対する抑制効果が報告されている。しかしながら emodin の血管新生に関する抑制効果については明らかではない。

【目的】Emodin による血管新生抑制効果を *in vitro* と *in vivo* の両方で検討し、又その作用機序についても検討することを目的とした。

【方法】*in vitro* でのヒト臍帯静脈血管内皮細胞

(HUVECs) の増殖、遊走、分化に対する emodin の影響を MTT assay, migration assay, tube formation assay のそれぞれで検討し、in vivo でのヒト大腸癌細胞株 HT29 誘導による血管新生への抑制効果を mouse dorsal air sac assay で検討した。作用機序の解明には遊走・浸潤の際に細胞外基質の融解に関わる matrix metalloproteinases (MMPs) の mRNA 発現および活性を RT-PCR と gelatin zymography で、またシグナル伝達に関わる MAP kinase のリン酸化を Western blot 法で解析した。

【結果】 HUVECs の増殖は emodin により濃度依存性に抑制され、その 50% 増殖抑制濃度は約 20  $\mu$ M であった。HUVECs の遊走と分化の指標である migration および tube 形成は 40-100  $\mu$ M の emodin で有意に抑制された。In vivo での血管新生は、emodin の 10-40 mg/kg の投与により濃度依存性に抑制された。基底膜や細胞外基質の分解に関与する MMP-9 の内皮細胞での発現及び活性は emodin により濃度依存性に抑制された。血管新生に関わるとされる細胞内シグナル伝達分子 ERK 1/2, JNK/SPAK, p38 MAP kinase のうち、ERK 1/2 のみが emodin によ

り濃度依存性にそのリン酸化が抑制された。

【考察・結語】本研究では血管新生に関わる内皮細胞の増殖、遊走、分化、基底膜の融解に関与する MMP-9 の活性を emodin はそれぞれ抑制し、また *in vivo* での血管新生反応も抑制した。emodin は癌細胞からの増殖因子の産生は抑制せず、この研究で認められた血管新生抑制効果は増殖因子非依存性であることが示唆された。その作用機序として ERK 1/2 のリン酸化阻害が認められた。内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成、MMP-9 発現には ERK 1/2 の活性化が必要なことがすでに報告されている。その点を考慮して特異的 MAPK kinase (MEK) inhibitor PD098059 を用いて migration assay と tube formation assay を行ない、その効果を比較したところ、emodin と同様の結果が得られた。本研究で emodin は内皮細胞の増殖因子からのシグナル伝達を阻害することにより血管新生に関わる各段階、すなわち内皮細胞の増殖、遊走、分化、MMP 発現を抑制し、血管新生抑制効果を発揮していることが示された。

(別紙様式第7号)

## 論文審査結果の要旨

報告番号	* <u>課程博</u> 論文博	第 号	氏名	兼城 達也
論文審査委員		審査日	平成 18年 12月 21日	
		主査教授	小杉 忠誠	
		副査教授	西巻 正	
		副査教授	加藤 誠也	
(論文題目)				
<p>Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation</p>				
(論文審査結果の要旨)				
<p>上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。</p>				
<p>1. 研究の背景と目的</p> <p>固形癌の増殖には血管新生が必要であり、この血管新生を阻害することで癌の増殖を抑制しようとする抗血管新生療法が近年有望な抗腫瘍戦略と見なされるようになった。タデ科植物の根茎由来の成分である emodin はアポトーシス誘導や細胞増殖抑制など様々な抗腫瘍効果を持ち、有望な癌治療あるいは癌予防剤と考えられている。本研究では emodin による腫瘍関連血管新生抑制効果とその作用機序を明らかにすることを目的とした。</p>				
<p>2. 研究内容</p> <p>(1) emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone) は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。</p> <p>Emodin によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) の (a) 増殖、(b) 遊走、(c) 分化に対する効果をそれぞれ MTT assay, Migration assay, Tube formation assay で評価し、(d) また in vivo での血管新生抑制効果をヒト大腸癌細胞株 HT29 を使った mouse dorsal air sac assay で検討した。(e) 基底膜の分解に関する Matrix metalloproteinases (MMPs) の産生に対する影響を RT-PCR と</p>				

gelatin zymographyで、(f)細胞のシグナル伝達に関わるMAP kinaseのリン酸化への効果についてはWestern blotで解析した。その結果、(a)MTT assayでは濃度依存性の増殖抑制が観察され、(b)Migration assayでも濃度依存性の遊走抑制が観察された。またMigration assayで総細胞数をカウントすることでemodinの遊走抑制効果がアポトーシスによるものでないことが確認された。(c)Tube formation assayでは40-100  $\mu\text{M}$ のemodinにより有意に管腔形成が抑制された (40  $\mu\text{M}$ ;  $P<0.05$ , 100  $\mu\text{M}$ ;  $P<0.001$ )。 (d)in vivoでの血管新生反応は10-40 mg/kgのemodinにより有意に抑制された (10 mg/kg;  $P<0.05$ , 40 mg/kg;  $P<0.001$ )。 (e)MMP産生についてはMMP-9のみ40-100  $\mu\text{M}$ のemodinで有意に抑制された ( $P<0.001$ )。

(2) (f)血管新生に関わるシグナル伝達分子であるERK 1/2, JNK/SPAK, p38 MAP kinaseのリン酸化についてはERK 1/2のみemodinによりそのリン酸化阻害が認められた。Emodinの効果がERK 1/2のリン酸化阻害によるものかどうか検討するため、特異的MEK inhibitor PD098059を用いて同様にmigration assay, tube formation assayを行ったがその効果はいずれもemodinによるものと同様であった。以上よりemodinは内皮細胞の増殖、遊走、分化、基底膜の分解といった血管新生に関わる各段階をそれぞれ抑制し、さらにin vivoでの血管新生反応も抑制した。その作用機序としてERK 1/2のリン酸化阻害によることが示された。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

emodinによる腫瘍関連血管新生抑制効果を検討した研究は過去に類が無く、癌治療および癌予防物質候補としての新たな知見を示した。またその抑制メカニズムの一端を明らかにしたことは国際的にも評価されるものであると判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。
  - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。