

## 「私の研究歴」

悪性腫瘍（特に小児悪性腫瘍）に対する確定診断と予後因子の検索及びその新規治療薬の開発研究

鈴木 孝<sup>1)</sup>

Takashi SUZUKI

<sup>1)</sup> 日本大学薬学部臨床医学研究室

*Laboratory of Clinical Medicine, School of Pharmacy, Nihon University, 7-7-1 Narashinodai, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, Japan.*

### Abstract

#### **Research on Analysis of Final Diagnosis and Prognostic Factors, and Development of New Therapeutic Drugs for Malignant Tumors (Especially Malignant Pediatric Tumors)**

The result of treatment for malignant pediatric tumors including leukemia is improving by conventional multimodal treatment with strong chemotherapy, surgical resection, radiotherapy, and bone marrow transplantation. However, the patients of advanced neuroblastoma, metastatic Ewing's sarcoma family of tumor (ESFT), and metastatic osteosarcoma have an extremely poor prognosis till now. Therefore, novel therapeutic strategies are urgently needed to improve the prognoses of these patients. Apoptotic cell death is a key mechanism for normal cellular homeostasis. Intact apoptotic mechanisms are pivotal for embryonic development, tissue remodeling, immune regulation, and tumor regression. Genetic aberrations disrupting programmed cell death often underpin tumorigenesis and drug resistance. Moreover, it has been suggested previously that apoptosis or cell differentiation proceeds to spontaneous regression in early stage neuroblastoma. Therefore, apoptosis or cell differentiation is a critical event that expects the prognoses of patients. We extracted many compounds from some natural plants (*Angelica keiskei*, *Alpinia officinarum*, *Lycaria puchury-major*, *Aniba gardneri*, and *Brassica rapa*, *et. al.*) or synthesized cyclophane pyridine, indirubin derivatives, vitamin K3 derivatives, burchellin derivatives, and GANT61, and examined the effects of apoptosis, cell differentiation, and cell cycle by using these compounds for neuroblastoma and ESFT cell lines comparing with normal cells. Some compounds were very effective for these tumor cells. These results suggest that they may be applicable as an efficacious and safe drug for the treatment of malignant pediatric tumors.

**Keywords** : malignant pediatric tumors; tumor suppressor gene; prognostic factor; natural plants; apoptosis; cell differentiation

## I. はじめに

悪性腫瘍の中で小児悪性腫瘍（白血病を含む）は，化学療法，放射線療法，外科療法，造血幹細胞移植療法などの集学的治療の進歩によって，白血病やウイルス腫瘍（腎腫瘍）を始めとして，早期の悪性腫瘍に対する治療成績（5年生存率）はかなりの改善が得られている。その一方で，進行神経芽腫（advanced neuroblastoma; NB）は5年生存率が30%程度<sup>1)</sup>，骨・軟部組織から発生するユーイング肉腫（Ewing's sarcoma family of tumors; ESFT）で遠隔転移症例は5年無病生存率が22%で予後が不良である<sup>2)</sup>。更に，10代～20代の若年者に発症する骨肉腫（osteosarcoma; OS）は5年生存率が70%程度になったとはいえ，遠隔転位症例は未だに予後が不良である<sup>3)</sup>。また，NB，ESFT，横紋筋肉腫（Rhabdomyosarcoma; RMS），悪性リンパ腫（malignant lymphoma; ML）は，小円形細胞腫瘍（small round cell tumors）群に属していてその診断に苦慮するが，確定診断がつけば的確な治療に繋がる。

そこで，腫瘍を正確に診断したり，造血幹細胞移植療法に用いる骨髄中の微少残存病変（minimal residual disease; MRD）を的確に検出したり，腫瘍の遺伝子発現検索によって予後を判定したり，腫瘍発生の原因遺伝子を検索することは的確な治療を行う上で極めて重要である。更に，これらの腫瘍細胞の中で起きているアポトーシス誘導や神経の分化誘導に関与するシグナル伝達機構や細胞周期の異常を解明すれば，各腫瘍に特化したより効果的な化合物（治療薬）の開発に繋がる。

研究は，日本大学医学部附属板橋病院小児科，国立がんセンター（現国立がん研究センター）研究所分子腫瘍学部，留学先の米国南カリフォルニア大学付属ロサンジェルス小児病院血液腫瘍科（University of Southern California affiliated Childrens Hospital Los Angeles, Hematology/Oncology）などの研究と，これらに関連して行った日本大学薬学部臨床医学研究室での研究成果まとめたものである。

## II. 研究成果について

### （1）小児悪性腫瘍に関して

#### 1) 神経芽腫（NB）に関して

##### 1. 癌抑制遺伝子検索に関する研究

小児 NB は小児悪性腫瘍の約 10% を占め，前述したように進行 NB は依然として予後が不良である<sup>1)</sup>。このため，腫瘍の発症に関連して腫瘍細胞内で起きている遺伝子変異の検索が必要であった。この当時，網膜芽細胞腫（retinoblastoma; Rb）

は第 13 染色体長腕 (13q) に欠失が認められ、13 q からは癌抑制遺伝子の Rb 遺伝子がクローニングされ<sup>4)</sup>、ウイルムス腫瘍 (Wilms tumor; WT) は第 11 染色体単腕 (11p) の欠失領域 (11p13) に癌抑制遺伝子の存在が示唆された<sup>5)</sup>。しかし、NB に対する癌抑制遺伝子のクローニングはされていなかった。そこで、癌抑制遺伝子検索のために、染色体上に分布する RFLP (restriction fragment length polymorphism: DNA を制限酵素で切断したときの断片の長さの多型) を利用して、分子レベルで染色体欠失の同定を行った。病期の異なる 14 症例の NB に対して、19 個の染色体を覆う 29 個の polymorphic DNA marker (プローブ) を用いて loss of heterozygosity (LOH) の検索を行った。その結果、従来から言われていた 1p や 13q の欠失ではなく、第 14 染色体長腕 (14q) に高頻度の染色体欠失領域 (14 q 32~qter) を見出した<sup>6)</sup>。これによって、この領域に癌抑制遺伝子が存在する可能性が示唆された。その後、大腸癌において第 14 染色体 (14) に高頻度の欠失領域が認められ、病期が進行する症例ほどその頻度が高くなることが報告され<sup>7)</sup>、腎臓癌においても 14 q に高頻度の欠失領域 (14q31~q32) が見つかり<sup>8)</sup>、大腸癌と同様に進行症例ほどその頻度が高いことが報告された<sup>9)</sup>。その後、プローブを増やして症例数も 27 例に増やして検索を行ったところ、14q の欠失は 25 例中 10 例 (40%) であった<sup>10,11)</sup>。従って、この領域には腫瘍の転移に関与する遺伝子の存在が想定された。今後は、この領域から癌抑制遺伝子をクローニングする必要があると考えている。

## 2. 予後因子としての *trkA* 遺伝子発現と神経分化誘導に関する研究

胎生期の神経冠 (neural crest) を起源とする NB において、NGF の受容体として機能している *trkA* 遺伝子があり、この遺伝子発現 (mRNA) の高低が神経の分化や予後に関与する可能性がある。そこで、病期の異なる 80 症例の NB 臨床検体を用いて *trkA* mRNA 発現を検索したところ、発現量を高・中・低に分けると、高発現症例で予後が良く、低発現症例で予後が極めて不良であった。また、病期を進行症例 (Stage IV) に限っても、同様の結果が得られた。更に、予後と強い相関のある *MYCN* 遺伝子との関係では、その遺伝子の非増幅症例で検索しても同様の結果であった。このことから、NB における *trkA* mRNA 発現の高低は *MYCN* 遺伝子増幅の有無に関係なく、独立した予後因子となり得ることがわかった<sup>12,13)</sup>。*TrkA* mRNA 発現の高低は、病理組織学的な NB 細胞の分化度と予後との関係がわかっている嶋田分類とも関連していた<sup>12,13,14)</sup>。これによって、この遺伝子が高発現のものは神経分化が進んでいて、低発現のものは未分化のままであり、未分化のものであっても *TrkA* 受容体以降のシグナル伝達が進めば、高分化腫瘍 (良性腫瘍) に分化させることができることが想定された。このことが、細胞の分化誘導やアポトーシス誘導における cell signal transduction に関与する化合物の検索に結び付いていった。

### 3. 神経芽腫 (NB) 患者の造血幹細胞移植療法に用いる骨髄中の微少残存病変 (MRD) の検出と予後因子検索

進行 NB は、化学療法、外科治療、放射線治療、造血幹細胞移植療法などの集学的治療が施行され、予後の改善が計られてきたが、十分な改善が得られたとはいえない。そこで、造血幹細胞移植療法に用いる自家骨髄中の NB 細胞の混入を的確に検出するために、ヒトの骨髄細胞では発現がなく、NB 細胞でその発現が認められる tyrosine hydroxylase (TH) を用いて、その有用性について検討した。その結果、TH mRNA が陰出されたのは NB 細胞培養株と NB 症例の検体のみであった。このことから、NB 患者の骨髄や末梢血中に残存する NB 細胞 (MRD) を的確に確定でき、更にその陰出感度は  $1/10^6$  個できることもわかった<sup>15)</sup>。従って、この方法を用いれば、造血幹細胞移植療法に用いる自家骨髄や自家末梢血幹細胞中の MRD 検出には極めて有用であることがわかった<sup>15)</sup>。また、NB、ESFT、RMS、ML は小円形細胞腫瘍 (small round cell tumors; SRCT) 群に属し、TH mRNA の検索を行うことによってこの遺伝子発現が認められれば、SRCT の中から NB を診断する上にも有用である可能性が示唆されたばかりでなく、予後因子としての関与も示唆された<sup>15)</sup>。

### 4. 神経芽腫 (NB) に対する治療薬の開発研究

進行 NB は、5 年生存率が約 30% と極めて予後が悪い。一方で、予後良好な NB は、腫瘍は 1 歳未満で自然退縮して消失してしまう。この退縮にはアポトーシス誘導や分化誘導が関与している。このアポトーシス誘導や分化誘導に着目をして以下の研究を行った。

#### ① 神経分化誘導薬に関する開発研究

##### A. 神経芽腫 (NB) に対する protein tyrosin phosphatase (PTP ase) 阻害薬の神経分化誘導に関する研究

神経細胞は神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) に対する高親和性受容体である TrkA 以降のシグナル伝達系が関与して、神経細胞の分化が誘導される<sup>16)</sup>。神経冠 (neural crest) をその起源とする NB もその例外ではない<sup>16)</sup>。TrkA の発現が認められる NB 細胞培養株を用いて実際に NGF で刺激するすると、シグナル伝達系の下流にある *c-fos* の発現が誘導されるばかりでなく、新たに神経突起の伸張が認められるようになる<sup>17)</sup>。また、膜 1 回貫通型 protein tyrosine kinase (PTK) である TrkA は、TrkA にそのリガンドである NGF が結合すると自身の持つチロシンキナーゼ活性が上昇し、それに伴って細胞内領域の 5 つのチロシン残基 (Y490, Y670, Y674, Y675, Y785) が自己リン酸化され、その内、Y490 (Tyr<sup>140</sup>) の tyrosine がリン酸化されると、growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) などの Src homology 2 domain (SH2) ドメインを持つアダプタータンパク質が結合する。そうするとグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide

exchange factor; GEF) である Sos が細胞膜付近へと移動し、細胞膜付近に局在する Ras の GDP-GTP 交換反応により Ras を活性化させる。活性化した Ras は、mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) family である v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 (Raf) と結合して活性化する。Raf は mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) family である MEK (MAPK/ERK kinase) をリン酸化して活性化し、さらに活性化した MEK は mitogen-activated protein kinase (MAPK) family である extracellular signal-regulated kinase (ERK) をリン酸化する。活性化した ERK は細胞質から核内に移行して serum response element (SRE) に結合し、核内の初期発現遺伝子群 (immediate early response genes; IEGs) である *c-fos* などの発現を誘導する<sup>18,19</sup>。誘導された c-Fos タンパク質はロイシンジッパーを介して c-Jun と結合し、ヘテロ 2 量体 (activator protein 1; AP-1) を作って染色体制御部位の DNA enhancer 配列 (TGACTCA) と特異的に結合する。そして、growth associated phosphoprotein 43 (GAP-43) 遺伝子やその下流にある遺伝子の転写を誘導して、様々なタンパク質の発現を制御して細胞の分化、生存維持、増殖抑制、アポトーシス誘導などを通じて諸種の生体機能に関わる<sup>20, 21</sup>。そこで、本研究では *trkA* の発現の低い症例は予後が不良なことが分かっているため<sup>12,13,22,23</sup>、この遺伝子が低発現でも、PTPase による Tyr<sup>140</sup> のリン酸化の分解を保護すれば、その後の NGF/TrkA シグナルが最終段階まで伝わるのではないかという発想のもとに、Tyr<sup>140</sup> のリン酸化体を構造内にある環状構造で覆い、PTPase による分解作用からこのリン酸化体を保護することのできる cyclophane pyridin (CPPy) を合成した<sup>17</sup>。CPPy の合成に関しては本学有機化学研究室の三宅宗晴前准教授が行い、提供して頂いた。NB 細胞培養株 2 つ (NB-39: *trkA* の発現があつて NGF 刺激によって *c-fos* 発現が誘導されない細胞株, IMR-32: *trkA* の発現があつて NGF 刺激によって *c-fos* 発現が誘導される細胞株) を用いて、CPPy 単独投与、NGF 単独投与、いずれも投与しない、CPPy 投与後 NGF を投与における Tyr<sup>140</sup> のリン酸化: p-Trk (Y490) の経時的变化を観察した。Tyr<sup>140</sup> のリン酸化は NGF 単独投与でも誘導されるが、CPPy 投与後 NGF 投与では IMR-32 が 5 min 後、NB-39 が 10 min 後をピークとして、NGF 単独投与よりも更なる p-Trk (Y490) の誘導がなされた。また、CPPy 投与後 NGF 投与では、NB-39 細胞において神経細胞への分化度、神経突起の伸張・分枝とも細胞の分化が促進され、形態学的変化においても分化誘導効果が証明された<sup>17</sup>。本研究によりこの化合物 (CPPy) は NB に対する新規治療薬になる可能性が高いため、日本大学産官学連携知財センター (NUBIC) を通じて特許申請した (日本大学 W02003/078410)。

## B. 神経芽腫 (NB) に対するビタミン K3 誘導体の抗腫瘍活性・分化誘導活性の検

## 索

Vitamin K (VK) はヒトにとって必須の栄養素であり、血液凝固因子のプロトロンビン (II), VII, IX, X の活性化に重要な役割を演じている<sup>24)</sup>。近年、この VK に抗腫瘍活性があることが報告されていて<sup>25)</sup>、化学的に合成された vitamin K3 (VK3; menadione) は、肝細胞癌、喉頭癌、咽頭癌、乳癌、膀胱癌、血液系の腫瘍に対して抗腫瘍効果があることが *in vitro* の実験で報告されている<sup>25,26)</sup>。VK3 誘導体のうち、VK3-COOH は TrkA のリン酸化を阻害せずに PTPase の活性を阻害することわかった<sup>27)</sup>。このことから、NGF/TrkA のシグナル伝達が下流に伝わり、初期発現遺伝子である *c-fos* 遺伝子の発現を促し、更に後期発現遺伝子の *GAP-43* 遺伝子を発現させて、未分化な NB 細胞を分化誘導することがわかった。また、VK3 誘導体の1つである VK3-OCH<sub>3</sub> は、NB 細胞培養株 (IMR-32, LA-N-1, SK-N-SH, NB-39) に対して、正常細胞株 (HDF, HUVEC) に較べてより低濃度で抗腫瘍活性を示し、腫瘍細胞選択性が認められた。Western blot 法を用いた経時的なタンパク質発現の検索では、*hemo oxygenase* (HO) -1 発現に続いてその下流にある *caveolin1-1* が HO-1 発現に引き続いて誘導される。*caveolin1-1* は *cyclin A* を抑制して細胞増殖を抑制すると言われているため<sup>28)</sup>、VK3-OCH<sub>3</sub> 投与後の細胞周期の検索では濃度依存的に G<sub>2</sub>/M arrest が生じていた。従って、VK3-OCH<sub>3</sub> は HO-1 が関与する経路によってアポトーシスを誘導し、更に細胞周期を G<sub>2</sub>/M arrest の状態に誘導することによって NB 細胞を傷害したり、細胞増殖を抑制したりしている可能性が示唆された<sup>29)</sup>。このことは、VK3 誘導体の構造の違いにより細胞内シグナル伝達機構が異なることを意味している。VK3-OCH<sub>3</sub> は、VK3-COOH とは異なる機序で NB 細胞に作用する新しい分子標的薬となる可能性があることがわかった<sup>29)</sup>。

## C. リョウキョウ (*Alpinia officinarum*) 由来抽出物の NB 細胞に対する抗腫瘍活性の検索

良姜 (リョウキョウ: *Alpinia officinarum*) はショウガ科の多年草の根茎で、芳香性健胃薬、香辛料などとして一般に用いられ、漢方薬 (安中散, 丁香柿蒂湯) にも配合されている<sup>30)</sup>。近年、リョウキョウの成分の中でも diarylheptanoid 骨格を有する成分は、ヒト中枢神経膠芽腫細胞、ヒト肝腫瘍細胞、ヒト乳腺腫瘍細胞に対して傷害活性を持つことが報告されている<sup>31)</sup>。研究に用いたすべての diarylheptanoid は、本学薬学部旧セルフメディケーション学研究室の安川憲前教授より提供して頂いた。これまでの我々の研究で、リョウキョウ由来の diarylheptanoid 15 種の全てに NB 細胞に対する傷害活性が認められ、そのうち、7-(4"-Hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-4E-hepten-3-one [compound (Cpd) 1] と (5R)-5-Methoxy-7-(4"-hydroxy-3"-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone (Cpd 2) には特に強い細胞障害活性が認められ

た<sup>32)</sup>。いずれの化合物も高濃度 ( $10^{-6}$  M) で caspase-3, -9 を活性化し, 更に S 期と subG<sub>1</sub> 期の細胞比率の増加によって S 期停止とアポトーシスが誘導されて胞傷害活性を示した。また, Cpd 1 は低濃度 ( $10^{-8}$  M) で分化誘導効果 (神経突起の伸長・分枝) を示した<sup>33)</sup>。Diarylheptanoid の中で, Cpd 1, Cpd 2 は高濃度で細胞障害活性を示し, Cpd 1 は低濃度で分化誘導効果を示すユニークな化合物であった。そのため, 日本大学産官学連携知財センター (NUBIC) を通じて特許申請を行った [NUBIC (日本大学) 11363]。

## ② 神経芽腫 (NB) に対する天然物由来化合物及び化合物誘導体における新規治療薬開発研究

### A. アシタバ (*Angelica keiskei*) 由来抽出物 (xanthoangelol, isobavacalcone) の NB 細胞に対する抗腫瘍活性の検索

アシタバ (*Angelica keiskei*) は, 主として太平洋沿岸に自生している日本原産の植物である。古くから利尿, 緩下, 強壯, 催乳を目的に用いられ, 現在では健康食品として注目を浴びている。このアシタバには chalcones, coumarins, flavonoids などの様々な化合物が含まれていて, 主な chalcone である 4-hydroxyderricin は HL60 (白血病細胞培養株), CRL1579 (悪性黒色腫細胞培養株), A549 (肺癌細胞培養株), AZ521 (胃癌細胞培養株) に対して強い細胞障害活性を示し, 特に HL60 に対しては初期アポトーシスを誘導して caspase-3, -8, -9 の活性化をもたらすことを報告した<sup>34)</sup>。通常の DNA 損傷型の抗腫瘍薬も, NB に対して同様に p53 を介したミトコンドリアの経路でアポトーシスを誘導することが知られている<sup>35)</sup>。アシタバの葉や茎に含まれる xanthoangelol, isobavacalcone は, 本学理工学部の秋久俊博元教授に提供して頂いた。まず, xanthoangelol は cisplatin などの抗腫瘍薬に抵抗性の NB-39 細胞に対して強い細胞傷害活性を示し, p53 タンパク質の増加を引き起こさないことから, cisplatin とは異なる p53 非依存的なメカニズムでアポトーシスを誘導したと考えられた<sup>36,37)</sup>。一方, isobavachalcone のアポトーシス誘導メカニズムは, caspase-9 の活性化を伴うミトコンドリア経路であることが明らかとなったが, 腫瘍選択性のメカニズムについては明らかにすることができなかった<sup>38)</sup>。

### B. *Licaria puchry-major*, *Aniba gardneri* 由来抽出物の白血病細胞及び NB 細胞に対する抗腫瘍活性の検索

我々の研究において着目した *Licaria puchry-major* 及び *Aniba gardneri* は, クスノキ科 (Lauraceae) リカリア属の植物である。*L. puchry-major* の種子は, ブラジルでは “puchuri” または “pixuri” と知られていて, 健胃薬や抗菌薬として使用されたり<sup>39)</sup>, *A. gardneri* の樹皮は関節リウマチの治療に用いられたいしている。過去の生理活性成分の探索研究により, *L. puchry-major* の種子, *A. gardneri* の樹皮に

neolignans が含まれることが明らかになっている。この neolignans の抗腫瘍活性については、モクレン科ホウノキ (*Magnolia obovata* Thunberg) の樹皮から得られた honokiol に白血病細胞に対するアポトーシス誘導作用が報告されている<sup>40)</sup>。また、その他の neolignans では、ビャクダン科植物の高木から得られた (7*R*, 8*R*)-5-*O*-demethylbilagrewin においてヒト前骨髄球性白血病細胞およびヒト肺腺癌細胞に対し抗腫瘍効果が認められるという報告がある<sup>41)</sup>。従って、neolignans は抗腫瘍薬としての可能性を持つ化合物であるといえる。以下の研究に用いた neolignans は、本学薬学部有機化学研究室の内山武人教授に提供して頂いた。研究の結果、*L. puchrymajor* から抽出した neolignans は、NB 細胞に対し細胞傷害活性を示した。特に ferrearin C 及び compound (Cpd) 6 (rel(7*S*, 8*S*, 1'*R*, 2'*S*)-2-hydroxy-3,4-dimethylenedioxy-4'-oxo- $\Delta$  4', 8'-8.1', 7.0.2'-neolignan) は顕著な細胞傷害活性が認められ、アポトーシス誘導能を持つことが明らかとなった。更に、このアポトーシスのメカニズムは HO-1 を介したミトコンドリア経路によることが示された。これにより一連の HO-1 による p21 の活性化に加え、p21 による HO-1 の活性化という positive feedback の相互関係も寄与し、結果的に HO-1 シグナル伝達の増幅から、p38-MAPK を介したミトコンドリア経路のさらなる活性化に繋がっているものと考えられた。このことから、本研究により ferrearin-type の neolignans は NB 細胞に対して、HO-1 を介した強いアポトーシス誘導を引き起こすことが明らかとなった。この結果は、NB 細胞に対して ferrearin-type の neolignans がアポトーシス誘導活性を示す最初の報告であり、NB に対する新たな分子標的治療戦略としての可能性を示すものである<sup>42,43)</sup>。このことから、Cpd 4 (ferrearin C) , Cpd 6, Cpd 10 (armenin) の neolignans を日本大学産官学連携知財センター (NUBIC) を通じて特許申請した (WO 2003/073870, 2003.)。

### C. Burchellin 誘導体の NB に対する抗腫瘍活性の検索

Burchellin は *Aniba burchellii* (クスノキ科) などに含まれる neolignane 化合物である<sup>44-46)</sup>。Neolignane 化合物には、肺癌、乳癌、白血病などに対して抗腫瘍作用を示すことが報告されている<sup>47)</sup>。研究に用いた 5 つの burchellin 誘導体は、本学薬学部有機化学研究室の内山武人教授が合成し、提供して頂いた。これらの burchelli 化合物のうち 1 つは、ミトコンドリア膜の透過性変化により cytochrome c などの放出に関わる Bax, Bcl-2 の発現変動が起こり、caspase-9, -3 の活性化し、survivin や XIAP の抑制による caspase-7 や cleaved PARP の発現の増加、survivin の発現低下、更に ERK のリン酸化の抑制が加わってアポトーシスを誘導する有用な化合物であることがわかった<sup>48)</sup>。

#### D. *Brassica rapa* 由来抽出物の NB に対する抗腫瘍活性の

飛騨紅（ヒダベニ：*Brassica rapa* L.）はアブラナ科に属する植物であり，その含有成分には，flavonoids, phenylpropanoids, chalcones などが知られている。その chalcones の 1 つ（4'-O- $\beta$ -d-Glucopyranosyl-4-hydroxy-3,3',5-trimethoxychalcone）は，NB 細胞に対して caspase を介したアポトーシス誘導によって細胞障害活性を示す有効な化合物であることがわかった<sup>49)</sup>。

## 2) ユーイング肉腫（Ewing's sarcoma family of tumors; ESFT）に関して

### 1. ESFT におけるキメラ遺伝子の検出に関する研究

ESFT は骨・軟部組織から発生する悪性腫瘍であるが，NB や RMS と同じく SRCT 群に含まれて確定診断に苦慮する。ESFT で認められる *EWS-EST* キメラ遺伝子の種類を推定し，最終的にはこの RT-PCR 産物を sequence 解析することによって ESFT の臨床診断に用いた。これによって，ESFT を的確に診断し，ESFT に有効な治療選択に結び付けることができた。また，antisense oligodeoxynucleotide を用いた *EWS-FLI-1* キメラ遺伝子発現の抑制実験から，この *EWS-FLI-1* キメラ遺伝子は細胞周期に関与して，細胞増殖に関与している可能性が示唆された<sup>50-52)</sup>。この成果は，以下の治療薬の開発研究を進めるのに役立った。

### 2. ESFT に対する治療薬の開発研究

ESFT の細胞培養株である SK-N-LO は，*EWS-FLI-1* キメラ遺伝子を持つ腫瘍細胞である。この細胞株に Hh シグナル阻害薬の GANT61 を作用させたところ，最も強い細胞傷害活性作用を示した<sup>53)</sup>。また，GANT61 は SK-N-LO 細胞株に対してアポトーシスによる細胞死を誘導し，抗アポトーシス関連タンパク質である survivin の発現量を低下させた。しかし，caspase 3, 7, Bcl-2 などのアポトーシス関連タンパク質に対してはその発現量に変化がないことから，GANT61 のアポトーシス誘導への関与は caspase 非依存的な経路で起こっていることが示唆された<sup>53)</sup>。更に，GANT61 は GLI2 阻害作用により p21 の発現が亢進し，cyclin A の発現が阻害されて，claspin の発現量低下や切断型 PARP (cleaved-PARP) の発現増加を伴った結果，細胞周期中の G<sub>1</sub> 期から S 期への移行及び DNA の修復が阻害されて不可逆的な細胞周期停止が起こり，アポトーシス誘導に至ったことが考えられた。以上のことから，GANT61 に代表される GLI 阻害薬は ESFT 細胞をアポトーシス誘導して細胞死に導き，ESFT に対する新規治療薬開発のための重要な化合物となり得ることを示した<sup>53)</sup>。

## (2) その他の腫瘍に関して

### 1. 骨肉腫（Osteosarcoma; Os）に関して

パラフィン包埋組織より mRNA を抽出して RT-PCR 法によって survivin mRNA の発現量の検索ができるばかりでなく、この遺伝子発現が OS において予後因子になることを示した<sup>54,55</sup>。一方、移植肺癌細胞で VEGF mRNA 発現におけるサーカディアンリズムを調べると 2:00 AM~10:00 AM に高く、それ以降の時間は発現が急激に低下することがわかっている<sup>56</sup>。このことを考えると、実際の臨床の場では、化学療法は朝 9 時以降に開始される。VEGF mRNA の発現から見ると、すでにその発現が下がってきている時間帯に化学療法を行っている可能性がある。それは、OS で初診時と化学療法後でサーカディアンリズムを描かない survivin mRNA は化学療法後にその発現量が低下しているのに対して、VEGF mRNA 発現量には変化がないことからも示唆される。このことは、サーカディアンリズムで本来発現量が高い時間帯に化学療法を行わず、午前中の発現量が低下してきている時間帯に化学療法を施行している可能性がある。従って、VEGF mRNA 発現量のサーカディアンリズムを考慮しながら、化学療法の時間を決定することは治療上極めて重要であることがわかる。これらの結果から、時間薬理的な観点から治療時間を考慮し、化学療法の最適な時間を決定できる可能性を示した。

## 2. 子宮体癌 (Uterine neoplasma)、乳癌 (Breast cancer) について

時間に不規則な勤務をする女性は、子宮体癌や乳癌の発症が多いことが指摘されている。時計遺伝子が何らかの遺伝子発現に影響を及ぼしている可能性がある。サーカディアンリズムの観点から、腫瘍化・悪性化のメカニズム解析を行っている。

## III. 今後の研究への展望

小児悪性腫瘍 (特に NB、ESFT、Os) に関しては臨床検体や細胞培養株を用いた的確な診断への手助け、各腫瘍内で起きている細胞内シグナル伝達機構 (アポトーシ誘導, 分化誘導, 細胞周期など) の解明を通じてその機構を修復したり, 阻害したりする化合物が悪性腫瘍の治療薬としてシード化合物になる可能性がある。その他の腫瘍 (子宮体癌, 乳癌) に関しては, その遺伝子発現やサーカディアンリズムに着目して時間薬理的な治療効果の最適化の研究を行ってきた。今後も化合物の特許申請を考慮しながら, 日本では死亡原因の第 1 位を占める悪性腫瘍に対して, より効果的な化合物が臨床応用されるように少しでも予後が改善されるように何らかの形で研究努力を続けていきたいと考えている。

## IV. 謝辞

これらの研究は, 日本大学医学部附属板橋病院小児科, 国立がんセンター (現国立がん研究センター) 分子腫瘍学部 (リサーチレジデント), 米国留学による南カリフォルニア大学付属ロサンジェルス小児病院血液腫瘍科 (University of Southern California

affiliated Childrens Hospital Los Angeles, Hematology/Oncology) (ポストドクトラルフェローシップ) などでの研究と、それに関連した日本大学薬学部臨床医学研究室で行った共同研究・指導研究の成果をまとめたものである。この間、研究のご指導を頂いた日本大学医学部小児科系小児科分野の麦島秀雄元教授、国立がんセンター(現国立がん研究センター)の寺田雅昭元総長、同研究所生物学部の横田淳元部長、USC 付属ロサンジェルス小児病院血液腫瘍科の Robert C. Seeger 教授に感謝致します。また、日本大学薬学部臨床医学研究室に在職中に共同研究で研究のために貴重な化合物・臨床検体を提供していた、日本大学理工学部の秋久俊博元教授、同理工学部の仁科淳良教授、同文理学部の藤本康雄元教授、同薬学部有機化学研究室の宮入伸一前教授、三宅宗晴前准教授、内山武人教授、斎藤弘明講師、同薬学部薬品分子化学研究室の本橋重康教授、鳥山正晴教授、三浦基文准教授、同薬学部旧セルフメディケーション学研究室の安川憲前教授、同薬学部の牧野三津子元研究員、同医学部病理学教室の根本則道前教授、同整形外科学教室の大幸俊三元教授にも感謝致します。当研究室で研究と学生指導に直接関わった、同薬学部臨床医学研究室の浅見覚准教授、故田畑恵市准教授に感謝致します。同臨床医学研究室で研究を行い、大学院博士後期課程卒業生の大塚進氏、葉山達也氏、中山敏光氏、北野徹氏、松本高広氏、栗田雅弘氏に感謝致します。紙面の関係で名前を割愛させていただきますが、本研究室の 21 名の大学院博士前期課程卒業生、201 名の卒業研究生(うち新 6 年制卒業生 13 名)にも感謝致します。

これらの研究成果の一部(12 件)は、日本大学産官学連携知財センター(NUBIC)を通じて特許申請しました。

## V. 利益相反

開示すべき利益相反はありません。

## VI. 引用文献

- 1) Mosse Y. P., Deyell R. J., Berthold F., Nakagawara A., Ambrose P. F., Monclair T., Chon S. L., Pearson A. D., London W. B., Matthay K. K., *Pediatr. Blood Cancer*, **61**, 627-635 (2014).
- 2) Grier H. E., Krailo M. D., Tarbell N. J., Link M. P., Fryer C. J., Pritchard D. J., Gebhardt M. C., Dickman P. S., Perlman E. J., Meyers P. A., Donaldson S. S., Moore S., Rausen A. R., Vietti T. J., Miser J. S., *N. Engl. J. Med.*, **348**, 694-701 (2003).
- 3) Briccoli A., *Ann Chir*, **53**, 207-214 (1999).
- 4) Friend S. H., Horowitz J. M., Gerber M. R., Wang X. F., Bogenmann E., Li F. P., Weinber R. A., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84(24)**, 9059-9063 (1987).

- 5) Koufos A., *Nature*, **309**, 170-172 (1984).
- 6) Suzuki T., Yokota J., Mugishima H., Okabe I., Ookuni M., Sugimura T., Terada M., *Cancer Research*, **49**, 1095-1098 (1989).
- 7) Young J., Leggett B., Thomas L., Buttenshaw R., Searle J., Chenevix-Trench G., *Oncogene*, **8(3)**, 671-675 (1993).
- 8) Mitsumori K., Kittleson JM., Itoh N., Delahunt B., Heathcott RW., Stewart JH., McCredie MR., Reeve AE., *J Pathol.*, **198(1)**, 110-114 (2002) .
- 9) Aimov A., Sundelin B., Wang N., Larsson C., Bergerheim U., *Int J Oncol.*, 25(1), 179-189 (2004) .
- 10) Takayama H., Suzuki T., Mugishima H., Fujisawa T., Ookuni M., Schwab M., Gehring M., Nakamura Y., Sugimura T., Terada M., Yokota J. *Oncogene*, **7**, 1185-1189 (1992).
- 11) Suzuki T. *The J. of the Japan Pediatric Society*, **96-12**, 2656-2663 (1992).
- 12) Suzuki T., Bogenmann E., Shimada H., Seeger RC., *J. of Natl. Cancer Institute*, **85(5)**, 377-384 (1993).
- 13) Miyake M., Suzuki T., Shimada H., Stram D., Seeger R. C., *Prog Clin Biol Res.*, **385**, 163-168, (1994).
- 14) Shimada H., Chatten J., Newton W. A., Sachs N., Hamoudi A. B., Chiba T., Marsden HB., Misugi K., *JNCI*, **75(2)**, 405-416 (1981).
- 15) Ootsuka S., Asami S., Sasaki T., Yoshida Y., Nemoto Y., Shichino H., Chin M., Mugishima H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, 30(12), 2294-2299 (2007) .
- 16) Brodeur G. M., *Cell Tissue Res.*, **372(2)**, 277-286 (2018) .
- 17) Yamaguchi Y., Tabata K., Asami S., Miyake M, Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30(4)**, 638-643 (2007).
- 18) Wang Z., Wang M., Carr B. I., *Journal Cellular Physiology*, **183**, 338-346 (2000).
- 19) Kar S., Adachi T., Carr B. I., *Journal Cellular Physiology*, **190**, 356-364 (2002) .
- 20) Langlois W. J., Sasaoka T., Saltiel A. R., Olefsky J. M., *J Biol Chem*, **270**, 25320-25323 (1995) .
- 21) Van der Geer P., Hunter T., Lindberg R. A., *Annual Review of Cell Biology*, **10**, 251-337 (1994) .
- 22) Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N. J., Azar C. G., Cantor A. B., Brodeur G. M., *N Engl J Med.*, **328(12)**, 847-854 (1994) .
- 23) Kogner P., Barbary G., Dominici C., Castello M. A., Raschella G., Persson H., *Cancer Res.*, **53(9)** (1993) .
- 24) Cranenburg E. C., Schurgers L. J., Vermeer C., *Thromb Haemost*, **98**, 120-125 (2007) .
- 25) Lamson D. W., Plaza S. M., *Altern Med Rev*, **8**, 303-318 (2003) .
- 26) Akiyoshi T., Matzono S., Sakai M., Okamura N., Matsuyama K., *Cancer Chemother*

- Pharmacol*, **65**, 143-150 (2009).
- 27) Nakayama T., Asami S., Ono S., Miura M., Hayasaka M., Yoshida Y., Toriyama M., Motohashi S., Suzuki T., *Jpn J Clin Oncol*, 39(4), 251-259 (2008).
  - 28) Kim H. P., Wang X., Nakao A., Kim S. I., Murase N., Choi M. E., Ryter S., W., Choi A. M. K., *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 11319-11324 (2005).
  - 29) Kitano T, Yoda Y., Tabata K., Miura M., Toriyama T., Motohashi S., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **35(4)**, 617-623 (2011).
  - 30) Okuda T., *Medicinal Plants second editionn., Hirokawashoten*, 198-200 (2005) .
  - 31) An N., Zou Z., Tian Z., Luo X., Yang S., Xu L., *Fitoterapia*, **79**, 27-31 (2008) .
  - 32) Sun Y., Tabata K., Matsubara H., Kitanaka S., Suzuki T., Yasukawa K., *Planta Med* , **74**, 427-431 (2008) .
  - 33) Tabata K., Yamazaki Y., Okada M., Fukumura K., Shimada A., Sun Y., Yasukawa K., Suazuki T., *Anticancer Res*, **29**, 4981-4988 (2009) .
  - 34) Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Iizumi M., Schneider S., Ogasawara K., Mukainaka T., Iwatsuki K., Suzuki T., Nishino H., *Cancer Lett*, **201**, 133-137 (2003) .
  - 35) Cui H., Schroering A., Ding H. F., *Mol Cancer Ther*, **1**: 679-686 (2002) .
  - 36) Tabata K., Motani K., Takayanagi N., Nishimura R., Asami S., Kimura Y., Ukiya M., Hasegawa D., Akihisa T., Suauki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28(8)**, 1404-1407 (2005).
  - 37) Motani K., Tabata K., Kimura Y./, Okano S., Shibata Y., Abiko Y., Nagai H., Akiyohisa T., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **31(4)**, 618-626 (2008) .
  - 38) Nishimura R., Tabata K., Arakawa M., Ito Y., Kimura Y., Akihisa T., Nagai H., Sakuma A., Kohno H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **30(1)**, 1878-1883 (2007) .
  - 39) Carlini E. A., de Oliveira A. B., de Oliveira G. G., *J Ethnopharmacol*, **8**, 225-236, (1983) .
  - 40) Hibasami H., Achiwa Y., Katsuzaki H., Imai K., Yoshioka K., Nakanishi K., Ishii Y., Hasegawa M., Komiya T., *Int J Mol Med*, **6**, 971-673 (1998) .
  - 41) Matsuo Y., Mimaki Y., *Chem Pharm Bull*, **58**, 587-590 (2010) .
  - 42) Uchiyama T., Tabata K., Nomura S., Kaneko Y., Fujimoto Y., Suzuki T., *Biol Pharm Bull*, **32**, 1749-1753 (2009) .
  - 43) Hayama T., Tabata K., Uchiyama T., Fujimoto Y., Suzuki T., *J Nat Med*, **65**, 431-439 (2011).
  - 44) Lima O. A., Gottlieb O. R., Magalhães M. T., *Phytochemistry*, **11**, 2031-2039 (1972) .
  - 45) Cabral M. M., Azambuja P., Gottlieb O. R., Kleffmann T., Garcia E. S., Schaub G. A., *Parasitol Res*, **87**, 730-735 (2001) .
  - 46) Ribeiro A. B., Bolzani V. S., Yoshida M., Santos L. S. Eberlin M. N., Silva D. H. S., *J Braz Chem Soc*, **16**, 526-530 (2005) .

- 47) Ma W. W., Kozlowski J. F., McLaughlin J. L., *Parasit Vectors*, **7**, 172-182 (1991) .
- 48) Kurita M., Takada T., Wakabayashi N., Asami S., Ono S., Uchiyama T., Suzuki T., *Anticancer Res*, **38**, 855-862 (2018) .
- 49) Kurita M., Nakayama T., Asami S., Uchiyama T., Ono S., Nishina A., Koketsu M., Suzuki T., *J Pharmacol. Thera. Res*, **(2)-3**, 6-12 (2018) .
- 50) Kojima T., Asami S., Chin M., Yoshida Y., Mugishima H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **25(8)**, 991-994 (2002) .
- 51) Yoshino N., Kojima T., Asami S., Motohashi S., Yoshida Y., Chin M., Shichino H., Yoshida Y., Nemoto N., Kaneko M., Mugishima H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **26(5)**, 585-588 (2003) .
- 52) Asami S., Chin M., Shichino H., Yoshida Y., Nemoto N., Mugishima H., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **31(3)**, 391-394 (2008) .
- 53) Matsumoto T., Tabata K., Suzuki T., *Biol. Pharm. Bull.*, **37(4)**, 633-641 (2014) .
- 54) Osaka E., Suzuki T., Osaka S., Yoshida Y., Sugita H., Asami S. Tabata K., Hemmi A., Sugitani M., Nemoto N., Ryu J., *Acta Histochem. Cytochem.*, **39(3)**, 95-100 (2006) .
- 55) Osaka E., Suzuki T., Osaka S., Yoshida Y., Tabata K., Hemmi A., Sugitani M., Nemoto N., Ryu J., *J. orthopedic Res.*, **1**, 116-121 (2007) .
- 56) Koyanagi S., Kuramoto Y., Nakagawa H., Aramaki H., Ohdo S., Soeda S., Shimeno H., *Cancer Research*, **63(21)**, 7277-7288 (2003) .