

# 腎癌細胞の運動抑制効果を有する生薬エキス及び 生薬含有化合物の探索

申請代表者	村田 純	秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科	教授
所外共同研究者	岩下 淳	秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科	助教
所内共同研究者	横山 悟	病態制御部門病態生化学分野	助教

## 【報告セミナー要旨】

**【背景】** 主に腎皮質の尿細管細胞から発生する腎細胞癌は、他臓器への転移性が高く、その発生頻度については、喫煙量や動物性脂肪摂取量との間に正の相関が認められること、また人種別では欧米人に多いことなどから、生活環境、生活習慣がその発生に深く関与していると考えられている。近年、我が国では食生活を中心に生活習慣が益々欧米化していることから、今後増加が予想される癌種の一つである。

**【目的】** 我々はこれまでに、腎機能の調節に重要な種々の神経ペプチドのうち、[Arg<sup>8</sup>]-vasopressin (AVP) が、マウス Renca 腎癌細胞の運動性を阻害するとともに、この癌細胞の細胞間接着を増強すること、その細胞間接着の増強には細胞間接着分子 E- 及び Ksp-cadherin の発現亢進が関与していること、更にその発現亢進には bHLH-LZ 型の転写因子である TFEC の発現誘導が重要であること、等を明らかとしてきた。

本研究では、癌転移阻止に重要な細胞間接着の増強に基づく細胞運動抑制に焦点を当て、マウス Renca 腎癌細胞の運動抑制効果を有する生薬エキスを *in vitro* にて探索した。

**【材料・方法】** レポーター遺伝子アッセイは、細胞間接着分子 E-cadherin のプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターベクターを Renca 腎癌細胞へ導入した後、生薬エキス (100 µg/ml) を添加して 48 時間後のルシフェラーゼ活性を指標とした。細胞間接着は、振盪条件下で 90 分培養後の細胞凝集塊形成を指標に解析した。細胞の運動性は、Transwell chamber を用い、フィブロネクチンへの接触走化性の原理を適用した膜透過法にて解析した。細胞増殖は、WST-8 を用いた比色検定により解析した。

**【結果・考察】** 細胞間接着分子 E-cadherin のプロモーター配列を用いたレポーター遺伝子アッセイにて 114 種類の生薬エキスをスクリーニングした結果、カクコン、オウゴン、クジン、サイコ及びカンゾウの 5 種類に E-cadherin プロモーター活性の顕著な促進効果が認められた。これら 5 種類の生薬エキスについて、Renca 腎癌細胞の細胞間接着に及ぼす影響を解析した結果、カクコン及びオウゴンに細胞間接着増強効果が見られた。さらに、これら生薬エキスについて Renca 腎癌細胞の運動性に及ぼす影響を膜透過法にて解析したところ、カクコンでは未処置 Control の約 50%、オウゴンでは 70% にまで運動性が顕著に抑制された。なお、カクコン及びオウゴンには、Renca 腎癌細胞の増殖抑制効果は認められなかった。

以上の結果より、カクコン及びオウゴン由来エキスは、細胞間接着因子 E-cadherin の発現亢進を介して Renca 腎癌細胞の運動性を抑制し、ひいては癌転移を阻止することが示唆された。

## ■背景・目的

これまでの様々な試みにもかかわらず、癌は依然として我が国における死因の第一位を占めている。癌により死に至る最大の要因は、癌細胞に極めて特徴的な転移という現象が存在するからである。癌が転移を形成する過程で、癌細胞の運動性は特に重要であり、転移性の高い癌細胞ほど運動性が高いことが知られている。更に、その癌細胞の運動性が高い要因の一つとして、癌細胞同士の結合性（細胞間接着）の低下による細胞の自由度の増加が考えられる。したがって、癌細胞間の接着性を増加させることにより癌細胞の運動性を抑制できれば癌転移は抑制されると考えられる。

主に腎皮質の尿細管細胞から発生する腎細胞癌は、他臓器への転移性が高く、その発生頻度については、喫煙量や動物性脂肪摂取量との間に正の相関が認められること、また人種別では欧米人に多いことなどから、生活環境、生活習慣がその発生に深く関与していると考えられている。近年、我が国では食生活を中心に生活習慣が益々欧米化していることから、今後増加が予想される癌種の一つである。

これまでに我々は、腎機能の調節に重要な種々の神経ペプチドのうち、腎臓で抗利尿作用を有する神経ペプチドのAVP([Arg<sup>8</sup>]-vasopressin)が、①マウス腎癌細胞株：Rencaの運動性を顕著に抑制すること、②その運動抑制は細胞間接着の増強に基づくものであること、③その接着増強には細胞間接着タンパク質であるE-cadherin及びKsp-cadherinの発現亢進が関与していること、④E-及びKsp-cadherinの発現亢進にはb-HLH-lz型転写因子でMITF/TFEファミリーであるTFECの発現誘導が重要であること、などを明らかとしてきた。さらに最近、Renca腎癌細胞を用いたマウスの実験的肺転移モデル実験において、AVPが腎癌細胞の肺転移を著明に抑制すること、遺伝子工学的に作製したTFEC過剰発現Renca腎癌株の肺転移能が顕著に低下すること等を見出した。

本研究では、癌転移阻止に重要な細胞間接着の増強に基づく細胞運動抑制に焦点を当て、マウスRenca腎癌細胞の運動抑制効果を有する生薬エキスを*in vitro*にて探索した。

## ■結果・考察

マウス細胞間接着分子E-cadherinのプロモーター配列を用いたレポーター遺伝子アッセイにて114種類の生薬エキス(濃度：100 µg/ml)をスクリーニングした結果、カクコン、オウゴン、クジン、サイコ及びカンゾウの5種類にE-cadherinプロモーター活性の顕著な促進効果が認められた(図1)。これら5種類の生薬エキスについて、マウスRenca腎癌細胞の細胞間接着に及ぼす影響を振盪条件下で90分培養後の細胞凝集塊形成を指標に解析した結果、カクコン及びオウゴンにAggregation indexの顕著な低下(図2)即ち、細胞間接着増強効果が見られた(図3)。さらに、これら生薬エキスについてRenca腎癌細胞の運動性に及ぼす影響を、Transwell chamberを用いてフィブロネクチンへの接触走化性の原理を適用した膜透過法にて解析したところ、カクコンでは未処置Controlの約50%、オウゴンでは70%にまで運動性が顕著に抑制された(図4)。なお、カクコン及びオウゴンには、Renca腎癌細胞の増殖抑制効果は認められなかった(図5)。

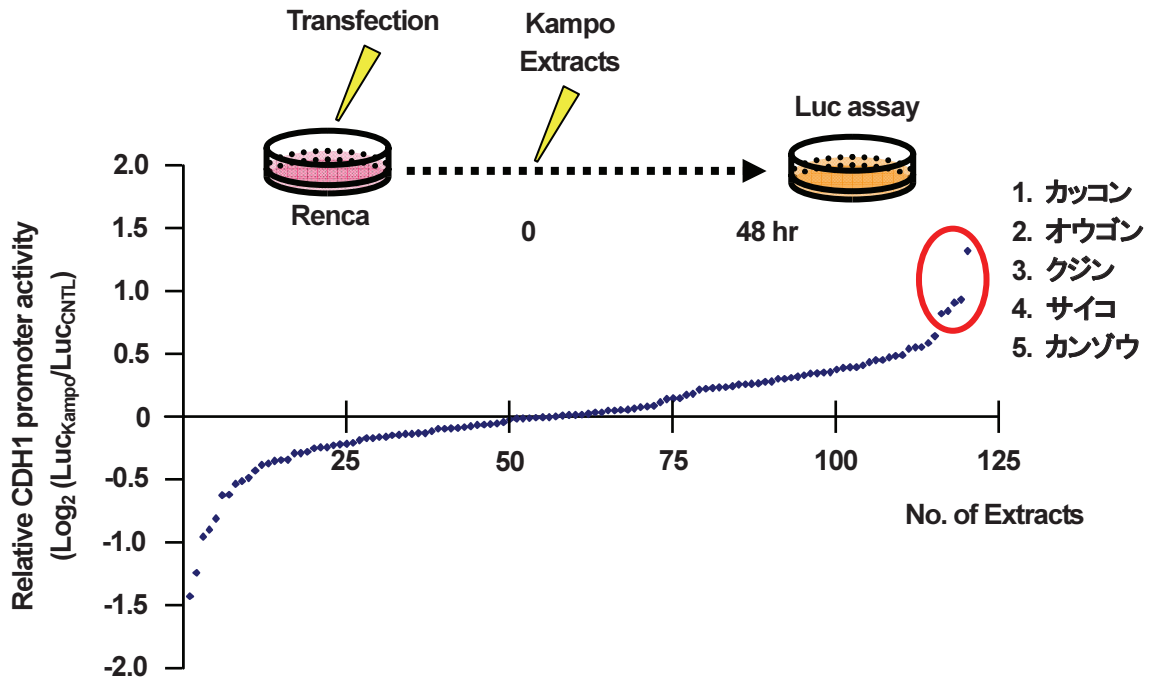
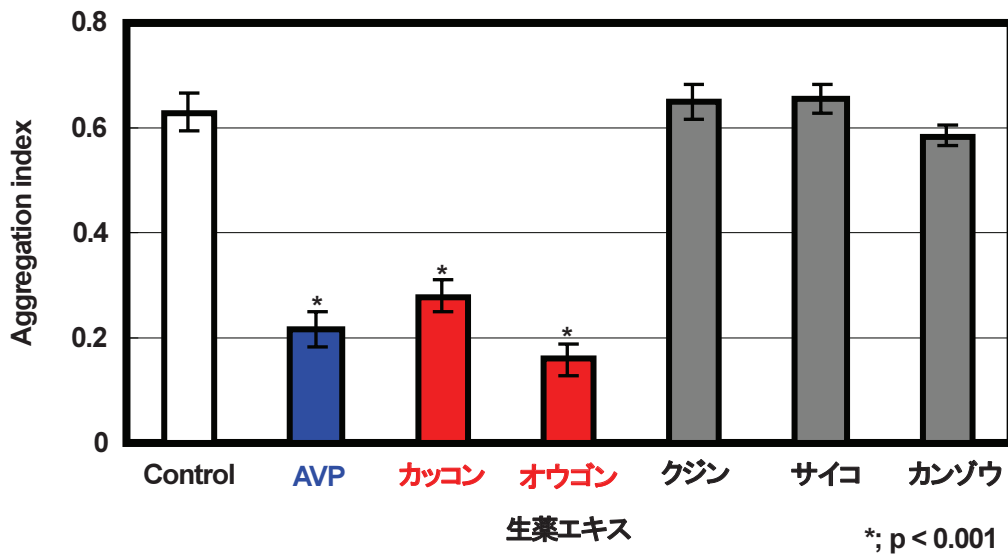


図1. E-cadherin promoter に及ぼす生薬エキスの影響 (Luc 活性の測定)



Aggregation index =  $N_{90}/N_0$   
 $N_0$  = 最初に播種した細胞の個数; ( $4 \times 10^5$ )  
 $N_{90}$  = 90分間振蕩後の単個細胞及び細胞塊の個数

図2. 細胞間接着に及ぼす生薬エキスの影響 (凝集度の測定)

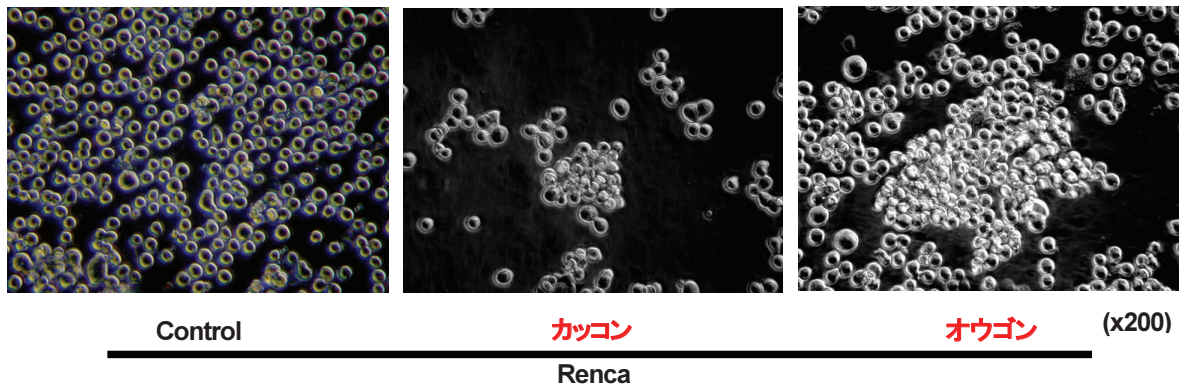


図3. 生薬エキスによる細胞間接着の増強（凝集塊形成）

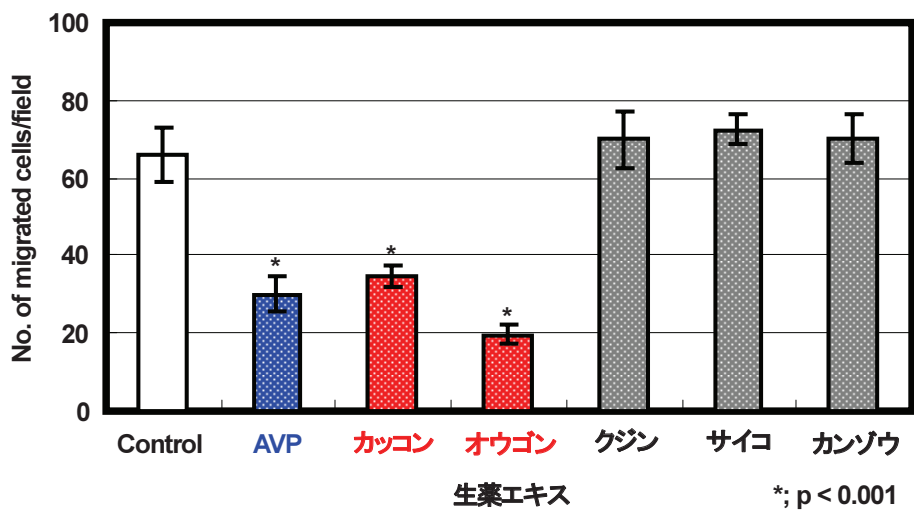


図4. 細胞運動に及ぼす生薬エキスの影響

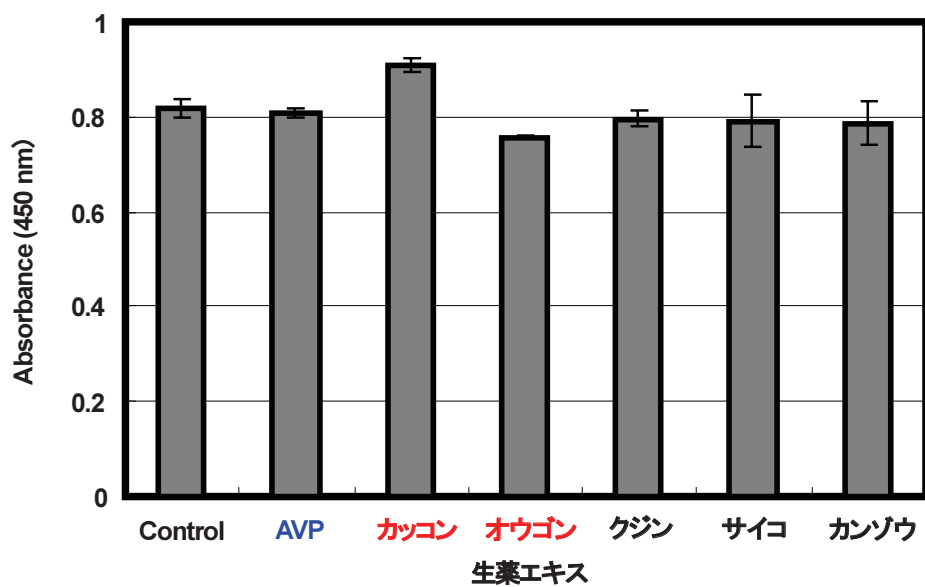


図5. 細胞増殖に及ぼす生薬エキスの影響

従来、腎細胞癌の転移治療において、化学療法並びに放射線療法はほとんど効果が無く、IL-2やInterferon- $\alpha$ を用いた免疫療法が主流であったが、その奏効率はわずかに15%程度であった。一方、最近では分子標的療法が台頭し、チロシンキナーゼ阻害剤（ソラフェニブ）による血管新生阻害、或いはmTOR阻害剤（エベロリムス）による癌細胞増殖・血管新生阻害により腎癌の転移治療は飛躍的に進歩した。しかしながら、一定期間持続的に投与すると効果が失われるケースがしばしば報告されており、更に効果的な治療法の検討が必要である。

今回の結果より、カクコン及びオウゴンエキスに細胞間接着分子であるE-cadherinのプロモーター促進活性が認められたことから、これらエキス中に転写因子TFECの発現誘導効果を有する生理活性物質の存在が示唆された。我々のこれまでの研究より、神経ペプチドAVPは転写因子TFECの発現促進活性を有するが、血管平滑筋細胞に対して血圧上昇作用を有するため、腎癌の転移治療薬として高用量で持続的に投与することは困難である。カクコン及びオウゴンの両エキスに含まれる活性成分が同一物質か否かは不明であるが、これらエキスの分画をすすめることで目的物質を単離・精製し、これを用いてAVPで想定されるような副作用のない転移治療が期待される。

今後、*in vitro*でカクコンまたはオウゴンエキス（或いはそれらに含まれるTFEC発現促進活性成分）で前処置したRenca腎癌のマウス尾静脈への接種による実験的肺転移系において、その転移抑制効果をAVPとの比較から解析したい。更に、最近当研究室で確立したRenca腎癌の同所性（腎皮膜下）移植による自然肺転移系において、カクコンまたはオウゴンエキス（或いはそれらに含まれるTFEC発現促進活性成分）投与による治療効果についても併せて検討したい。

## ■結論

以上の結果より、カクコン及びオウゴン由来エキスは、細胞間接着因子E-cadherinの発現亢進を介してRenca腎癌細胞の運動性を抑制し、ひいては癌転移を阻止することが示唆された。