

ノコギリヤシから新しい自然色素画:肝細胞癌補助療法への可能性

Hor-Yue Tan¹, Ning Wang¹, Masao Takahashi², Yigang Feng³, Hongyun Li³ and Yibin Feng^{1,*}

¹ LKS Faculty of Medicine

² Heimat Co., Ltd

³ Guanghua School of Stomatology

* Correspondence

概要

今回我々は初めてノコギリヤシから脂肪酸分画とは別の、微量水溶性薬理活性物質を見つけた。それゆえにこの研究は、NYG,ノコギリヤシ赤色色素水溶性分画のヒト肝細胞癌における抗腫瘍作用の可能性と、そのありうる標的の探求を目的としている。HCCの同所性同種移植、異種皮下移植性モデルがNYGの腫瘍抑制効果の評価に使用された。ヒト肝細胞癌(HCC)細胞およびヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)が生体外モデルとして使用された。mRNAの発現はqPCRによって実施された。たんぱく質発現は免疫ブロットと免疫組織化学法によってモニタリングした。細胞遊走と血管形成はチェンバーアッセイとチューブ形成アッセイによって判定された。皮下異種移植・同所同種移植HCCモデルにおいてNYGの用量依存的な有意の腫瘍抑制を観察した。NYGはHCC細胞の細胞生存率やVEGF分泌に直接作用はしない。しかしながら、NYGは生体内での腫瘍内血管新生と共にin vitroにおけるHUVEC細胞の遊走と管腔形成活性を抑制した。NYGは内皮細胞におけるERK(extracellular signal-regulated kinases)(細胞外シグナル調節キナーゼ)活性を減弱させた。このことがHUVECの遊走と管腔形成の抑制に関連しているのかもしれない。NYGは血管新生を阻害する事によりHCC腫瘍拡大を抑制した。NYGはHCCに対する補助療法としての可能性があるのかもしれない。

キーワード:ノコギリヤシ、NYG,肝細胞癌、HUVEC、血管新生

1. はじめに

肝がんは世界的にみても一般的な悪性腫瘍のひとつである。6番目に一般的な癌として毎年782,000例もの新規症例が診断されていて死亡率も年々増加している(1)。肝がんによる高い死亡率がアジアやアフリカ地域、とくにそれらの発展途上国において報告されている

(2)。肝細胞癌(HCC)は肝臓がんの 85%を占める主たるものである。HCC の治療法は限られており、肝移植と外科的切除を含める手術がさまざまな治療法の中で最高の予後を期待できる(3)。しかしながら、HCC 患者のたった 15%が外科的手術適応と診断され、非外科的手術治療にまだ多くの需要がある。残念なことに、殆どの HCC が放射線療法、化学療法耐性で、一般的な癌治療プロトコルでの臨床例において、望ましい治療結果が得られることは難しい(4)。それゆえに、具体的かつ効果的に HCC を狙う治療薬が強く必要とされている。腫瘍血管新生は、腫瘍細胞の急速な成長に必要な酸素と栄養を供給する新しい血管形成の為に腫瘍内血液血管が増殖、遊走するプロセスである(5)。HCC の腫瘍血管新生を阻害する薬は利用可能であり、ソラフェニブは HCC 治療において、その過程をターゲットとする薬として近年 FDA に承認された(6)。ソラフェニブは HCC 患者の余命を延長させるかもしれないが、治療には無視できない多くの副作用が伴い、また多大な経済負担を患者に負わせることになる(7)。それゆえに HCC の腫瘍血管新生をターゲットとする代替薬の探求には今も多くの興味が注がれている。

ノコギリヤシはアメリカ合衆国南東部由来の食用植物、*Serenoa repens*(Bartram)J.K.Small の果実抽出物である。約 90%に相当する含有脂肪酸は現在良性前立腺肥大 BPH に効果的な栄養サプリメントとして製品化されている(8)。前立腺肥大患者における、そのよく知られている効果とは別に、脂肪滴や脂肪細胞蓄積の抑制効果や免疫調節作用(9)と言ったノコギリヤシの薬理作用もまた、広く探求されている(10)。以前の研究ではノコギリヤシの脂質ステロール (lipidsterolic) 分画が、*in vitro* において、がん細胞にアポトーシスを誘導する抗癌性の効果を示した(11)。また、トランスジェニック前立腺癌マウスモデルをつかった *in vivo* 研究でも脂質ステロール(lipidosterolic)抽出物(300mg/kg/day)の投与で腫瘍の発生を防ぐことができるのではと仮定された(12)。しかしながら疫学(13)及び無作為化比較試験(14)は介入群とプラセボ群との間に前立腺癌リスクとの関連付けがない事を示した。研究結果の不一致は前立腺癌予防におけるノコギリヤシ脂質ステロール(lipidosterolic)抽出物の効果を結論づけしないかもしれないが、他の腫瘍モデルにおけるノコギリヤシの抗腫瘍効果の可能性は排除しきれない。脂肪酸はノコギリヤシの主要構成成分であり、上記の薬理作用に主に貢献しているのかもしれない。それでもなお、少しの割合で存在する自然色素化合物も商業用ノコギリヤシ抽出物から分離されている(15)。今日までに、ノコギリヤシからのこれらの色素分画の生理活性に関する報告は過去の研究にはない。

この研究で、我々は NYG(patent number: WO 2014174703 A1)と名付けられたノコギリヤシ赤色素水溶性分画の抗腫瘍活性について初めて報告した。我々は NYG 投与後腫瘍の回帰を調べるために皮下マウスと同所性 HCC モデルを採用し、複数の細胞モデルでそのありうる標的を探索した。我々は NYG が HCC の同所性同種及び異種移植腫瘍成長の強力な抑制効果を表す事を、*in vivo* での腫瘍血管新生抑制と共に、見つけた。しかしながら、我々は *in vitro* での HCC 細胞の生存と増殖における NYG の効果は観察しなかった。しかも、

腫瘍血管新生の好因子 VEGF の腫瘍細胞からの分泌減少もおこさなかった。その代りに NYG は腫瘍間質中の内皮細胞の遊走と血管形成を減少させた。VEGF 誘導 ERK 活性の抑制が、内皮細胞における NYG の薬理作用に関与しているのかもしれない。我々の研究結果は腫瘍血管新生を標的とした HCC 補助療法としてのノコギリヤシ水溶性画分の可能性に光を照らした。

2. 結果

2.1. NYG は In Vivo において肝細胞癌(HCC)の異種移植腫瘍の成長を抑制した

ノコギリヤシの脂質ステロール(lipidosterolic)画分はしばしば研究が行われ、BPH や脱毛予防のサプリメントとして使用されている。その水溶性画分は殆ど研究がなされていないが、過去の研究でノコギリヤシの酸性水画分に抗酸化作用と COX 2 抑制作用がある事は示されていた(16)。この観察はまた更に、前立腺癌細胞成長抑制に関与しているノコギリヤシ・ベリー抽出物の COX2 抑制効果に関する他の研究を支持した(17)。過去の調査に基づき、我々はノコギリヤシ水溶性画分が腫瘍抑制効果を表すのではと推測した。NYG と名づけられた水溶性画分が厳密な製造基準に従って、(株)ハイマートによって準備された。我々の薄層クロマトグラフィーを使用した予備的化学的評価により NYG 含有化合物はプロアントシアニンと脂質要素で主に構成されている事を示唆した。含有成分を確認し NYG の品質管理の為に、他手段を使用した化合物評価による、さらなる研究が必要がある。NYG はノコギリヤシから分離された新たな分画として、我々は用量漸増試験によってその毒性を調査した。マウスを用いて 5 日間連続、NYG0.1,1,10,100mg/kg のふっ腔内注射を行った。注射 1 日目、他グループは正常な行動を示していたのに対し、100 mg/kg 投与群では 5 匹中 4 匹が、死亡した。注射 4 日目で NYG100 mg/kg 投与群のマウスは全て死亡した (図 1A)。単回治療における LD50 はおよそ 66.3mg/kg と測定された。LD50 以下の NYG 投与は安全とみなされている。

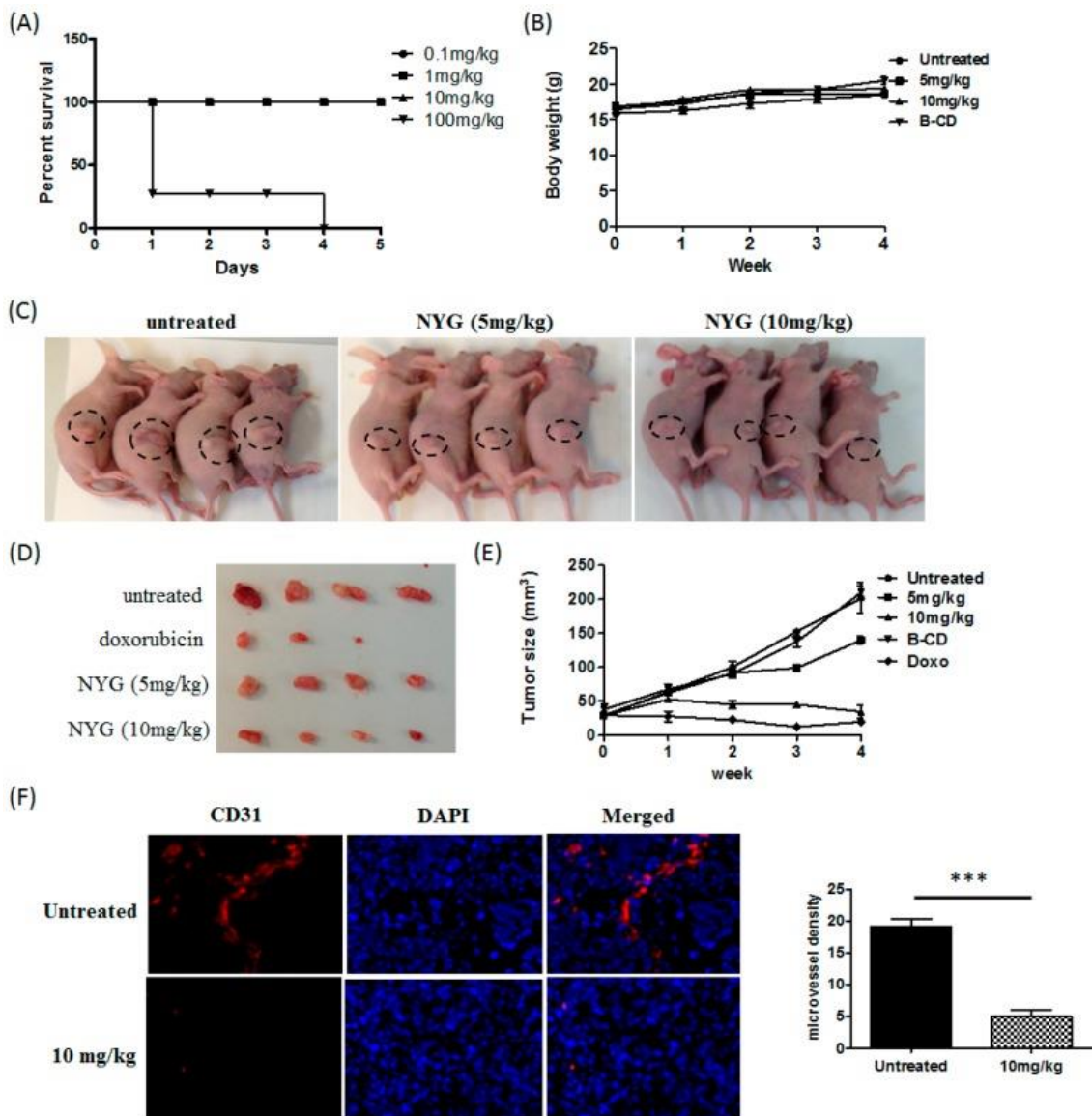


図 1. in vivo において異種移植性 HCC の成長を抑制した NYG

(A) (n = 5); マウスに 0.1, 1, 10 100 mg/kg の NYG ふっ腔内投与が 5 日連続投与された。(B, C) 皮下異種移植マウスに 5mg/kg 又は 10mg/kg の NYG がふっ腔内投与された。体重が観察され標準偏差で複製平均として測定された。(D) 腫瘍は摘出され標準偏差平均値として測定された(mm³)。NYG(10mg/kg)治療グループの腫瘍サイズは生理食塩水グループのものより小さかった。皮下成長腫瘍に丸を付けて示した。(E) 腫瘍サイズを腫瘍細胞皮下注射後毎週モニターし測定した。(F) CD31 抗体で染色した摘出 HCC 腫瘍病理組織と NYG 処理マウス(10mg/kg)。各分野の血管濃度が 5 つの組織での微小血管の平均数として測定された(100 倍拡大)NYG 介入にて異種移植マウスの CD31 染色微小血管濃度が有意に減少した。*** p < 0.001

次に我々は in vivo にて、異種移植ヌードマウスにおける MHCC97L 細胞の成長に対する NYG の抗腫瘍効果について検査した。腫瘍注入 1 週間後、NYG(5mg/kg と 10mg/kg 二日おきに)がふっ腔内投与された。ドキソルビシン(2.5mg/kg)を与えられたマウスをポジテ

イブコントロール群とし、PBS と β シクロデキストリン(BCD)投与マウスを **negative control** 群とした。我々は全実験過程で、体重維持のエビデンスをもとに、NYG 投与による毒性が殆どない事を観察した(図 1B)。図 1C で仮定したように、NYG(10 mg/kg)投与されたマウス群は溶媒のみの対照群と比較して HCC 増殖がとても緩慢であった。どちらの投与量においても NYG 投与群では 4 週間後の腫瘍縮小が見られた。NYG10 mg投与群において、より効果的な抗腫瘍効果が見られたことは、NYG の効果が用量依存性である事を示唆している(図 1D, E)。NYG の製剤上の添加物 B-CD の投与はマウスの腫瘍成長と体重へ殆ど影響しない事を示した(図 1B, E)。このことはヒト HCC への抗腫瘍活性は NYG そのものの単独の効果であることを反映している。異種移植 HCC 腫瘍における CD31 の免疫染色法により NYG 投与後の微小血管形成を有意に減少させることが示された(図 1F)。総じて、これらの結果から、NYG が HCC 異種移植腫瘍成長を抑制し、それは腫瘍内での血管新生抑制作用によるものであることが推測された。

2.2. NYG は *in vivo* において同所性同種移植された HCC 増殖を抑制した

異種移植腫瘍モデルは新規治療薬の抗腫瘍効果調査の為の最初のモデルとしてしばしば使用されるが、この前臨床モデルには、肝腫瘍微小環境を反映するには限界があり、不確かな薬効結果をもたらすことがある(18)。したがって、我々は、ルシフェアラーゼでマークした MHCC97L 細胞をマウスの肝臓右葉に注入し同所性同種 HCC 移植モデルを作った。同所性同種 HCC 腫瘍成長は介入期間中ライブ動物イメージング (live-animal imaging) によって監視された。モデル構築の一週間後、観察しうるルシフェアラーゼ強度を持つマウスを選び、それらを更に 2 つのグループに無作為に分けた。PBS のみのコントロール群と NYG10 mg/kg 投与群。ルシフェアラーゼ信号強度プロットから観察して、同所性同種 HCC 腫瘍が溶媒のみ与えられたコントロールマウス群では 5 週以内に急激に成長したのに対し、NYG 投与群では投与 2 週間目から減速した。この実験で我々は、コントロール群と比べ NYG 投与群において HCC 腫瘍成長のおよそ 60%抑制といった有意な肝腫瘍サイズの減少を観察した(図 2B)。皮下成長腫瘍と同様、NYG 投与群は同所性同種移植成長肝腫瘍における CD31 陽性細胞数を有意に減少させた。このことは同所性同種移植 HCC 成長に対する NYG の腫瘍抑制効果は部分的には NYG による血管新生抑制効果に起因している可能性が示唆されている(図 2C)。

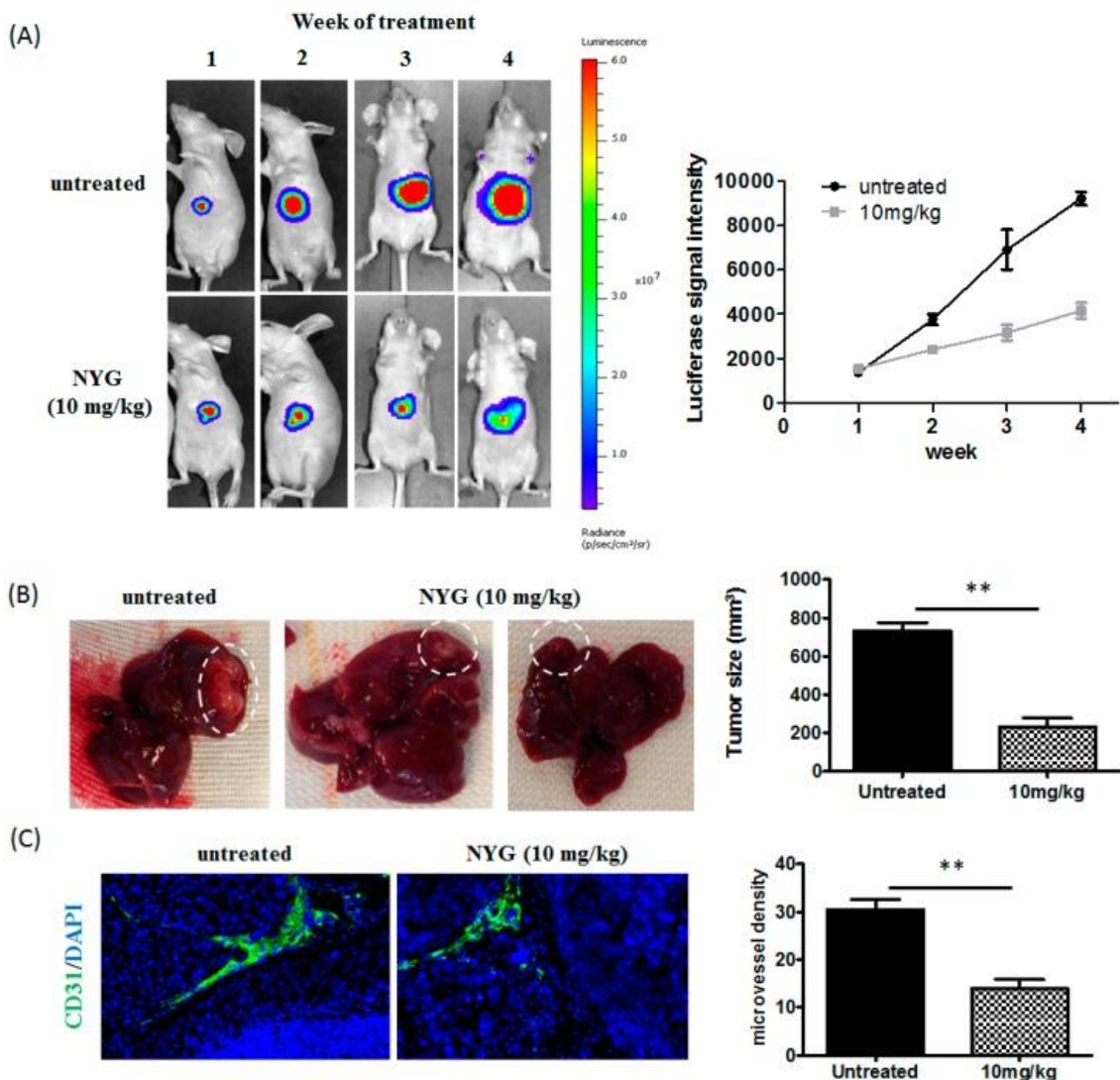


図 2. NYG は生体内での同所性同種 HCC 増殖を阻害した

(A)同所性同種 HCC 増殖はモデル確立後、毎週ルシフェリンシグナルのイメージングによりモニタリングされた。同所性同種 HCC 増殖の割合は生理食塩水を与えられたグループと比較し NYG 投与群ではゆっくりであった。(B) NYG 投与 5 週間後、肝臓を摘出。NYG 投与マウス群は生理食塩水投与マウス群に比較して、同所同種腫瘍成長の抑制が見られた。NYG 投与後の有意な腫瘍体積の縮小が観察された。同所性同種腫瘍結節をまるで示した。(C) コントロール及び NYG 処理マウス(10mg/kg)の CD31 抗体染色同所同種 HCC 腫瘍摘出組織。各区域の血管密度は 5 つの組織エリア(100x 倍率)の微小血管の平均数として測定された。NYG 介入は同所同種 HCC 肝移植マウスにおける CD31 染色微小血管濃度を有意に減少させた* $p < 0.01$

2.3. NYG は in vitro において HCC 培養細胞に殆ど影響しなかった

NYG の効果を明らかにするため、我々はこの微量色素が HCC 細胞の増殖を抑制するかどうかの更なる調査をおこなった。MTT アッセイを個々の HCC 細胞に対する NYG の毒

性用量の検討に行った。驚いたことに、NYG は、2 つのヒト肝がん細胞、HepG2 と MHCC97L に対し、インキュベーション時間を 72 時間に延長しても、500 $\mu\text{g/mL}$ まで毒性を示さなかった(図 3A,B)。HCC 細胞における NYG により起こる最小毒性から察するよう、NYG は正常肝細胞 L02 に対しても 500 $\mu\text{g/mL}$ まで毒性を発揮しなかった。生体内 CD31 染色血管細胞密度の減少を観測したことにより、我々は NYG 処理 HCC 細胞における、血管新生優遇因子 VEGF の発現をさらに検証した。MHCC97L 細胞に 250 $\mu\text{g/mL}$ と 500 $\mu\text{g/mL}$ の NYG を投与して 48 時間培養しその後の細胞と培養上清を収集した。定量 PCR 解析では、NYG 投与が、通常酸素と低酸素の条件どちらも、VEGF の mRNA 発現に殆ど影響しない事を示した(図 3D)。検証のために、MHCC97L 細胞による VEGF タンパク分泌が ELISA アッセイにより測定され、NYG による VEGF 分泌抑制は観察されなかった(図 3E)。

これらの結果から NYG の腫瘍抑制効果はその HCC 細胞への作用に依存しないことが示唆された。

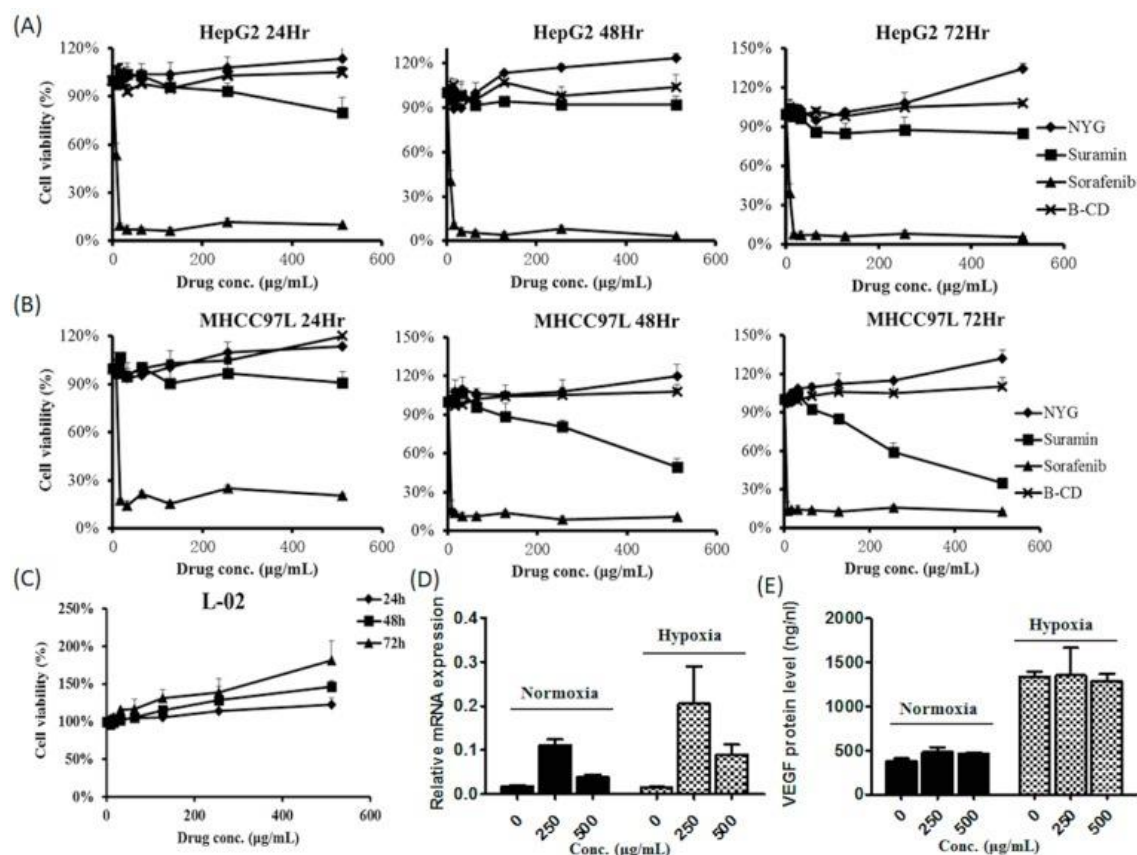


図 3. 体外培養 HCC 細胞に対して NYG の影響はほとんどなかった

(A) HepG2 と (B) MHCC97L 細胞株に NYG を 0~500 $\mu\text{g/mL}$ の範囲で処理し、24, 48, 72 時間の培養を行った。B-CD、スラミン、ソラフェニブがコントロール群として添加された。細胞生

存率を標準平均偏差により複製平均数として測定された(N=3)。(C) 正常細胞株 L02 は NYG で用量時間依存的に処理された。NYG は HepG2、MHCC97L、L02 細胞に対して毒性を示さなかった。(D) MHCC97L 細胞における VEGF の相対的 mRNA 発現率は qPCR により測定された。VEGF の mRNA は fold change $\pm$ SD として測定された。(E) 常酸素条件と低酸素条件における MHCC97L 細胞の VEGF 分泌タンパクの量。VEGF 濃度は平均標準偏差(ng/ml)で測定された。NLHCC97L における NYG 処理は VEGF の mRNA とタンパク濃度に有意な影響はおよぼさなかった。

2.4. NYG は HUVEC における遊走と管腔形成を抑制した

血管新生とは栄養素や酸素を腫瘍細胞の成長の為に供給する新しい血管の形成である。血液血管系は基底膜からの侵入、遊走、増殖、及び管腔形成をおこない、お互いに繋がった血管内皮細胞によって主に保持されている(19)。それゆえに、我々は *in vivo* において、NYG による腫瘍抑制が内皮細胞による血管新生の開始抑制に起因しているかどうかをさらに検証した。手短かに言うと、我々はヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を血管新生好因子である VEGF 単独、もしくは NYG 添加の条件のもとに処理し、HUVEC のさらなる反応を観察した。ヒト腫瘍細胞から得られた結果と同様に、我々は 500 μ g/mL まで NYG の HUVEC に対する毒性は現れない事を確認した。HUVEC に対する NYG IC₅₀ は 24 時間と 48 時間の培養時間でそれぞれ約 2mg/ml と 4mg/ml であった(図 4A)。そして我々は NYG が HUVEC 動性を低下させるかどうか検証した。マトリゲル浸潤区域アッセイを使い、我々は非毒性用量 NYG の存在下でチェンバー内の頂点から起点への HUVEC の遊走減少%を観察した(図 4B)。NYG により内皮細胞の走化性因子 VEGF への動性が遮断されたことから、NYG の存在下で血管内皮細胞の機能が中断される可能性を示した。チューブ形成アッセイからの観察は、HUVEC における毛細血管様の管状構造形成が NYG 投与により完全減衰するという仮説を支持した(図 4C)。HUVEC 動性と管腔形成に対する 100 μ g/ml NYG の抑制効果が血管新生阻害剤スラミン 30 μ M と匹敵した。総じて、我々の研究結果は腫瘍間質での血管形成抑制において NYG が内皮細胞に作用している事を示唆した。

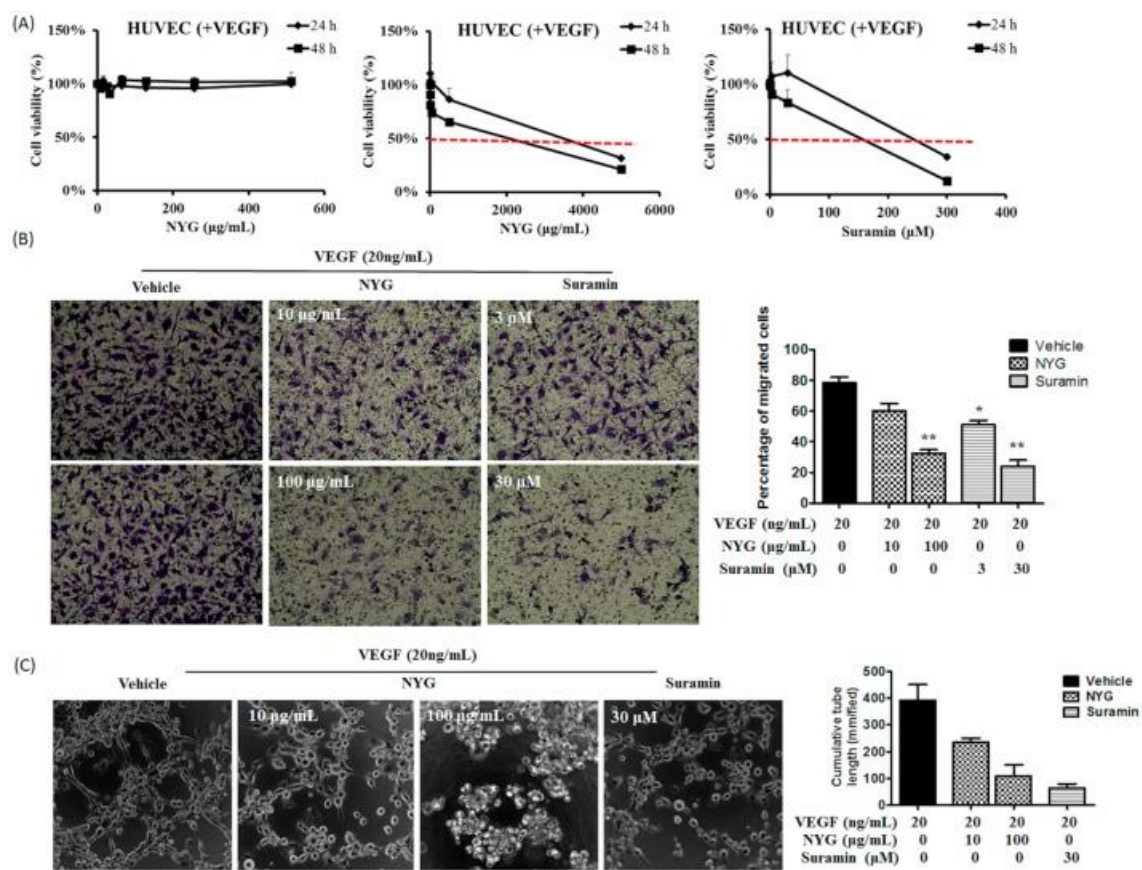


図 4. NYG は HUVEC 細胞の遊走と管腔形成を減少させた

(A) HUVEC は VEGF とそれぞれの容量の NYG とスラミンで、24 時間、48 時間処理を行った。細胞生存率は標準偏差で平均複製率(n=3)として測定された(%). HUVEC における NYG の IC50 はそれぞれ 24 時間、48 時間の培養時間で約 2mg/mL と 4mg/mL であった。(B) HUVEC は transwell の upper chamber に播種され、VEGF(20ng/mL)単独または NYG もしくはスラミンとの混合で処理された。遊走細胞の平均数が顕微鏡下でプレートごと 5 つの無作為なエリアで数えられた。NYG 処理で HUVEC 遊走の可能性が用量依存的に減少した (40 倍拡大)。(C) HUVEC はマトリゲル pre-coated well に播種され、VEGF(20ng/mL)単独もしくは NYG、またはスラミンの配合で処理された。管腔形成の平均数が顕微鏡下でプレートごとに 5 つの無作為な場所で測量された。NYG は HUVEC の管腔形成を用量依存的に抑制した (100 倍拡大) * p < 0.05, ** p < 0.01.

2.5. NYG による腫瘍血管新生抑制は内皮細胞における ERK の不活性と関連しているのかもしれない

ERK/MAPK シグナル伝達経路は、主に内皮細胞の生存、遊走、管腔形成に関連する腫瘍血管新生の促進に関係している(20)。このため我々は ERK が、NYG 媒体による内皮細胞への抑制に関与しているかどうかを検証した。HYVEC において NYG は、VEGF によって誘導される ERK リン酸化を強力に抑制するのを観察した(図 5A)。ERK 経路は普段は静止状態にあり、特定の刺激に曝露された時のみ一過性に活性化される。我々の研究では、

HUVEC において ERK は VEGF により刺激を受けた時に活性化された。以前の研究で ERK 阻害が VEGF 処理された HUVECs における血管新生の減少をもたらす事を示した (21)。生体内における腫瘍血管新生の減少が NYG による ERK 活性抑制に関係しているのかどうか、さらに検証するため、我々は、腫瘍間質での血管ネットワークの CD31 染色をおこない、pERK の共焦点顕微鏡分析を行った。我々は pERK が CD31 染色された異種移植腫瘍血管に多く発現し、NYG 処理により pERK の発現が抑制された事を観察した(図 5B)。しかしながら、ERK 下流上流ターゲットへの影響の可能性同様、様々な作用時間や用量との関係で pERK の変化を観測する事は、NYG 介入による ERK の役割を確認するために必ず必要である。総じて、我々の結果は、ERK 阻害は血管内皮細胞への NYG の規制抑制効果に関連しているのかもしれない事を示唆した。

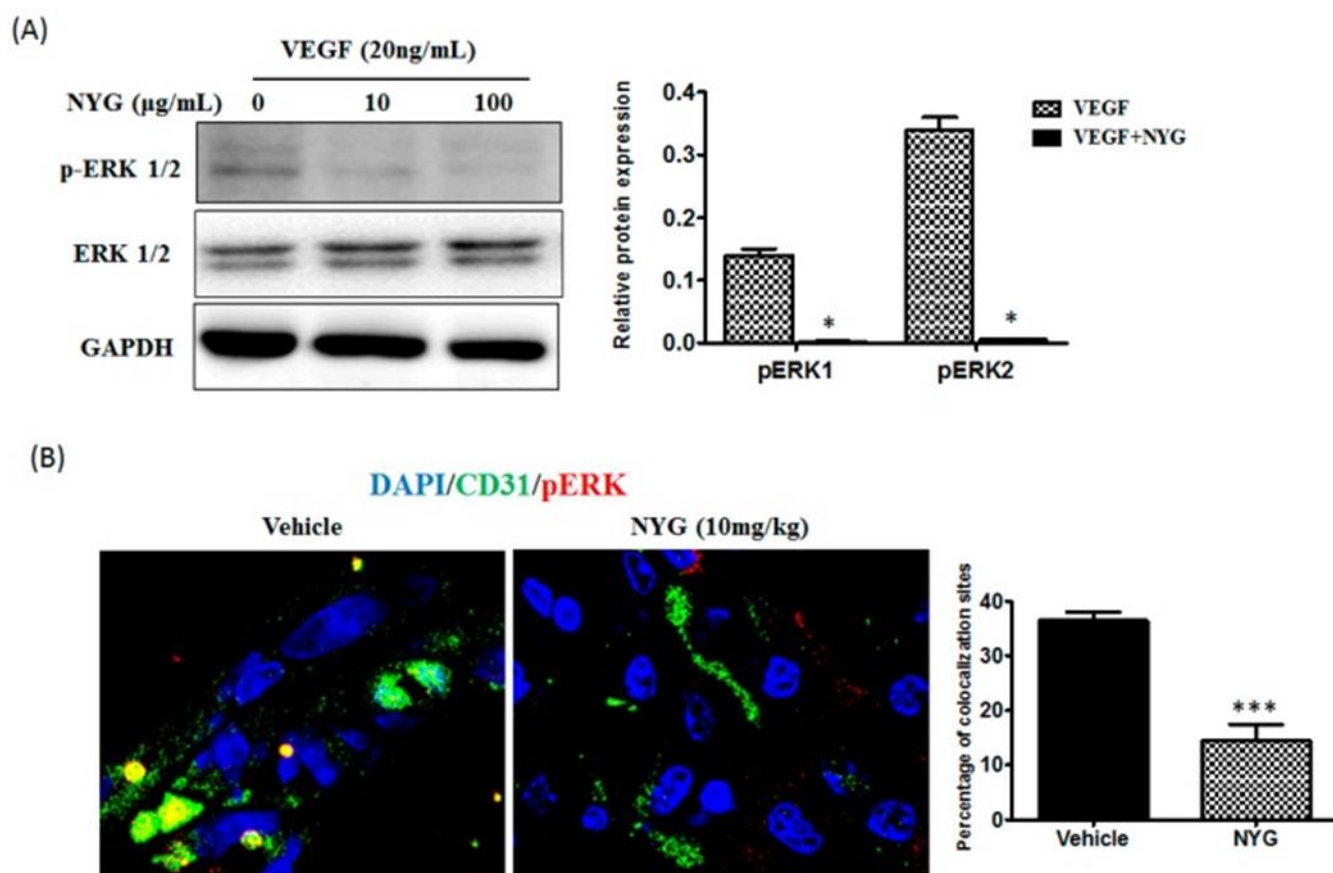


図 5. 内皮細胞における NYG による腫瘍血管新生の抑制は ERK 抑制に関連しているのかもしれない

(A) HUVEC を VEGF 単独と NYG+VEGF で処理した。ライセートは抗 pERK と GAPDH に対しての免疫を消した。pERK1 と pERK2 のタンパクレベルは GAPDH により、右のパネルに示す様に正常化、定量化された。NYG 介入により pERK の出現が下方制御された。(B) CD31 で染色された摘出 HCC 腫瘍組織断片と対照の pERK 抗体と NYG 処理されたマウス・NYG 介入は異種移植マウスの CD31 染色された微小血管濃度を優位に減少させた。pERK 発現は対照群と比べ NYG 介入グループの CD31 染色血管系において減少した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

3. 考察

血管新生は腫瘍細胞が原発部位から広がっていく為には不可欠な過程である。この過程は腫瘍間質内での内皮細胞の増殖・遊走に関与し、腫瘍が急速に広がるための十分な酸素や栄養素を与える微小血管の形成にも関係している(5)。血管新生は転移性癌の進行に絶対的に関わってくる(22)。腫瘍細胞による血管内皮細胞成長因子(VEGF)の分泌は決定的要因として仮定されてきた(23)。しかしながら、我々は、NYG の *in vitro* HCC 細胞発癌領域への影響はほとんどなく、HCC における VEGF の発現と分泌に影響を与えなかった事を発見した。この観察は NYG が腫瘍血管新生の上流での統制を標的としている可能性を除外した。VEGF とその受容体 VEGFR の結合は複数の細胞内シグナル伝達を活性化し、遺伝子関連の透磁率、増殖、運動の転写活性を許可する(24)。以前の研究から、ERK シグナルの活性化は主に内皮細胞の機能拡大(25)と遊走をもたらす事が示されている(26)。我々は培養内皮細胞 HUVEC において、NYG が ERK シグナルの VEGF 誘発リン酸化を強力に抑制する事を観察した。それは、VEGF による ERK の活性化が NYG 介入により遮断され、この反応は VEGF 依存によるものなのかもしれない事を示唆した(図 6)。

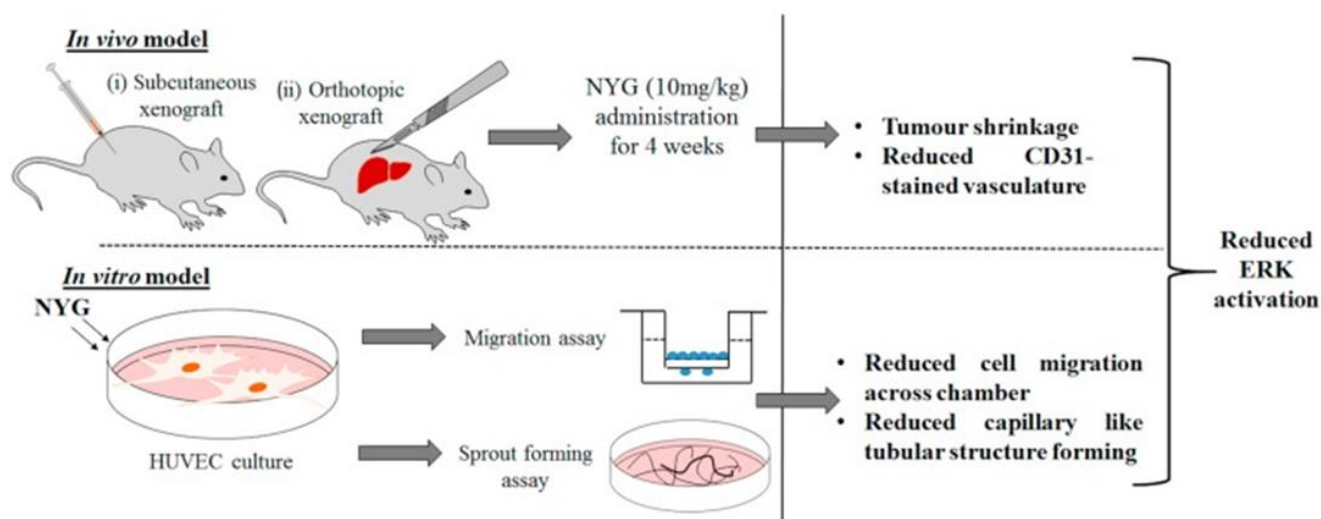


図 6. HUVEC の遊走と管腔形成を媒介する NYG の抗腫瘍効果を表した生体内・生体外実験の模型図

自然由来の抗がん物質の多くは溶解性が悪く、また安定性やバイオアビリティが低いことで、それらが自然由来製品の癌治療への利用促進を妨げている事が知られている(27)。NYG の添加物、B-CD は薬の溶解性、バイオアビリティ、安定性や人への安全性が科学的に証明されている配合物として医薬品業界で幅広く使用されている(28)。しかしながらいく

つかの研究では B-CD が生体内生体外において細胞株や動物に毒性があるのではと主張している(29)。それゆえ我々は B-CD 介入による動物実験を別に行い、ふっ腔内投与でマウスの明らかな体重減少がない事を観察し毒性が殆ど見られない事を示した。生体外での実験では、HacaT ケラチノサイトにおける 1%(w/v)B-CD は 52.23%細胞死が起こり(30)、P388 細胞において 5mol/L(約 5.675mg/mL)では 60%の細胞死がみられ(31)、さらに、ある一定の高濃度での B-CD の毒性が推測された。過去の研究と一致して、我々の研究は、500 μ g/ml 以下の B-CD 濃度では HepG2 と MHCC97L 肝癌細胞に対して毒性を発揮しないという結論を示した。それゆえに、我々は 0.1 mg/ml NYG とおよそ 0.095mg/mL B-CD は細胞毒性を示さないとした。

臨床においては、化学療法後、吐き気、嘔吐、下痢、食欲不振などの深刻な副作用がしばしばみられる。これらの副作用は化学療法剤が正常細胞に引き起こす毒性反応に起因する(32)。それゆえに癌細胞に直接毒性をもたらす化学療法剤の使用においてはこれらの副作用は避ける事ができない課題と思われる。その上、化学療法耐性の性質を持つ HCC では、使用する化学療法剤の量は非常に多くなり、それにより、さらなる重篤な副作用発現という結果をもたらす。NYG が HCC に対して毒性を示さない、そして正常細胞に対して殆ど影響を及ぼさないといった我々の研究結果から、NYG は患者に対して安全だと思われる。一定量の NYG 投与で体重減少や副作用の見られなかった動物体重変化の観察からも、NYG の使用はさらに安全性が高い事が示される。

我々の研究で観察されたように、NYG による腫瘍拡大の抑制は腫瘍細胞集団の収縮によるものではなく、腫瘍間質内での内皮細胞の運動と血管系形成の抑制に関与している。NYG 投与マウスにおいて、内皮細胞による血管系ネットワーク構築の失敗が腫瘍細胞への酸素や栄養素の供給を制限して、腫瘍成長遅滞を引き起こしている。NYG の介入は腫瘍細胞を完全に根絶はしていないかもしれないが、固形癌の急速な成長や増殖を遅らせる。腫瘍細胞がもろく低い増殖率で残存している状態に、低用量の化学療法剤が使用されると、期待した治療効果を得た上、最小限の副作用におさえられるのかもしれない。これらの関連から、我々は初期段階における他・癌治療の補助的療法として使用されうる NYG を、血管新生を介した腫瘍拡大抑制による HCC への潜在的補助療法として位置づけした。初期治療における NYG の併用使用の有効性とありうる生薬相互作用に注目したさらなる研究が今後行われなくてはならない。

4. 材料と方法

4.1. NYG の準備 (ノコギリヤシの赤色色素)

ノコギリヤシ粉末は無水エタノールで抽出した。抽出後残渣は濾過により上澄みから分

離した。上澄みは蒸発させ濃縮させた。その後相当量の水を濃縮抽出物に攪拌しながら追加。その混合物は効率的な脂溶性（上部分）と水溶性（下部分）に分けるため、室温で保管。水溶性層を別にし、ウェット結晶成分をろ過により収集。そして同量の **beta-cyclodextrin (B-CD)** と 3 倍量の 90%エタノールをウェット結晶成分に追加して良く攪拌した。均質化したペーストは減圧化で乾燥された。乾燥した分画は 90%エタノールで再び懸濁され、脂質や他の不純物は洗浄された。懸濁物は再び乾燥され、結晶物の正味重量が計算された。最終濃度はノコギリヤシ自然色素抽出物 1 に対して BCD が 19 になるように調整された。

4.2. 細胞株と細胞培養

ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2 は ATCC より購入、MHCC97L は香港大学外科学 Dr ManKwan より提供された。L-02 細胞株は動物実験センターの Sun Yat-sen 大学／広州 (Experimental Animal Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou) から購入。細胞株は 10% の FBS と 1% のペニシリン・ストレプトマイシンによって補足された DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) に保存された。HUVEC 細胞株は ATCC より購入し、5% の CO₂ インキュベータにて EGM2 完全培地 (Lonza, Basel, Switzerland) に保存した。80% の培養密度に達した時点で移動させた。

4.3. 細胞生存率アッセイ

細胞の生存率は Mosmann の過去の資料による MTT アッセイにより調べた (33)。24 時間、48 時間、72 時間、NYG を一連の濃度で細胞に処理した。培養後、10 μ l の MTT 溶液をそれぞれのプレートに加えそれからまた 3 時間培養した。100 μ l の DMSO を結晶塩を溶かす為に加え 570nm の波長で吸光度を測定した。

4.4. 遊走と管腔形成アッセイ

遊走アッセイの為、HUVEC は細胞培養容器、挿入 8 μ (Costar) に播種した。受け側のチャンバーは 20ng/ml VEGF と、NYG とスラミンありと無しの条件で無血清細胞培地で満たされた。細胞の遊走は 37 度 4 時間で起こった。その後上部挿入の残った細胞は綿棒で取り除かれ、下部のものはクリスタルバイオレットで染色を行った。遊走細胞は顕微鏡下でプレートごとに 5 つの場所で測定した。管腔形成アッセイでは HUVEC は処理あり、なしで、マトリゲル基底膜マトリックス (BD) でプレコートされた 96 ウェルプレートに播種された。

そして 37 度 4 時間培養後顕微鏡下で視覚化された。

4.5. 定量リアルタイム PCR

RNA イソプラス試薬 (タカラ・東京・日本) を使って NYG 処理細胞から総 RNA が抽出された。cDNA 逆転写キット (タカラ) を使用して逆転写が行われた。SYBR プレミックス Ex (タカラ) と Light Cycler 480 real time PCR system (Roche, Basel, Switzerland) を使用して定量リアルタイム PCR が行われた。プライマーシーケンスは次のとおりである。
VEGF 5'-CCTCCGAAACCATGAACCTT-3' (forward) and 5'-TTCTTTGGTCTGCATTACATT-3' (reverse)

4.6. ウェスタンブロッティング

NYG 処理された細胞は RIPA で分離され、タンパク濃度は Bradford タンパクアッセイにより測定された。10 μ g タンパクサンプルが、ポリビリルデネリフルオライド膜に転送される前に 12%SDS アクリルアミドゲルで分離された。ウサギ抗 gadph と抗リン酸化 ERK への初期の抗体で培養する前に膜を 5%ウシ血清アルブミンでブロックした。そして膜はワサビペルオキシダーゼ標識ウサギ抗体で培養され化学発光システム(Biorad, CA,USA)の元で視覚化された。

4.7. 免疫組織化学

腫瘍は 30%スクロース内で OCT にて-20 度で凍結、8 μ m の厚さで区分された。区画は 10%ヤギ血清でブロックされ抗マウス CD31 と pERK で一晩培養された。各区画のマルチ血管密度は 2 時間の FITC 共役抗体染色により評価され、蛍光顕微鏡の元で視覚化する前に DAPI で対比染色された。

4.8. VEGF 分泌における ELISA アッセイ

VEGF 分泌の測定にはヒト VEGF ELISA キット(ExCell Biology)が製造元プロトコルに従って使用された。細胞培養上清は抗 VEGF モノクローナル抗体であらかじめコートしたプレートに播種された。その後、HRP 標識ストレプトアビジンで 30 分培養し TMB 基質液

が添加された。最後に、酵素/基質 反応を終えるため停止液が添加され、450nm で吸収率が求められた。

4.9. 動物実験

4.9.1. 皮下異種移植モデル

PBS におかれた MHCC97L 細胞(1×10^6)を BALB/cAnN-無胸腺ヌードマウスの右脇腹に皮下注射した。一週間後、一連の容量の NYG とドキソルビシン($n=5$)治療が、4 週間の週 3 回腹腔内投与が、開始された。対照グループは同量の PBS が投与された。それぞれのマウスの体重と腫瘍サイズが密接に観察された。マウス実験後、腫瘍は取り出し測定された。動物処理は香港大学 Committee on the Use of Live Animal in Teaching and Research (CULATR)に承認された手続きで行った。

4.9.2. 同所性同種移植モデル

動物モデル確立プロトコルは我々の以前の研究(34)に記載されている。簡単に言えば 1×10^6 ルシフェラーゼでマークされた PBS 内の MHCC97L 細胞が Balb/C ヌードマウスの右脇腹に皮下注射された。皮下腫瘍が 1cm の大きさになった時それは取り出され、 1mm^3 に切り分け、他マウス肝臓左葉に移植された。1 週間後開腹し腫瘍成長のルシフェラーゼイメージング解析検査を行った。ルシフェラーゼシグナルを示すマウス($N=5$)が、無作為に生理食塩水コントロール群と NYG のふっ腔内投与(10mg/kg every 2 days)グループに分けられた。それぞれのマウスの体重と腫瘍サイズが密接に観察された。マウス実験後、腫瘍は取り出し測定された。参照番号 3 3 9 8 - 1 4 動物処理手続きは、2014 年 8 月、香港大学 Committee on the Use of Live Animal in Teaching and Research (CULATR) に承認された。

4.10. 統計学分析

全てのデータは unpaired Student's t test により統計学的に分析された。p 値 < 0.05 で有意であると考えられた。

5. 結論

結論として、我々はノコギリヤシの水溶性エキス・NYG のヒト肝細胞癌における、抗腫瘍作用を実証した。NYG は腫瘍間質における血管新生の抑制により、異種移植と同所性同種腫瘍モデルにおける肝細胞癌(HCC)成長の強力な抑制作用を展開した。NYG は HCC 細胞に対し毒性は発揮せず、また HCC 細胞での VEGF 発現の減少もおこさなかった。代わりに NYG は、腫瘍間質において内皮細胞の遊走と管腔形成を抑制した。それが主たる抗腫瘍効果に貢献していると思われる。これは NYG 処理した内皮細胞の ERK シグナル不活性化に関連している。我々の研究は HCC の潜在的補助療法としてのノコギリヤシ水溶分画の新たな使用に光を与えた。

謝辞

この研究は、Wong の modern oncology of Chinese medicine (Project No. 200006267)への寄付と、香港政府の Matching Funding (Project No. 207060411)など、香港大学研究議会によって部分的に支持された(プロジェクトコード 104003422・104004092)。我々はこの研究の為、抽出物を提供した(株)ハイマート(東京・日本)にも感謝を表明する。

Author Contributions

Hor-Yue Tan と Ning Wang が研究を主導しデータを集め、論文を起草した。高橋雅夫氏, Yigang Feng, and Hongyun Li が、データ解釈と論文のコメントを行った。Yibin Feng が実験を設計し、データ解釈と論文の最終確定を行った。全員で論文の最終確認を行った。

利益相反

高橋雅夫氏は東京ハイマート(株)の研究スタッフである。その他には開示の相反はない

References 参照

1. Liver Cancer Incidence Statistics. [(accessed on 12 June 2014)]. Available online: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/liver/incidence/uk-liver-cancer-incidence-statistics#world>.
2. IARC, W.H.O. Globocan 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. [(accessed on 10 June 2012)]. Available online: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
3. American Cancer Society How is Liver Cancer Treated? [(accessed on 10 June 2014)]. Available online: <http://www.cancer.org/cancer/livercancer/detailedguide/liver-cancer-treating-general-info>.
4. Johnson P.J. Non-surgical treatment of hepatocellular carcinoma. HPB. 2005;7:50–55.

- doi: 10.1080/13651820410024076. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
5. Pang R., Poon R.T. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2006;242:151–167. doi: 10.1016/j.canlet.2006.01.008. [PubMed] [Cross Ref]
 6. National Cancer Institute Fda Approval for Sorafenib Tosylate. [(accessed on 10 June 2014)]; Available online: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-sorafenib-tosylate#Anchor-Live-50484>.
 7. Childs M. Do Drugs Really Have to Be So Expensive? [(accessed on 13 December 2015)]. Available online: <http://www.bbc.com/news/health-21834442>.
 8. Bent S., Kane C., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes E.S., Goldberg H., Avins A.L. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 2006;354:557–566. doi: 10.1056/NEJMoa053085. [PubMed] [Cross Ref]
 9. Sirab N., Robert G., Fasolo V., Descazeaud A., Vacherot F., Taille Ade L., Terry S. Lipidosterolic extract of *serenoa repens* modulates the expression of inflammation related-genes in benign prostatic hyperplasia epithelial and stromal cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:14301–14320. doi: 10.3390/ijms140714301. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
 10. Villaverde N., Galvis A., Marcano A., Priestap H.A., Bennett B.C., Barbieri M.A. Saw palmetto ethanol extract inhibits adipocyte differentiation. *J. Nat. Med.* 2013;67:619–625. doi: 10.1007/s11418-012-0723-2. [PubMed] [Cross Ref]
 11. Hostanska K., Suter A., Melzer J., Saller R. Evaluation of cell death caused by an ethanolic extract of *serenoa repens* fructus (prostasan) on human carcinoma cell lines. *Anticancer Res.* 2007;27:873–881. [PubMed]
 12. Wadsworth T.L., Worstell T.R., Greenberg N.M., Roselli C.E. Effects of dietary saw palmetto on the prostate of transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model (tramp) Prostate. 2007;67:661–673. doi: 10.1002/pros.20552. [PubMed] [Cross Ref]
 13. Bonnar-Pizzorno R.M., Littman A.J., Kestin M., White E. Saw palmetto supplement use and prostate cancer risk. *Nutr. Cancer.* 2006;55:21–27. doi: 10.1207/s15327914nc5501_3. [PubMed] [Cross Ref]
 14. Andriole G.L., McCullum-Hill C., Sandhu G.S., Crawford E.D., Barry M.J., Cantor A. The effect of increasing doses of saw palmetto fruit extract on serum prostate specific antigen: Analysis of the camus randomized trial. *J. Urol.* 2013;189:486–492. doi: 10.1016/j.juro.2012.09.037. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
 15. Abe M., Ito Y., Suzuki A., Onoue S., Noguchi H., Yamada S. Isolation and pharmacological characterization of fatty acids from saw palmetto extract. *Anal. Sci.: Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 2009;25:553–557. doi: 10.2116/analsci.25.553. [PubMed] [Cross Ref]
 16. Raman P., Dewitt D.L., Nair M.G. Lipid peroxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory activities of acidic aqueous extracts of some dietary supplements. *Phytother. Res.: PTR.* 2008;22:204–212. doi: 10.1002/ptr.2287. [PubMed] [Cross Ref]
 17. Goldmann W.H., Sharma A.L., Currier S.J., Johnston P.D., Rana A., Sharma C.P. Saw palmetto berry extract inhibits cell growth and cox-2 expression in prostatic cancer cells. *Cell Biol. Int.* 2001;25:1117–1124. doi: 10.1006/cbir.2001.0779. [PubMed] [Cross Ref]
 18. Tan H.Y., San-Marina S., Wang N., Hong M., Li S., Li L., Cheung F., Wen X.Y., Feng Y. Preclinical models for investigation of herbal medicines in liver diseases: Update and perspective. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2016;2016:4750163. doi: 10.1155/2016/4750163. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]

19. Eilken H.M., Adams R.H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010;22:617–625. doi: 10.1016/j.ceb.2010.08.010. [PubMed] [Cross Ref]
20. Mavria G., Vercoulen Y., Yeo M., Paterson H., Karasarides M., Marais R., Bird D., Marshall C.J. Erk-mapk signaling opposes rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9:33–44. doi: 10.1016/j.ccr.2005.12.021. [PubMed] [Cross Ref]
21. Prasad I., Zhou Y., Du Z., Chen J., Crawford R., Xiao Y. Osteocyte-induced angiogenesis via vegf-mapk-dependent pathways in endothelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2014;386:15–25. doi: 10.1007/s11010-013-1840-2. [PubMed] [Cross Ref]
22. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis–correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:1–8. doi: 10.1056/NEJM199101033240101. [PubMed] [Cross Ref]
23. Goel H.L., Mercurio A.M. Vegf targets the tumour cell. *Nature Rev. Cancer.* 2013;13:871–882. doi: 10.1038/nrc3627. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
24. Hoeben A., Landuyt B., Highley M.S., Wildiers H., Van Oosterom A.T., De Bruijn E.A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 2004;56:549–580. doi: 10.1124/pr.56.4.3. [PubMed] [Cross Ref]
25. Narasimhan P., Liu J., Song Y.S., Massengale J.L., Chan P.H. Vegf stimulates the erk 1/2 signaling pathway and apoptosis in cerebral endothelial cells after ischemic conditions. *Stroke.* 2009;40:1467–1473. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534644. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
26. Srinivasan R., Zabuawala T., Huang H., Zhang J., Gulati P., Fernandez S., Karlo J.C., Landreth G.E., Leone G., Ostrowski M.C. Erk1 and erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS ONE.* 2009;4:1277 doi: 10.1371/journal.pone.0008283. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
27. Gidwani B., Vyas A. A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs. *BioMed Res. Int.* 2015;2015:198–268. doi: 10.1155/2015/198268. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
28. Tiwari G., Tiwari R., Rai A.K. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J. Pharmacy Bioallied Sci.* 2010;2:72–79. doi: 10.4103/0975-7406.67003. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]
29. Irie T., Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Iii. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* 1997;86:147–162. doi: 10.1021/js960213f. [PubMed] [Cross Ref]
30. Schonfelder U., Radestock A., Elsner P., Hipler U.C. Cyclodextrin-induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. *Exp. Dermatol.* 2006;15:883–890. doi: 10.1111/j.1600-0625.2006.00481.x. [PubMed] [Cross Ref]
31. Leroy-Lechat F., Wouessidjewe D., Andreux J.-P., Puisieux F., Duchêne D. Evaluation of the cytotoxicity of cyclodextrins and hydroxypropylated derivatives. *Int. J. Pharm.* 1994;101:97–103. doi: 10.1016/0378-5173(94)90080-9. [Cross Ref]
32. Kwok C. Management of Side Effects from Chemotherapy. [(accessed on 13 January 2016)]. Available online: <https://www.hkacs.org.hk/ufiles/Chemotherapy.pdf>.
33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Method.* 1983;65:55–63. doi:

10.1016/0022-1759(83)90303-4. [PubMed] [Cross Ref]

34. Tan H.Y., Wang N., Man K., Tsao S.W., Che C.M., Feng Y. Autophagy-induced relb/p52 activation mediates tumour-associated macrophage repolarisation and suppression of hepatocellular carcinoma by natural compound baicalin. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1942. doi: 10.1038/cddis.2015.271. [PMC free article] [PubMed] [Cross Ref]