



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	第 1004 号
氏名	坪井 謙
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Zerumbone Inhibits Tumor Angiogenesis via NF- $\kappa$ B in Gastric Cancer (ゼルンボンは胃癌において NF- $\kappa$ B を介して腫瘍血管新生を阻害する)  Oncology Reports 31: 57-64, 2014
論文審査担当者	主査： 城 卓志 副査： 岡本 尚, 竹山 廣光

## 論文内容の要旨

### 【目的】

胃癌は世界で4番目に多い癌であり、肺癌に次いで癌死の2位である。胃癌において血管新生は腫瘍増殖因子の一つと報告されており、Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管新生を促すサイトカインの一つとして知られている。当教室では今までに、胃癌の血管新生モデルを用いて VEGF 発現と胃癌肝転移能の関連について報告してきた。また、胃癌患者における血清中 VEGF 濃度は健常人と比べ高いとの報告もあり、VEGF 発現は生存率にも関与すると述べられている。一方、胃癌では nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性が更新していることが報告されている。NF- $\kappa$ B はアポトーシスや癌発生、血管新生などを制御するといわれている。実際に NF- $\kappa$ B は胃癌の VEGF 発現と血管新生に関連するという報告があり、NF- $\kappa$ B や VEGF を標的とした抗血管新生薬は胃癌の新たな治療戦略となりうると考えられる。

Zerumbone は熱帯・亜熱帯に生息するハナショウガ(*Zingiber zerumbet* Smith)から生成された天然成分であり、抗炎症作用や抗腫瘍効果があると報告されている。Zerumbone の抗腫瘍効果については、他の癌種での報告は認めるが、胃癌での報告は認めていない。今回我々は、Zerumbone の NF- $\kappa$ B および VEGF を介した胃癌の血管新生抑制効果について検討した。

### 【方法】

胃癌細胞株のうち、VEGF の mRNA 発現とタンパク分泌能が高い AGS 細胞株を用いて Zerumbone の抗腫瘍効果を検討した。

- (1)細胞増殖効果をみるため、Zerumbone 刺激下で WST-1 assay を行った。
- (2)VEGF mRNA 発現量を調べるため、AGS を Zerumbone で刺激し、realtime RT-PCR を行った。
- (3)VEGF タンパク分泌量を測定するため、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を行った。
- (4)NF- $\kappa$ B 活性を調べるため、核タンパクを抽出し、NF- $\kappa$ B(p65) Transcription Factor Assay と Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行った。
- (5)血管新生効果をみるため、*in vitro* angiogenesis assay を行った。正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) と正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)を AGS と共培養し、さらに Zerumbone 処理の有無で管腔形成の違いを検討した。

### 【結果】

- (1)WST-1 assay では、72 時間培養で Zerumbone 濃度 10 $\mu$ M から腫瘍増殖抑制効果を認めた。
- (2)realtime RT-PCR では Zerumbone 処理により VEGF 発現の減少を認めた。
- (3)ELISA では、Zerumbone 処理により、培養上清中の VEGF の減少を認めた。
- (4)NF- $\kappa$ B 活性は Zerumbone 処理により濃度依存的に抑制された。
- (5)*In vitro* angiogenesis assay では、コントロール(HUVEC および NHDF のみ)と比較し、AGS との共培養により HUVEC の管腔形成能の亢進を認めた。これに 500nM または 1 $\mu$ M の Zerumbone 処理を行ったところ、亢進した HUVEC の管腔形成能は有意に低下した。AGS を共培養しないコントロール群に Zerumbone 処理を行ったが、HUVEC の管腔形成能は低下しなかった。

### 【結論】

胃癌細胞株 AGS において、Zerumbone は高濃度で腫瘍増殖抑制を認め、低濃度で血管新生抑制効果があることが確認できた。また、これらの効果は NF- $\kappa$ B 活性と関連があることが示唆さ

れた。低濃度の Zerumbone は正常血管内皮細胞を阻害しないことから、胃癌治療に対し、副作用のより少ない抗血管新生薬としての可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

【目的】腫瘍増殖因子の一つ VEGF は血管新生を亢進するサイトカインとして知られている。胃癌患者における局所の VEGF 発現と血清中の VEGF 濃度は生存率に関与するとの報告がある。一方、NF- $\kappa$ B はアポトーシスや癌発生、血管新生などを制御するといわれ、胃癌では NF- $\kappa$ B の活性が恒常的に亢進していることが多い。以上より NF- $\kappa$ B や VEGF を標的とした抗血管新生薬は胃癌の新たな治療戦略となりうると考えられる。Natural product の Zerumbone (ZB) は抗炎症作用や抗腫瘍効果が報告されている。ZB の抗腫瘍効果は、他の癌種での報告は認めるが、胃癌での報告はない。ZB の NF- $\kappa$ B および VEGF を介した胃癌の血管新生抑制効果について検討した。

【方法】胃癌細胞株のなかで、VEGF の mRNA 発現とタンパク分泌能が高い AGS 細胞株を主に用いて ZB の抗腫瘍効果を検討した。NF- $\kappa$ B 活性は NF- $\kappa$ B (p65) Transcription Factor Assay と EMSA を行った。血管新生効果は *in vitro* angiogenesis assay を行った。【結果】①WST-1 assay では、高濃度 ZB で腫瘍増殖抑制効果を認めた。②realtime RT-PCR では ZB 処理により VEGF 発現は減少した。③ELISA では、ZB 処理により、培養上清中の VEGF が減少した。④NF- $\kappa$ B 活性は ZB 処理により濃度依存的に抑制された。⑤ *In vitro* angiogenesis assay では、コントロール (HUVEC および NHDF のみ) と比較し、AGS との共培養により HUVEC の管腔形成能は亢進した。これに ZB 処理を行ったところ、亢進した HUVEC の管腔形成能は有意に低下した。

【結論】胃癌細胞株 AGS において、ZB は高濃度で腫瘍増殖抑制を認め、低濃度で血管新生抑制効果を認めた。また、これらの効果は NF- $\kappa$ B 活性との関連が示唆された。低濃度の ZB は HUVEC を阻害しないことから、胃癌治療に対し、副作用のより少ない抗血管新生薬としての可能性が示唆された。

主査 (城) から、①Vivo の成績はどうだったか。②ゼルンボンはどのように投与するのかなど、9 項目の質問があった。副査の岡本先生からは、①胃がん組織で NF- $\kappa$ B の持続的活性が起きている理由は何か。またそのエビデンスは何か。②ゼルンボンに含まれる有効成分は何か。その作用機序はどこまで解明されているか。③ゼルンボンにはさまざまな形の抗腫瘍活性が認められるが、その有効濃度が必ずしも一致していない理由は。また、どのような実験をすれば確認できるかなど、13 項目にわたって質問がなされた。副査の竹山先生からは、専門分野として①胃癌の進行度別に治療方法について②切除後の再建方法について質問がなされた。これらの質問に一部返答に窮することもあったが、おおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。

本論文は ZB の抗腫瘍効果を胃癌で初めて示した論文で、その作用には NF- $\kappa$ B や VEGF の関与が示唆されている。以上より ZB の胃癌の新たな治療法への可能性が示唆され、本論文の著者には博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。