◆トピックス◆

シコニン類縁体 β -HIVS によるがんの増殖・転移および血管新生の抑制

小見 悠介^{*1,2}, 中谷 一 泰^{*3}, 下門 顕太郎^{*2},
小 嶋 聡 一^{*1}

小見悠介

β -HIVS, a derivative of shikonin, suppresses cancer cell growth, angiogenesis, and metastasis *in vivo*

Yusuke KOMI^{*1,2}, Kazuyasu NAKAYA^{*3}, Kentaro SHIMOKADO^{*2},
Soichi KOJIMA^{*1}

東京医科歯科大学大学院 血流制御内科
2003年 東京理科大学 理学部 卒業
2005年 昭和大学 大学院 薬学専攻 修了

Key words: β -HIVS, angiogenesis, protein tyrosine kinase, cancer growth

はじめに

主な抗がん剤はがん細胞に直接作用し、DNA合成やRNA合成を止めるなどしてがん細胞の増殖を阻害したりがん細胞を殺したりする。しかし、一部のがんにしか効果が無いことや、薬剤耐性により副作用が目立ってしまうという問題がある。1971年にFolkmanによって腫瘍の発育は血管新生に依存していることが提唱され、抗がん剤開発に新たな幕が開かれた¹⁾。1998年、Folkmanらにより発見されたangiostatinとendostatinがマウスを用いた実験で血管新生の阻害を介し、副作用も薬剤耐性もなく、いろいろな固形腫瘍を根絶するという記事がNew York Timesに載り、世界中を震撼させた²⁾。2004年にはAvastin (Bevacizumab) というVEGFに対する抗体が血管新生阻害抗がん剤として世

界で初めて認可されており(米国)、血管新生阻害剤に対する期待が高まっている。本稿ではATP非拮抗型チロシンキナーゼ阻害剤である β -HIVSによるがんの増殖・転移および血管新生の抑制について我々の研究室で得られた知見を紹介する。

β -HIVSによる受容体型チロシンキナーゼの阻害

β -Hydroxyisovalerylshikonin (β -HIVS) は生薬「紫根」(*Lithospermum radix*)の主要成分であり、古くから創傷治癒や火傷の薬として使用されてきた³⁾。最近、 β -HIVSがチロシンキナーゼを阻害することによりがん細胞にアポトーシスを誘導する事が報告された(Fig. 1)^{3,4)}。多くのチロシンキナーゼ阻害剤はATPに対し拮

^{*1} 理化学研究所分子細胞病態学研究ユニット [〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1]
Molecular Cellular Pathology Research Unit, RIKEN [2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan]
Tel: 048-467-7938 Fax: 048-462-4675

^{*2} 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科血流制御内科学 [〒113-8619 東京都文京区湯島1-5-45]
Vascular Medicine and Geriatrics, Tokyo Medical and Dental University Graduate School [1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8619, Japan]

^{*3} 新潟薬科大学応用生命科学部応用生命科学科 [〒956-8603 新潟県新潟市東島265-1]
Animal Cell Biological Engineering, Niigata University of Pharmacy & Applied Life Science [265-1 Higashijima, Niitu, Niigata 956-8603, Japan]

Fig. 1 β -HIVS の構造, 抗がん活性及びチロシンキナーゼの阻害.

抗的に働くが, β -HIVS は EGFR などの受容体
型チロシンキナーゼを ATP 非拮抗的に阻害
し³⁾⁴⁾, その下流のシグナルである polo-like
kinase 1 (PLK1) や tumor necrosis factor
receptor-associated protein 1 (TRAP1) を阻害す
ることのでがん細胞にアポトーシスを誘導す
る⁵⁾⁶⁾.

β -HIVS による血管新生の抑制

我々は, β -HIVS が VEGF 受容体, 特に Flk-1
を阻害する (Fig. 1) ことから, 血管新生を抑
えるのではないかと予想し, ニワトリ胚漿尿膜
を用いた血管新生測定実験 (CAM assay), マウ
スを用いたがん細胞誘導血管新生測定実験
(DAS assay) およびマトリゲル内への血管の誘
導を測定する実験 (Matrigel plug assay) を用い
て β -HIVS の *in vivo* 血管新生に対する効果を
検証し, そのメカニズムについて解析を行なっ
た. β -HIVS は著者が今までスクリーニングし
てきた血管新生抑制物質の中では, 比較的低濃
度でニワトリ胚漿尿膜における微小血管の形成

を阻害した. 解析ソフトを使った解析の結果,
血管の流域面積の減少 (-19%) に比べ血管の
枝分かれ数の減少 (-52%) が激しかった. こ
の結果はアンジオポエチン2の産生誘導と
Tie-2 シグナルの抑制を介するレチノイン酸に
よる血管新生阻害効果⁷⁾ に似ているため,
 β -HIVS は Tie-2 のリン酸化シグナルを阻害し
ているかも知れない. DAS assay では, β -HIVS
を 30 mg/kg/day の用量で1日置きに2回投与
したマウスの背側皮下においては, マウス肺が
ん細胞 (Lewis Lung Carcinoma) を封入したチ
ャンバーに向かって誘導される血管新生が有意
に抑制されていた (Fig. 2). がん細胞は血管新
生を誘導するために大量の VEGF を産生放出
する. そこで, VEGF により誘導される血管新
生への影響を調べるために Matrigel plug assay
を行なったところ, β -HIVS は VEGF により誘
導される Matrigel 内への血管新生を有意に抑
制した. また, 免疫組織学的な解析により,
 β -HIVS は *in vitro* 培養血管内皮細胞並びに *in
vivo* 漿尿膜組織において, リン酸化チロシン量
を抑制することがわかった.

Fig. 2 β -HIVS によるがん細胞誘導血管新生の抑制
チャンバーに培地を満たしたもの (A) と, マウス肺がん細胞 (Lewis Lung Carcinoma) を満たしたもの (B&C) をマウス背側皮下へ移植し, 移植翌日より 1 日置きに 2 回, 溶媒 (B) または β -HIVS (C) を投与した. 移植後 4 日目に, チャンバーに向かって形成されるがん細胞誘導血管新生 (蛇行している太い血管) について評価した.

Fig. 3 β -HIVS による肺転移及び抗がん活性.
マウス背側皮下にがん細胞 (Lewis Lung Carcinoma) を移植し, 3 週間後に肺への転移を観察し (A, B), 移植がん組織の重さを測定した (C). (A) 移植 3 週間後のマウス肺の写真. (B) 転移したコロニー数の測定結果. (C) 移植部位のがん組織重量の測定結果.

β -HIVS によるがんの増殖・転移の抑制

さらに, β -HIVS を 10 mg/kg/day の用量で週 3 回, 3 週間投与したマウスにおいては, 背側皮下へ移植した 3LL 細胞の増殖及び肺への転移が顕著に抑制されていた (Fig. 3). これらの結果は β -HIVS がチロシンキナーゼの阻害を

介して, がん細胞と血管内皮細胞の増殖を阻害することによって, *in vivo* におけるがん細胞誘導性の血管新生を阻害し, がんの転移を防いでいることを示している (Fig. 4).

Fig. 4 β -HIVS のがん抑制機構.

おわりに

β -HIVS はチロシンキナーゼを ATP 非拮抗的に阻害すること、さらに ATP 拮抗的に働く抗がん剤 (Glivec) と併用することによって *in vitro* において相乗的にリン酸化を抑制し、がん細胞にアポトーシスを誘導することが報告されており⁵⁾、血管新生の抑制においても、他の ATP 拮抗型チロシンキナーゼ阻害抗がん剤との併用が期待される。 β -HIVS によるチロシンキナーゼ阻害のメカニズム説明が待たれるとこ

ろである。

謝辞：本実験は、筆頭著者が昭和大学大学院修士課程在学中に共同研究先の理化学研究所で行なった実験であり、ご指導頂きました板部洋之教授、中条茂男助教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Folkman J : Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285** : 1182-1186, 1971.
- 2) Kolata G : Tow drugs eradicate tumors in mice. *NY Times* May 3 1998.
- 3) Nakaya K, Miyasaka T : A shikonin derivative, β -hydroxyisovalerylshikonin, is an ATP-non-competitive inhibitor of protein tyrosine kinases. *Anticancer Drugs* **14** : 683-693, 2003.
- 4) Hashimoto S, Xu Y, Masuda Y, Aiuchi T, Nakajo S, Uehara Y, Shibuya M, Yamori T, Nakaya K : β -hydroxyisovalerylshikonin is a novel and potent inhibitor of protein tyrosine kinases. *Jpn J Cancer Res* **93** : 944-951, 2002.
- 5) Masuda Y, Nishida A, Hori K, Hirabayashi T, Kajimoto S, Nakajo S, Kondo T, Asaka M, Nakaya K : β -hydroxyisovalerylshikonin induces apoptosis in human leukemia cells by inhibiting the activity of a polo-like kinase 1 (PLK1). *Oncogene* **22** : 1012-1023, 2003.
- 6) Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, Horie M, Hori K, Nakajo S, Kajimoto S, Shibayama-Imazu T, Nakaya K : Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by β -hydroxyisovalerylshikonin. *J Biol Chem* **279** : 42503-42515, 2004.
- 7) Suzuki Y, Komi Y, Ashino H, Yamashita J, Inoue J, Yoshiki A, Eichmann A, Amanuma H, Kojima S : Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of Tie2 signaling in vascular progenitor cells. *Blood* **104** : 166-169, 2004.