

<平成 21 年度助成>

## ナノメカニカル特性を指標にした がん転移抑制効果を持つ香辛料成分の研究

菅 沼 雅 美

(埼玉県立がんセンター臨床腫瘍研究所)

### 1. はじめに

現在、日本では2人に1人ががんに罹患し、また3人に1人ががんにより死亡している。しかも、がんによる死亡の約9割ががん転移による。がん転移を効果的に抑制することができれば、がんによる死亡率を減少することができる。

1987年、私どもは緑茶カテキン(-)epigallocatechin gallate (EGCG) が、がんを予防することを世界で最初に発表して以来、「緑茶によるがん予防」の研究を継続している<sup>1,2)</sup>。最近、緑茶抽出物 GTE のサプリメントを用いて、1日10杯の緑茶飲用が、大腸ポリープの再発を予防することを臨床介入試験で証明することができた<sup>3)</sup>。現在日本では、緑茶は「がん予防飲み物」として広く認められている。一方、欧米では、緑茶カテキンカプセルをがん予防薬とする臨床研究が進められている<sup>4,5)</sup>。更に重要なことは、緑茶カテキン EGCG は、がんの発症を予防するだけでなく、がんの転移を抑制する活性を持つことである。たとえば、EGCG を含む飲料水の投与は、マウス悪性黒色腫 B16 細胞の実験的な肺転移を抑制した<sup>6)</sup>。これらの結果をもとに EGCG のがん転移抑制機構を基盤にすれば、副作用のない新しいがん転移抑制化合物を開発できると考える。

最近のナノテクノロジーの進歩によって開発された原子間力顕微鏡 (AFM) は、これまで観察できなかった細胞の物理学特性、すなわち、ナノメカニカル特性の測定を可能にし、生きた細胞の「弾性・固さ」を非破壊的に測定できる。AFM は、

1985年、IBMのG. Binnig博士らによって開発されたプローブ顕微鏡であり、カンチレバーの先端に構築されたプローブと細胞の間に働く原子間力を、カンチレバーの「反り」としてレーザーで増幅する、いわゆる「光てこの原理」で、ナニュートンという微細な力を検出できるために、生きた細胞の「弾性・固さ」の測定を可能にする(図1)。

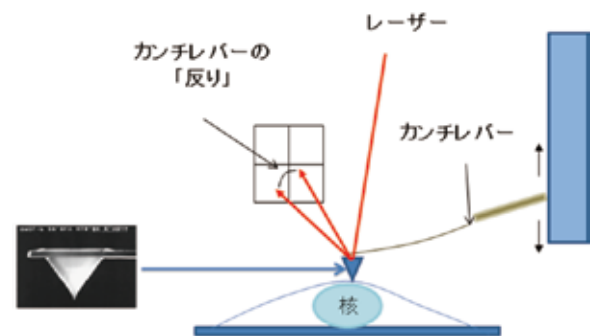


図1 AFMの原理

2007年、UCLAのGimzewski教授らは、肺がん、乳がん、膵臓がんの患者の腹水や胸水中から分離した転移性のがん細胞が、正常な中皮細胞よりも軟らかいナノメカニカル特性を持つことを発表した<sup>7)</sup>。以来、AFMで測定するがん細胞のナノメカニカル特性が、これまでの病理診断とは異なる新しい定量的な診断の指標として注目されている。おもしろいことに、彼らは、緑茶カテキンの処理が肺がん細胞の弾性を固く、正常細胞様の弾性に变化させることを発表した。がん細胞の弾性の变化は、緑茶カテキンのがん転移抑制機構として私どもが提唱している「シーリング効果」を説明するものと考え<sup>8)</sup>、AFMを用いたナノメカニカル特性を指標に緑茶カテキンのがん転移抑制機

構の研究を行っている。

本研究は、ナノメカニカル特性である細胞の弾性を指標にして、緑茶カテキンと同様に副作用のない新しいがん転移抑制化合物を、香辛料成分の中から見出すことを目的として研究を行った。

## 2. 方法

**2.1 化合物と細胞：** Curcumin, shogaol, diallyl sulfide, capsaicin 及び piperine は和光純薬、resveratrol はシグマアルドリッチ、(-)-epicatechin (EC) はフナコシより購入した。EGCG は緑茶から精製した 98% 以上の純品を用いた<sup>2)</sup>。マウス悪性黒色腫 B16-F10 細胞は、10% FBS を含む DMEM で培養維持した。

**2.2 AFM による細胞の弾性測定：** MFP-3D-Bio-J AFM (アサイラム) を用いた。B16-F10 細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を 6 cm カルチャーディッシュに播種した 2 日後、それぞれの化合物を添加し、4 時間処理した。1 細胞あたり、5 回の force curve 測定を 10 ~ 15 個の細胞について行った。測定用のカンチレバーは TR400PSA (オリンパス) を用い、1 Hz で計測した。弾性の指標である Young's modulus ( $E$ , Pa) は force curve を基に、ポアソン比 0.5 として Hertz 理論により求めた。

**2.3 Migration アッセイ：** B16-F10 細胞の migration 活性は Transwell cell culture chamber (Becton Dickinson) を用いて行った。B16-F10 細胞 ( $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ ) をそれぞれの濃度の化合物存在下で insert well に播種した。下のチャンバーには、 $5 \mu\text{g/ml}$  fibronectin と 0.1% BSA を含む無血清 DMEM を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、4 時間インキュベートした。70% エタノールで固定した後、トリパンプルーで染色し、フィルターの上面の細胞を除いた後、下面に migrate した細胞を  $\times 200$  倍で顕微鏡観察し、3 視野の細胞数をカウントした。未処理の migrate した細胞数を 100% として計算した。

**2.4 生存率アッセイ：** B16-F10 細胞 ( $1 \times 10^4/100 \mu\text{l}$ ) を 96 well プレートに播種し、それぞれの濃度の化合物を加えて 4 時間インキュベートした。生細胞数は、MTT 試薬を加え 3 時間後の 570 nm の吸収で測定した。生存率は未処理の細胞を 100% として表した。

**2.5 統計解析：** Young's modulus のデータはノンパラメトリカル Wilcoxon-Mann-Whitney で解析した。Migration アッセイの結果は Student's  $t$  test で解析した。

## 3. 結果

### 3.1 緑茶カテキンによる B16-F10 細胞の migration の抑制と弾性変化

がん転移のプロセスは、invasion、migration、adhesion、および angiogenesis 等の様々な機構が関与しているが、今回は、転移性がん細胞の特徴である migration を指標とした。B16-F10 細胞は B16 細胞亜株の中で転移能が高く、Transwell assay で  $5 \mu\text{g/ml}$  の fibronectin 存在下、4 時間で約 100 個の細胞が migrate した。この系に  $100 \mu\text{M}$  EGCG を加えると migrate した細胞数は 30% に減少した。一方、不活性な緑茶カテキン EC は有意な抑制効果を示さなかった (図 2A)。

次に、 $100 \mu\text{M}$  EGCG 処理後 4 時間の B16-F10 細胞の弾性を AFM によって測定し、 $100 \mu\text{M}$  EC 処理と比較した。未処理の B16-F10 細胞はほとんどが  $1,000 \text{ Pa}$  以下の Young's modulus を示し、中央値  $444 \text{ Pa}$  と非常に軟らかいナノメカニカル特性を示した。 $100 \mu\text{M}$  EGCG を処理すると、 $1,000 \text{ Pa}$  以上の固い細胞が増加し、中央値は  $770 \text{ Pa}$  と約 1.7 倍に固く、統計学的にも有意な ( $p < 0.0001$ ) 変化を示した。一方、 $100 \mu\text{M}$  EC の処理では、ヒストグラムのピークや中央値 ( $538 \text{ Pa}$ ) は未処理の細胞と同様であり、固く変化しなかった (図 2B)。この結果は、migration 抑制の結果と良く一致した。

以上の結果から、ナノメカニカル特性に及ぼす香辛料成分の活性評価は、処理後4時間で検討し、転移能は migration アッセイで行うこととした。

### 3.2 ナノメカニカル特性に及ぼす香辛料成分の効果

香辛料成分は、カレー粉に含まれるウコンの主成分である curcumin、ショウガ成分の shogaol、ニンニク成分の diallyl sulfide、トウガラシ成分

の capsaicin、コショウ成分の piperine および、赤ワインのポリフェノールである resveratrol の6種を用いた (図3)。

AFM 測定を行うにあたって、それぞれの化合物が毒性を示さない濃度を予め検討し、70%以上の生存率を示す濃度で細胞のナノメカニカル特性を測定した。

Curcumin 20  $\mu$  M、shogaol 50  $\mu$  M、diallyl

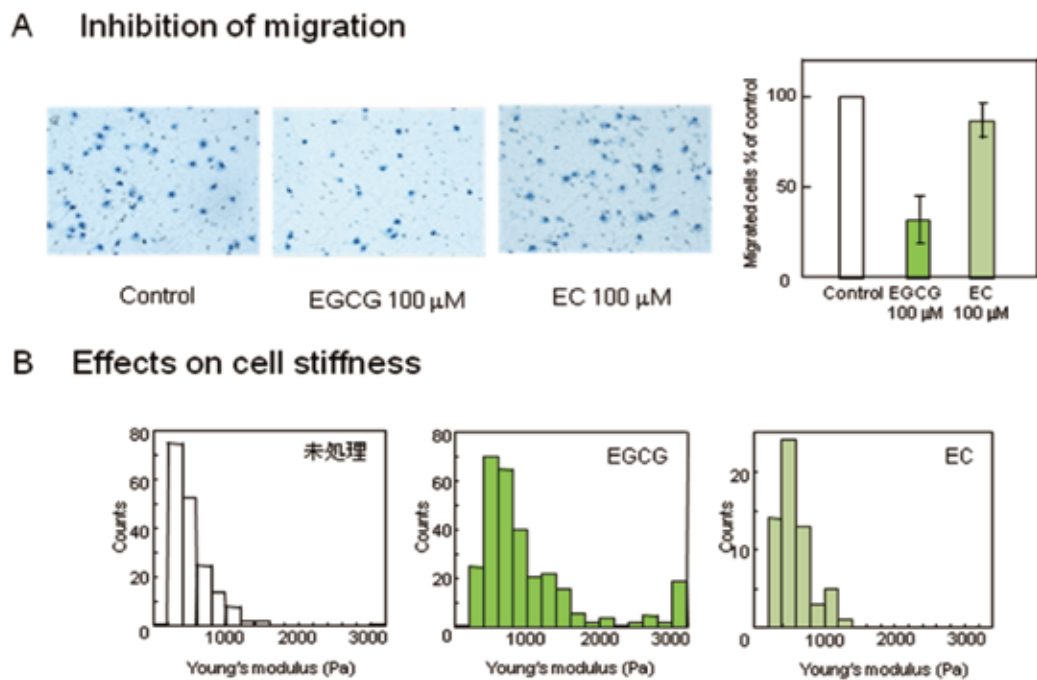


図2 緑茶カテキン EGCG による B16-F10 細胞の migration の抑制と細胞の弾性変化

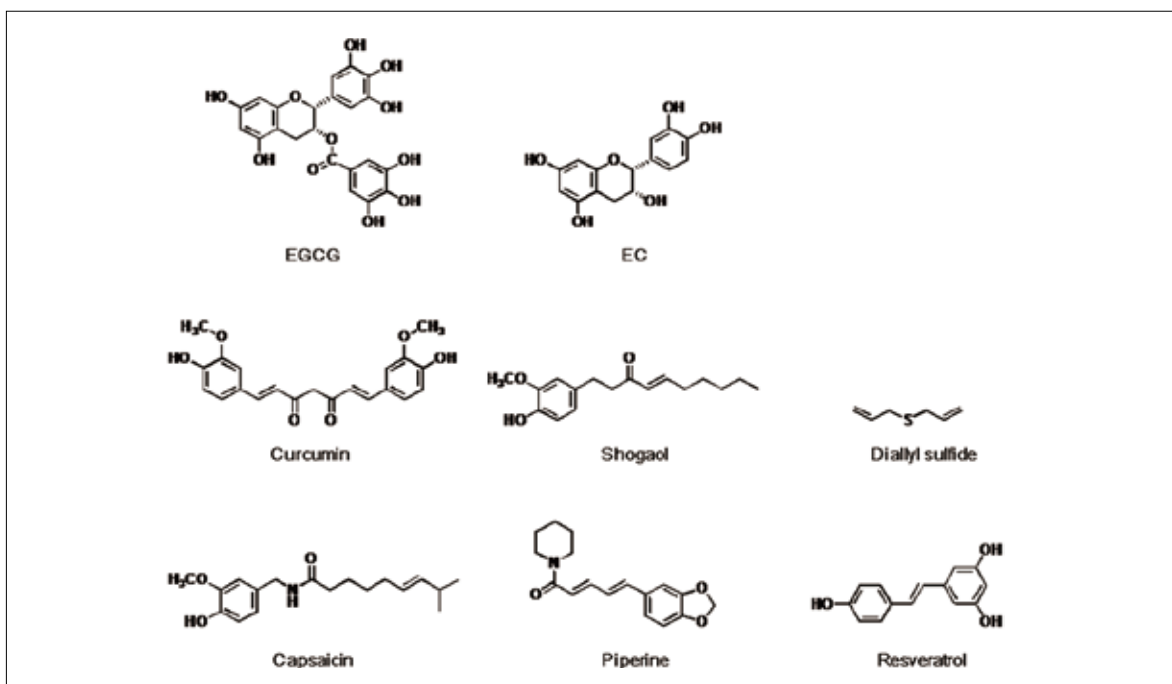


図3 緑茶カテキンと香辛料成分の構造

sulfide  $30 \mu\text{M}$  の処理は  $1,000 \text{ Pa}$  以上の細胞を増加し、ヒストグラムのピークが未処理の細胞に比べ幅広くなり、弾性を固く変化させた(図4)。それぞれの中央値は、curcumin:  $979.6 \text{ Pa}$ 、shogaol:  $807.6 \text{ Pa}$ 、diallyl sulfide:  $2,105 \text{ Pa}$  と未処理:  $622.1 \text{ Pa}$  に比べ、 $1.6 \sim 3.4$  倍固く変化させた(表1)。一方、capsaicin、piperine、と resveratrol は  $50 \mu\text{M}$  の濃度で有意な変化をもたらさなかった(図4、表1)。以上の結果から、curcumin、shogaol および diallyl sulfide が緑茶カテキン EGCG と同様な転移抑制活性を持つと考えられた。

### 3.3 香辛料成分による B16-F10 細胞の migration 抑制

それぞれの香辛料成分による B16-F10 細胞の migration に及ぼす効果を Transwell アッセイで検討した。細胞の弾性を固く変化させた curcumin、shogaol および diallyl sulfide は EGCG よりも低い濃度で B16-F10 細胞の migration を抑制した。50%抑制する濃度  $\text{IC}_{50}$  で比較すると curcumin:  $12 \mu\text{M}$ 、shogaol:  $30 \mu\text{M}$ 、diallyl sulfide:  $10 \mu\text{M}$ 、EGCG:  $62 \mu\text{M}$  であった。一方、細胞の弾性を変化させなかった capsaicin、

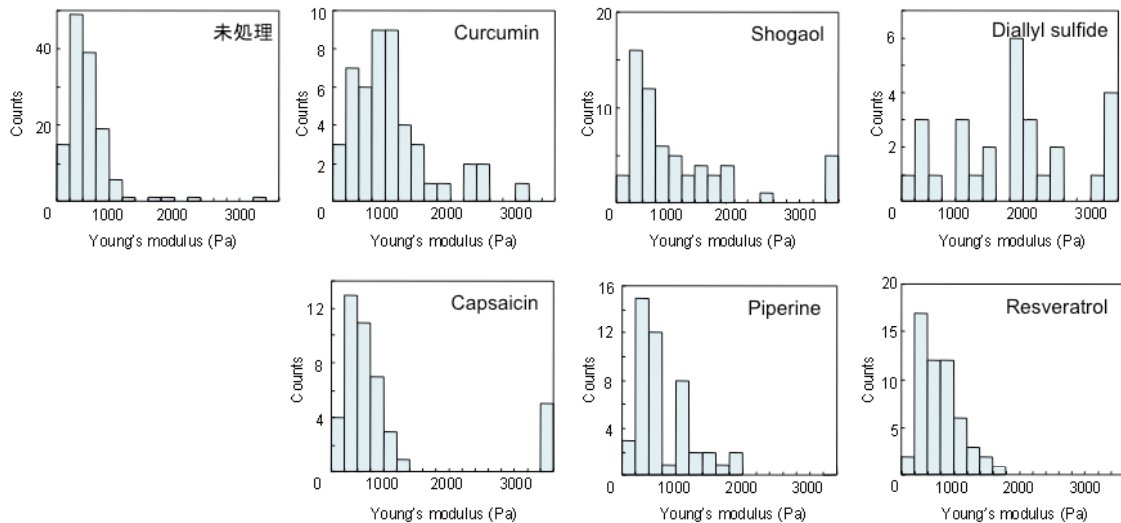


図4 香辛料成分の処理による B16-F10 細胞の弾性変化

表1 細胞の固さにおよぼす香辛料成分の効果とがん転移抑制活性

	濃度 ( $\mu\text{M}$ )	生存率 (%)	細胞の固さ Young's Modulus (E: Pa)	転移抑制 $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
未処理		100.0	622.1	-
Curcumin	20	68.5	979.6*	12
Shogaol	50	87.7	807.6**	30
Diallyl sulfide	60	98.6	2105.0*	10
Capsaicin	50	87.7	746.6	>100
Piperine	50	90.4	706.0	>100
Resveratrol	50	79.6	758.5	>100

\*:  $p < 0.0001$  \*\* :  $p < 0.001$

pipерine、と resveratrol は 100  $\mu$ M の濃度でも明らかな抑制効果を示さなかった (図 5、表 1)。

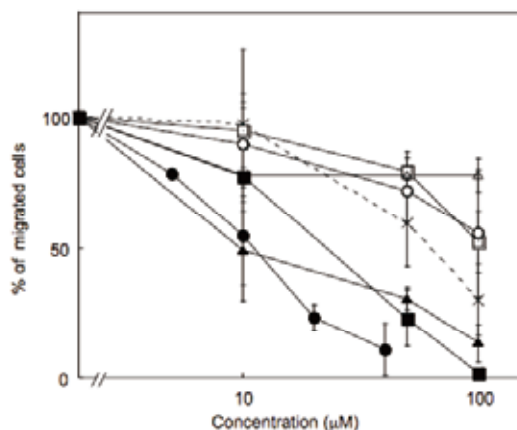


図 5 香辛料成分による B16-F10 細胞の migration の抑制  
 ●: curcumin, ■: shogaol, ▲: diallyl sulfide, ○: capsaicin,  
 △: piperine, □: resveratrol, X: EGCG

#### 4. 考 察

AFM を用いたがん細胞のナノメカニカル特性の研究は、非常に新しい研究であり、本研究によって、緑茶カテキン以外の化合物が毒性を示さない濃度でがん細胞の弾性を変化させること、および、弾性を固く変化させるとがん細胞の migration が抑制されること、の 2 点について初めて明らかにすることができた。今後、curcumin、shogaol および diallyl sulfide について *in vivo* でのがん転移抑制効果を検討することが重要である。

Curcumin は緑茶カテキンと同様のがん予防効果を持つ化合物として多くの研究が行われているが、その bioavailability が低いためヒトでの研究が期待ほど進んでいない<sup>9)</sup>。最近私共は、緑茶カテキンの EC が curcumin の細胞への取り込みを促進し、curcumin のがん細胞増殖抑制効果を増強することを見出した<sup>10)</sup>。EC と curcumin の併用が、単独処理よりも強くがん細胞のナノメカニカル特性を変化し、転移を抑制するか検討する計画である。

EGCG の処理は細胞膜の脂質変化をもたらし、

リピッドラフトを著しく減少する<sup>11)</sup>ことから、細胞膜の脂質の変化が細胞の弾性変化をもたらす一因であると考えている。EGCG と細胞を固く変化させた化合物、curcumin、shogaol と diallyl sulfide との構造の類似性はないが、同様な作用機構を介しているか今後検討したいと考えている。

最近、私どもは B16 細胞の転移能が異なる 3 種の亜株、B16-F10 (高い転移能) B16-BL6 (中等度の転移能) と B16-F1 (低い転移能) は、細胞の形態や増殖速度などは同じであるにもかかわらず、明らかに弾性が異なり、転移能の高い B16-F10 細胞が最も軟らかい特性を持つことを見出した<sup>12)</sup>。この結果は、AFM 測定による細胞の弾性が、がん転移の新しい診断に応用できることを示す。細胞の弾性は、様々な細胞内因子の変化、たとえば、細胞骨格を形成するアクチンの重合度や細胞膜の変化、さらには、核の状態などを反映していると考えられる。今後、細胞の弾性の生物学的意味を明らかにしていくとともに、緑茶カテキンや香辛料成分による弾性変化の作用機構と転移抑制活性との関連を検討し、新しい作用機構を持つ転移予防化合物を開発する計画である。

#### 謝 辞

本研究に研究助成いただきました浦上食品・食文化振興財団に心より深謝いたします。また、AFM 測定にご協力下さいました(独)物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 中山知信主任研究者に感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Fujiki H. Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. *Chem Rec* 2005; 5: 119-32.
- 2) Suganuma M, Kurusu M, Suzuki K, *et al.* Green tea polyphenol stimulates cancer preventive effects of celecoxib in human lung cancer cells by upregulation of *GADD153* gene. *Int J Cancer* 2006; 119: 33-40.
- 3) Shimizu M, Fukutomi Y, Ninomiya M, *et al.* Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal

- adenomas: A pilot study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3020-5.
- 4) Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, *et al.* Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: A preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res* 2006; 66: 1234-40.
  - 5) Tsao AS, Liu D, Martin J, *et al.* Phase II randomized, placebo-controlled trial of green tea extract in patients with high-risk oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res* 2009; 2: 931-41.
  - 6) Taniguchi S, Fujiki H, Kobayashi H, *et al.* Effect of (-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea, on lung metastasis with mouse B16 melanoma cell lines. *Cancer Lett* 1992; 65: 51-4.
  - 7) Cross SE, Jin YS, Rao J, Gimzewski JK. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol* 2007; 2: 780-3.
  - 8) Yoshizawa S HT, Suganuma M, Nishiwaki S, *et al.* Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose and (-)-epigallocatechin gallate. *ACS Symposium Series* 1992; 507: 316-25.
  - 9) Aggawal BB, Kumar A, Aggawal MS, Shishodia S. Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): A spice for all seasons. In Bagchi D, Preuss HG, eds, *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*, New York : CRC press 2005: 349-87.
  - 10) Saha A, Kuzuhara T, Echigo N, *et al.* New role of (-)-epicatechin in enhancing the induction of growth inhibition and apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Prev Res* 2010; 3: 953-62.
  - 11) Adachi S, Nagao T, Ingolfsson HI, *et al.* The inhibitory effect of (-)-epigallocatechin gallate on activation of the epidermal growth factor receptor is associated with altered lipid order in HT29 colon cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 6493-501.
  - 12) Suganuma M, Kuramochi H, Watanabe T, *et al.* *Proc. Jpn. Cancer Assoc* 2010; 69: 253-254.

## **New inhibitors of metastasis found in various spices, based on nanomechanical property measured by atomic force microscopy (AFM)**

**Masami Suganuma**

*Research Institute for Clinical Oncology  
Saitama Cancer Center*

Despite improvement in diagnosis and treatment, metastasis remains the principal cause of death of cancer patients. So finding of effective and non-toxic inhibitors of metastasis is one of the most important subject in cancer research.

We first reported the cancer preventive activity of the green tea catechin (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in 1987, and we have continued to expand the study of cancer prevention based on “consumption of green tea”. We proved that drinking 10 cups of green tea daily, supplemented with green tea tablets, significantly prevented recurrence of colorectal adenomas in patients after polypectomy. Furthermore, EGCG can inhibit of metastasis of mouse melanoma cells B16-F10 cells in mice, so we think that we will able to find new inhibitors of metastasis by studying the mechanisms of EGCG.

Atomic force microscopy (AFM) makes it possible to determine the nanomechanical properties of cancer cells, such as cell stiffness. In 2007, Gimzewski *et al.* reported that metastatic cells in the body fluid of cancer patients was significantly softer than normal mesothelial cells, and that treatment with EGCG increased stiffness of cancer cells. So we started to study the inhibitory mechanism of metastasis with EGCG focusing on the nanomechanical property of cancer cells as measured by AFM.

In the study, we first found that EGCG significantly inhibited the migration of B16-F10 cells examined by Transwell assay, but that (-)-epicatechin (EC) did not. Treatment with 100  $\mu$ M EGCG for 4 hr significantly increased Young’s modulus, with a median value of 770 Pa from 444 Pa, indicating the cells became stiffer, but 100  $\mu$ M EC did not have any such effect.

Next, we examined the effects of components of some spices on cell stiffness as determined by AFM 4 hr after treatment: curcumin in turmeric, shogaol in ginger, diallyl sulfide in garlic, capsaicin in hot pepper, piperine in pepper and resveratrol in red wine. Curcumin, shogaol and diallyl sulfide significantly increased stiffness of B16-F10 cells to stiffer than in non-treated cells, while capsaicin, piperine and resveratrol did not. Using Transwell assay, we found that curcumin, shogaol and diallyl sulfide inhibited migration of the cells, indicating inhibition of metastasis, but the other 3 compounds did not. These results clearly indicate that compounds increasing cell stiffness have potential to inhibit metastasis.