

プロポリス成分 CAPE およびその類縁体の 癌転移抑制活性に関する研究

門田 重利・手塚 康弘

プロポリスは、ミツバチが種々の花粉・樹液などと自らの唾液を混ぜ合わせて作り出す膠状物質であり、その歴史は非常に古く、紀元前 300 年頃からすでに民間薬として用いられていた (Ghisalberti, 1979). その広い抗菌スペクトルや、抗ウイルス、抗炎症、抗酸化、抗腫瘍、鎮痛、肝保護作用などの多種多様な生物活性を有している (Ghisalberti, 1979; Burdock, 1998; Banskota et al., 2001a) ことから、近年、我が国においても健康食品として広く活用されるようになってきている。

私たちの研究室では、以前からブラジル産プロポリスについて種々の研究を行い、その成分を明らかにするとともに、フラボノイドやジカフェオイルキナ酸誘導体による肝保護活性、抗糖尿病活性、抗酸化活性、細胞増殖阻害活性を見出している (Basnet et al. 1996; Banskota et al., 1998, 2001b; Matsushige et al., 1996a,b). さらに、ブラジル産以外のオランダ産、中国産、ペルー産等についても研究を行い、オランダ産プロポリスのメタノールエキスが murine colon 26-L5 carcinoma 細胞に対して強い細胞増殖阻害活性 (半数抑制濃度 IC₅₀ 値: 3.5 μg/mL) を有し、その活性がベンジルカフェエート、フェネチルカフェエート、シンナミルカ

フェエート等のカフェイン酸エステル類によることを明らかにした (Banskota et al., 2002). これらカフェイン酸エステル類は主にヨーロッパ産プロポリスに含まれているが、その研究は主として代表的化合物のカフェイン酸フェネチルエステル (caffeic acid phenetyl ester = CAPE) について行われており、抗菌、抗炎症、抗酸化、抗腫瘍などの作用や HIV-1 インテグラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼなどに対する酵素阻害、腫瘍壊死因子 (TNF) や活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) による NF-κB 活性化の阻害活性が報告されている (Borrelli and Capasso, 2003). その一方で CAPE 類縁体に関する研究はほとんどなされておらず、検討されているカフェイン酸部分の修飾では満足いく結果は得られていない。そこで私たちは、十分な検討がなされていないアルキル側鎖の違いによる活性相関に注目し、21 種の CAPE およびその類縁体 (CAPE 類, 図 1) を合成して抗腫瘍活性を検討することにした。

CAPE 類の癌細胞増殖阻害活性

図 1 に示した 21 種の CAPE 類について、肝転移性癌細胞 1 種 [murine colon 26-L5 carci-

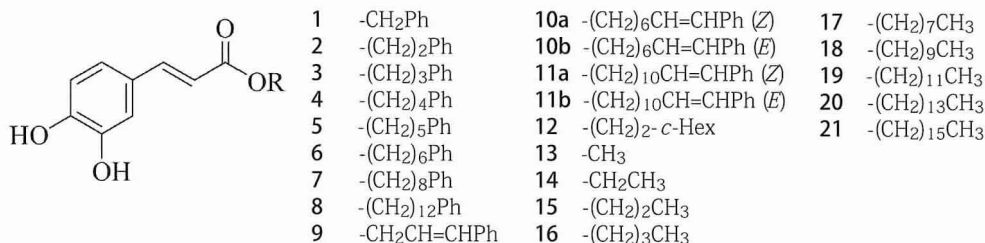


図 1 CAPE 類の構造。アルキル鎖の異なる 21 種の類縁体 (10 および 11 には幾何異性体がある)。

nomia (colon 26-L5) 細胞], 肺転移性癌細胞 3 種 [murine B16-BL6 melanoma (B16-BL6) 細胞, murine Lewis lung carcinoma (LLC) 細胞, human HT-1080 fibrosarcoma (HT-1080) 細胞] および転移能の低い癌細胞 2 種 [human lung A549 adenocarcinoma (A549) 細胞, human cervix HeLa adenocarcinoma (HeLa) 細胞] の計 6 種の癌細胞に対する増殖阻害活性 (半数影響濃度 EC₅₀ 値) を求めた (表 1) (Nagaoka et al., 2002). CAPE 類は colon 26-L5 細胞, B16-BL6 細胞, LLC 細胞に対して, 特に colon 26-L5 細胞に対して, 非常に強い増殖阻害活性を示した. 化合物 **4**, **10a**, **10b**, **12** の EC₅₀ 値はそれぞれ 0.02, 0.02, 0.02, 0.03 μM であり, ポジティブコントロールとして用いた抗腫瘍薬の 5-フルオロウラシル (5-FU, EC₅₀ 値: 0.06 μM) やドキシソルピシン (EC₅₀ 値: 0.04 μM) と同程度の活性であった. CAPE 類が増殖

阻害活性を示したこれらの細胞はマウス由来の高い転移能を有する細胞であり, しばしば癌転移の実験に用いられている. CAPE 類がこれらの細胞に対し有意な活性を示したことは, CAPE 類の抗癌転移薬としての可能性を示唆するものである. また, CAPE 類が種々の腫瘍細胞に対して細胞毒性を示すことは既知である (Chen et al., 1996; Lee et al., 2000) が, 今回の colon 26-L5 細胞に対する活性は, 従来報告されている活性値の 10 ~ 100 倍強いものである. このことは CAPE 類が大腸癌に対する良い抗癌剤になる可能性を示唆するものといえる.

今回調べた CAPE 類は構造上 4 つのグループに分類できる. つまり, (1) 直鎖アルキルの末端にフェニル基を有するエステル (**1** ~ **8**, グループ 1), (2) 直鎖アルキルの末端にスチリル基を有するエステル (**9** ~ **11**, グループ 2), (3) 直鎖アルキルの末端にシクロヘキシル基を

表 1 CAPE 類の細胞増殖阻害活性

化合物	EC ₅₀ (μM)					
	Colon 26-L5	B16 BL-6	LLC	HT-1080	A549	HeLa
1	1.34	5.73	7.90	12.1	19.6	25.3
2	0.15	2.57	2.18	14.4	32.4	10.7
3	0.10	2.32	2.16	18.1	23.5	22.0
4	0.02	2.29	1.99	13.3	31.6	20.0
5	0.08	1.27	2.12	7.38	21.9	10.6
6	0.08	1.40	1.85	10.4	21.4	9.11
7	0.09	0.84	1.81	20.2	22.4	2.61
8	1.75	8.11	17.2	62.8	21.2	18.4
9	0.22	2.16	2.83	17.1	50.0	11.5
10a	0.02	0.88	1.77	10.51	22.3	1.93
10b	0.02	1.01	1.49	10.21	33.5	1.91
11a	1.17	1.93	7.20	37.3	38.1	7.30
11b	2.49	2.42	7.23	38.4	37.5	8.59
12	0.03	0.74	2.00	11.8	28.1	9.54
13	3.27	4.61	16.7	35.2	43.7	26.8
14	1.14	4.39	4.64	33.4	61.9	24.4
15	1.52	3.30	3.87	17.9	42.9	21.9
16	0.27	2.48	2.78	20.2	42.2	4.02
17	0.22	1.19	2.23	20.0	34.6	2.40
18	0.25	1.15	2.06	14.2	21.4	1.85
19	0.29	0.77	1.80	19.1	21.4	2.00
20	16.1	2.56	14.7	19.9	18.5	10.0
21	10.2	13.3	15.6	36.9	23.7	14.6
Caffeic acid	43.6	318	314	257	288	300
5-FU	0.06	4.69	8.76	5.00	3.61	0.76
Doxorubicin	0.04	0.09	0.22	0.06	0.20	0.12

有するエステル (12, グループ 3) および (4) 直鎖アルキル基だけを有するエステル (13 ~ 21, グループ 4) である. グループ 1 とグループ 2 (エステル 3, 7, 8 vs. 9, 10, 11) ではほとんど同等の活性をもち, アルキル鎖末端での共役二重結合は活性に影響を与えないと考えられる. また, 化合物 10 および 11 には Z 体 (10a および 11a) と E 体 (10b および 11b) が存在するが, 試験したすべての細胞において細胞増殖抑制活性に大きな差は認められなかったことからスチリル基の幾何異性は活性に影響を及ぼさないと考えられる. 一方, グループ 1 のエステル 2 とグループ 3 のエステル 12 では, エステル 12 が若干ではあるがより強い活性を示しており, アルキル鎖末端のフェニル基をシクロヘキシル基に変換することにより, 活性が増強される可能性を示唆している. さらに, グループ 1 とグループ 4 では, グループ 1 の方が強い活性を有しており, アルキル鎖末端のフェニル基が重要であることを示している. 次にアルキル鎖の長さについてみると, 直鎖アルキ

ルの末端にフェニル基を有するグループ 1 の化合物では, アルキル鎖長が 8 個まではアルキル鎖が長くなるにつれ活性が増強されたが, さらに長くなると活性の減弱が認められた. エステル部位に直鎖アルキル基だけを持つグループ 4 の化合物の場合はより明瞭な構造活性相関が認められ, メチルエステル 13 から鎖長が長くなるにつれ活性は増強し, 鎖長が 8 ~ 12 個 (17 ~ 19) で活性は最大となり, さらに鎖長が伸びると活性は逆に減弱した (図 2).

これら一連の CAPE 類の強い細胞増殖阻害活性が癌細胞へのアポトーシス誘導作用によることは, CAPE (2) が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で colon 26-L5 細胞に顕著な DNA 断片化を引き起こすことから示唆された. その一方で, CAPE 類はマウス初代培養肝細胞 (正常細胞) には 100 μM の濃度においても毒性を示さなかった. すなわち, CAPE 類は正常細胞には毒性を持たず, 増殖能の高い癌細胞に特異的に増殖阻害もしくは細胞毒性を示す可能性が考えられる. なお, CAPE 類が DPPH フリーラジカル補足活性を有

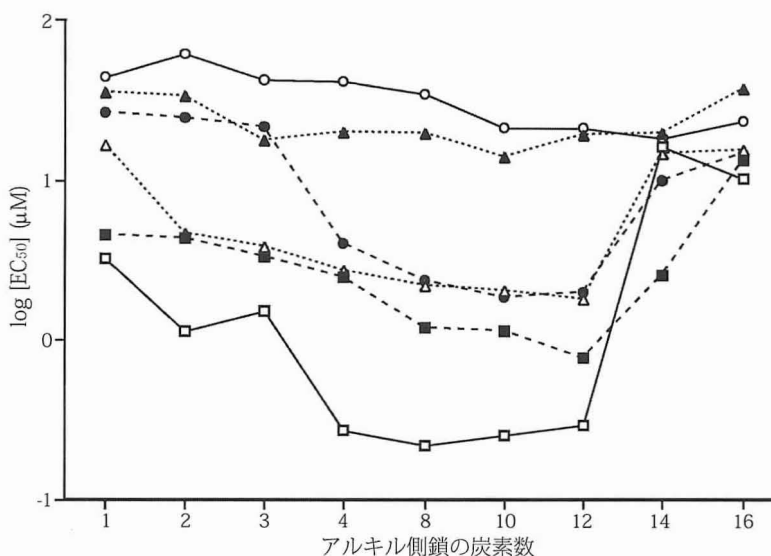


図 2 アルキル鎖を有する CAPE 類 13 ~ 21 の鎖長 (炭素数) と活性 (EC_{50} 値) の関係

- = マウス colon 26-L5 carcinoma
- = マウス B16-BL6 melanoma
- △ = マウス Lewis lung carcinoma (LLC)
- ▲ = ヒト HT-1080 fibrosarcoma
- = ヒト lung A549 adenocarcinoma
- = ヒト cervix HeLa adenocarcinoma

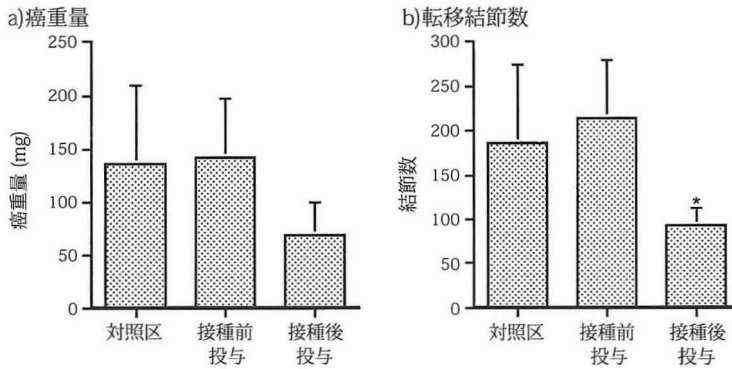


図3 CAPE(2) (1日1回, 経口, 7日間) の投与が colon 26-L5 細胞の肺転移に及ぼす効果
癌細胞移植後 15 日目に肺の癌重量 (a) および転移結節数 (b) を測定。
実験は 1 群 6 匹で行い, データは平均値±標準偏差で表示した。 ** $p < 0.05$ 。

し (Banskota et al., 2002), CAPE (2) がヒト好中球において活性酸素種 (ROS) の生成を阻害する (Mirzoeva et al., 1995) との報告から, CAPE 類の細胞増殖阻害活性発現には抗酸化活性やアポトーシス誘導が関係していると考えられる。

CAPE 類の癌転移抑制活性

前述の様に, CAPE 類の転移性癌細胞に対する増殖抑制活性は強く, 抗転移薬となりうる可能性が示唆された。これまでに CAPE (2) の原発癌に対する作用はいくつか報告がある (Huang et al., 1988, 1996; Frenkel et al., 1993; Mahmoud et al., 2000) が, 癌転移の阻害効果は検討されていない。癌転移は癌患者の死亡原因の主要なもの1つであり, それを阻害する薬物は抗腫瘍薬の重要なターゲットの一つであることから, 私たちは CAPE 類の癌転移抑制活性について検討した (Nagaoka et al., 2003b)。

まず最初に, 肺に高頻度で転移する B16-BL6 メラノーマ細胞を用いて検討したが有意な効果は認められなかった。そこで, 次に, CAPE 類が最も強く増殖を阻害した colon 26-L5 細胞を用いて検討を行った。6 週齢の雌 Balb/c マウスに colon 26-L5 細胞を 2×10^4 個尾静脈より接種し, 癌細胞接種 15 日目にエーテル麻酔を行い, 肺を摘出して, 肺に形成された転移結節数を実体顕微鏡下で計測した。また, 各マウス群の肺重量から無処置群の肺重量の平均を引く

ことにより癌重量を算出した。癌細胞接種前に 7 日間 CAPE (2) (5 mg/mice) を経口投与した群では転移抑制効果は見られなかったが, 癌細胞接種後に 7 日間 CAPE (2) (5 mg/mice) を経口投与した群においては, 癌重量および転移結節数ともに約 50% の抑制が認められた (図 3)。特に, その抑制作用は転移結節数で顕著に有意差が認められた。癌細胞接種前の CAPE 投与で効果が見られなかったことから, CAPE (2) は免疫細胞の活性化ではなく, 細胞毒性や増殖抑制または浸潤阻害など癌細胞への直接作用によって転移を抑制したと考えられる。この効果はシスプラチン (CDDP) の作用 (癌重量で 89% 抑制, 転移結節数で 71% 抑制) に比べると弱いものの, CAPE (2) 投与群はシスプラチン投与群でみられた体重減少を示さず, CAPE (2) の安全性の高さが示されたと考えられる。

次いで CAPE 類の colon 26-L5 細胞に対する転移抑制効果を検討した。前述のように, CAPE 類はその構造に基づいて 4 グループに分類されることから, 各グループの中で colon 26-L5 細胞に対する増殖阻害活性が最も強かった 4-phenylbutyl caffeate (4), 8-phenyl-7-octenyl caffeate (10, Z/E = 77/23 の混合物), 2-cyclohexylethyl caffeate (12), n-octyl caffeate (17) の 4 種を選んで実験を行った (図 4)。その結果, CAPE が癌重量で 38% の抑制率を示したのに対し, エステル 4 は 58%, 10 は 32%, 12 は 70%, 17 は 32% の抑制率を示した。

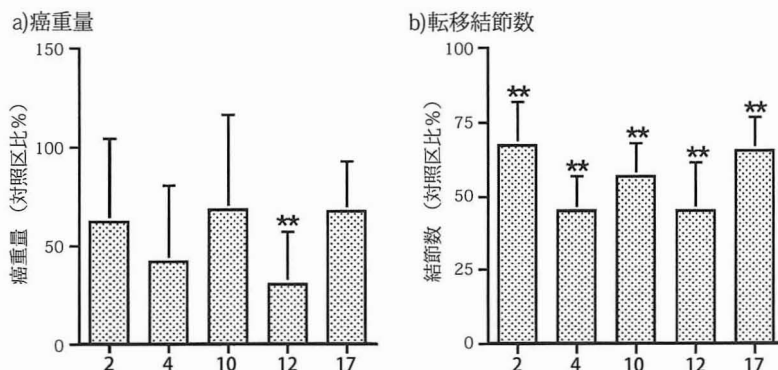


図4 CAPE類が colon 26-L5 細胞の肺転移に及ぼす効果
癌細胞移植後 7 日間経口投与し、15 日目に肺の癌重量 (a) および
転移結節数 (b) を測定。実験は 1 群 6 匹で行い、データは平均値±
標準偏差で表示した。 ** $p < 0.01$ 。

一方、転移結節数では試験した全ての化合物で有意な抑制効果が認められ、CAPE が 33% の抑制率を示したのに対し、エステル 4 および 12 はともに 55% の抑制率と CAPE よりも強い活性を示した。またエステル 10 は 43%、エステル 17 は 35% の抑制率と CAPE とほぼ同等の活性を示した。この傾向は *in vitro* において見られたのと同様の傾向である。

CAPE (2) は以前に強い抗酸化活性を有し、ヒト好中球やキサンチン—キサンチンオキシダーゼ系において活性酸素種 (ROS) の生成を阻害することが報告されている (Mirzoeva et al., 1995)。一方、癌細胞の活性酸素種 (ROS) は正常細胞に比べ高濃度に維持されており、細胞増殖に関連するシグナルのセカンドメッセンジャーとして働いていると考えられている (Chunery et al., 1998)。したがって、CAPE 類が持つ抗酸化活性が転移抑制作用に関与していると考えられる。その他、CAPE (2) はインテグリンによる細胞接着に関与する focal adhesion kinase (FAK) のチロシンリン酸化を阻害してヒト結腸癌細胞の浸潤を阻害することも報告されている (Weyant et al., 2000)。また、細胞の恒常性の維持や細胞増殖の調節に関与する gap junctional intercellular communication (GJIC) は癌細胞では減少しており、CAPE にはこのタンパク質を増加する作用を有することも報告されている (Na et al., 2000)。これ

らの作用も CAPE 類の転移抑制活性に関与している可能性も考えられる。

おわりに

私たちは、まず、*in vitro* の系で CAPE 類が colon 26-L5 細胞、B16-BL6 細胞、LLC 細胞といった転移性の癌細胞に対して強い増殖阻害活性を示し、その阻害活性がアルキル鎖の長さに依存すること、末端フェニル基やシクロヘキシル基の存在が活性を増強することを明らかにした。次いで、高転移性の癌細胞である colon 26-L5 細胞の肺転移を指標とする *in vivo* の系を用いて、CAPE 類が癌細胞接種後の経口投与により転移抑制効果を示すことを明らかにした。その際、体重減少などの副作用が認められなかったことから、CAPE 類の安全性は高いと考えられる。その他、今回は省略したが CAPE 類が強い NO 産生抑制活性を有することも明らかにしている (Nagaoka et al., 2003a)。このように興味深い活性を示すことから、今後 CAPE 類が医薬品開発のリード化合物になるものと期待している。

(〒930-0194 富山市杉谷 2630

富山医科薬科大学和漢薬研究所化学応用分野)

引用文献

- Banskota A. H. et al. 1998. J. Nat. Prod. 61: 896–900.
Banskota A. H. et al. 2001a. Phytother. Res. 15: 561–

- Banskota A. H. et al. 2001b. *Phytomedicine* 8: 16–23.
- Banskota A. H. et al. 2002. *J. Ethnopharmacol.* 80: 67–73.
- Basnet P. et al. 1996. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 1479–1484.
- Borrelli F., Capasso F. 2003. *ミツバチ科学* 24: 67–70.
- Burdock G. A. 1998. *Food Chem. Toxicol.* 36: 347–363.
- Chen J. H. et al. 1996. *Cancer Lett.* 108: 211–214.
- Chinery R. et al. 1998. *Cancer Res.* 58: 2323–2327.
- Frenkel K. et al. 1993. *Cancer Research* 53: 1255–1261.
- Ghisalberti E. L. 1979. *Bee World* 60: 59–84.
- Huang M.-T. et al. 1988. *Cancer Research* 48: 5941–5946.
- Huang M.-T. et al. 1996. *Carcinogenesis* 17: 761–765.
- Lee Y. J. et al. 2000. *Cancer Lett.* 153: 51–56.
- Mahmoud N. N. et al. 2000. *Carcinogenesis* 21: 921–927.
- Matsushige K. et al. 1996a. *Phytomedicine*, 3: 203–209.
- Matsushige K. et al. 1996b. *J. Trad. Med.* 13: 217–228.
- Mirzoeva O. K. et al. 1995. *Bioorganicheskaja Khimiia* 21: 143–151.
- Na H.-K. et al. 2000. *Cancer Lett.* 157: 31–38.
- Nagaoka T. et al. 2002. *Bioorg. Med. Chem.* 10: 3351–3359.
- Nagaoka T. et al. 2003a. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 487–491.
- Nagaoka T. et al. 2003b. *Biol. Pharm. Bull.* 26: 638–641.
- Weyant M. J. et al. 2000. *Clin Cancer Res.* 6: 949–956.

SHIGETOSHI KADOTA, YASUHIRO TEZUKA. Study on anti-metastatic activity of a propolis constituent, CAPE, and its analogues. *Honeybee Science* (2004) 25(3): 107–112. Division of Natural Product Chemistry, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Sugitani 2630, Toyama, 930-0194 Japan.

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its 20 analogues were tested by MTT assay on growth of six tumor cell lines, and found that CAPE analogues possess selective antiproliferative activity towards highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. Then, the effects of CAPE analogues on the metastatic development of murine colon 26-L5 carcinoma cell in the lung were examined. The oral administration of CAPE (5 mg/mice/d) for 7 d after tumor inoculation decreased the tumor weight and the number of tumor nodules in the lung by 50% and 50%, respectively, compared to the control. Beside CAPE, 4-phenylbutyl caffeate, 8-phenyl-7-octenyl caffeate, 2-cyclohexylethyl caffeate, and *n*-octyl caffeate at an oral dose of 2 mg/mice/d caused a 55%, 43%, 55%, and 35% reduction of the tumor nodules in their lung metastasis formation, respectively. These results further elaborate the possibility of CAPE and its analogues to become a new class of chemopreventive agents for the treatment of colon cancer metastasis.