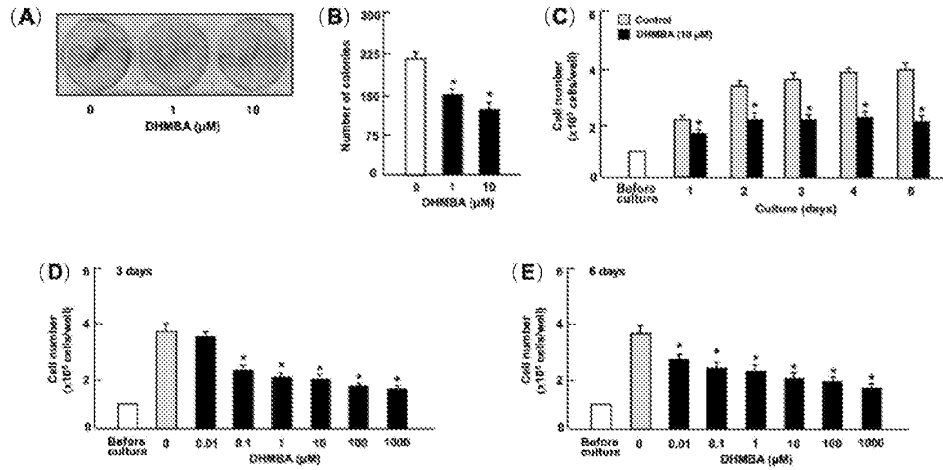


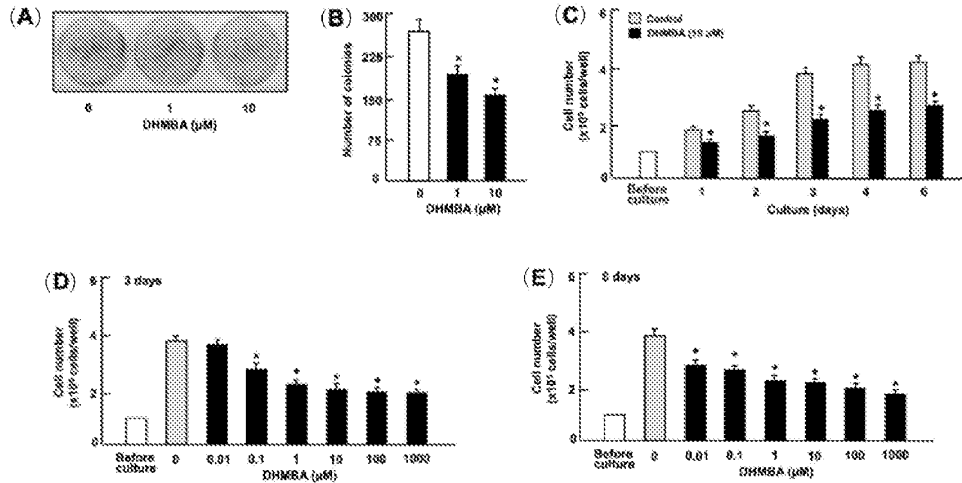
[図1]



3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)のヒト前立腺がんPC-3細胞の増殖に及ぼす抑制効果を説明する説明図。

図1(A): PC-3細胞 (1×10³ 細胞数/6 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (1あるいは10 μM)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン (fungizone) 含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、9日間培養した。**図1(B):** コロニー数を計数した。**図1(C):** PC-3細胞 (1×10⁵ cells/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (10 μM)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、1-6日間培養した。**図1(D)、図1(E):** PC-3細胞 (1×10⁵ cells/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (0.01、0.1、1、10、100、1000 μM)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3**図1(D)** 及び 6**図1(E)**日間培養した。培養後、デッシュの底面に付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。*p<0.001 対照(白あるいはグレーバー)と比較して、1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

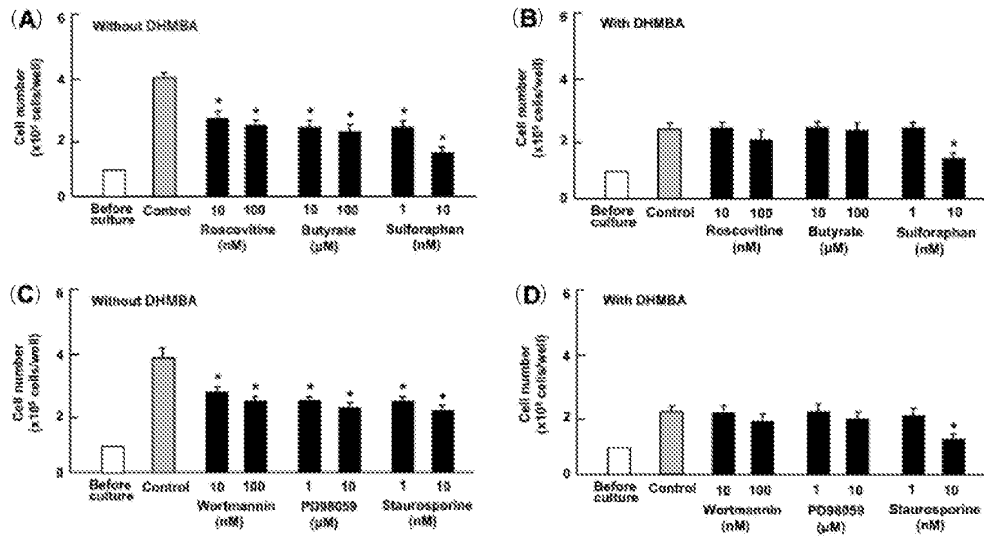
[図2]



3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)のヒト前立腺がんDU-145細胞の増殖に及ぼす抑制効果。

図2(A): DU-145細胞 (1×10^5 cells/6 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (1あるいは10 μ M)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、9日間培養した。図2(B): コロニー数を計数した。図2(C): DU-145細胞 (1×10^5 cells/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (10 μ M)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、1-6日間培養した。図2(D, E): DU-145細胞 (1×10^5 cells/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり)は、DHMBA (0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ M)を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3図2(D)及び6図2(E)日間培養した。培養後、デッシュに付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対照(白あるいはグレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

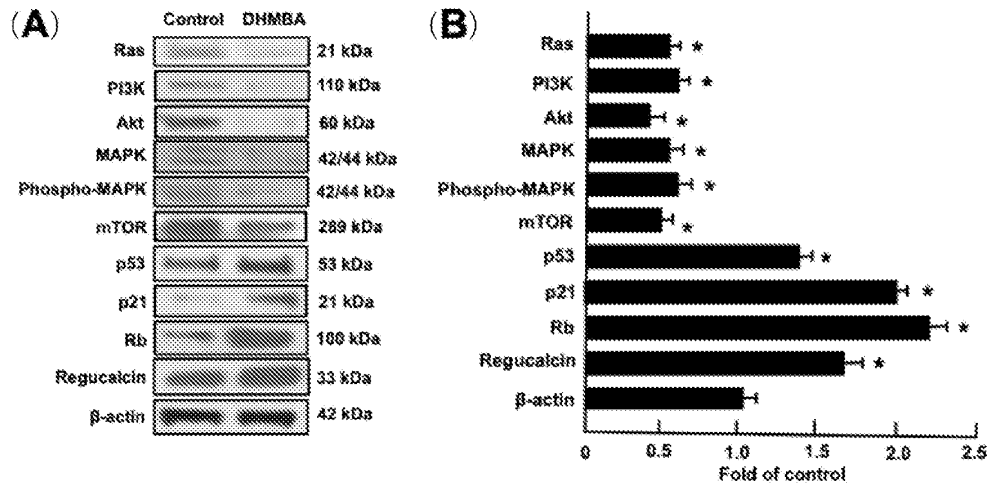
[図3]



3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)の細胞増殖阻害剤ならびに細胞内シグナル伝達阻害剤の存在下におけるヒト前立腺がんPC-3細胞の増殖に及ぼす抑制効果。

図3(A,B): PC-3細胞 (1x10⁵ cells/ml/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり) は、細胞サイクル阻害剤のroscovitine (10、100 nM), butyrate (10、100 μM), および sulforaphan (1、10 nM)を含有した DHMBA (10 μM) を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した。図3(C,D): PC-3細胞 (1x10⁵ cells/ml/24 ウェルのプレートの1ウェルあたり) は、wortmannin (10あるいは100 nM), PD98059 (1あるいは10 μM), 及び staurosporine (1あるいは10 nM)を含有したDHMBA (10 μM) を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した。培養後、デッシュに付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、異なった培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。**p*<0.001 対照(グレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

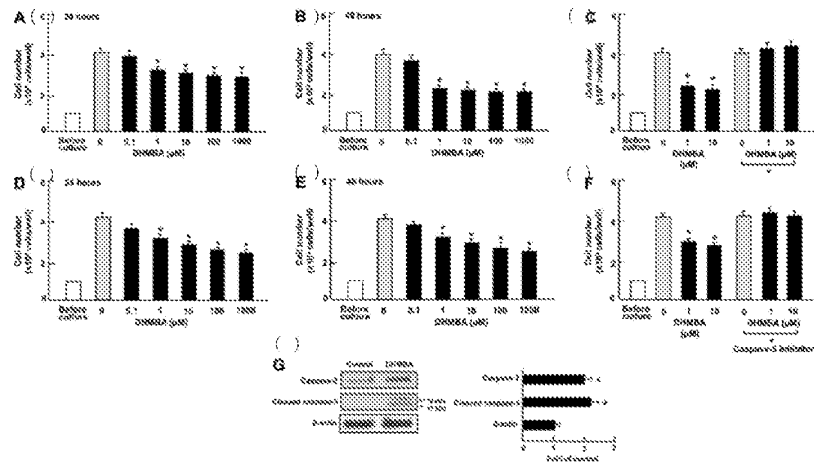
[図4]



前立腺がん細胞の細胞増殖の増進に与するたんぱく分子の発現レベルに及ぼすDHMBAの効果。

PC-3細胞 (1×10⁶ 細胞/10 ml, 100 mm デッシュ)は、10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有するDMEM培養液中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した。また、培養液にはDHMBA (10 μM)を含有させた。培養後、細胞はタンパク分解酵素及びプロテインホスファターゼ活性阻害剤を含む細胞溶解液cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を添加して調整した。タンパク試料液の40 μgを用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(12% SDS-PAGE) で分離し、その後、タンパク分子はナイロンメンブレンにトランスファーした。このメンブレインは、タンパク分子に特異的に結合する抗体を用いて、免疫プロットした。図4(A): 各々たんぱく分子のバンドは、異なった培養細胞の4デッシュから得られた代表的なものを示した。図4(B): 各々のバンドの濃さを測定した値の対照群と比較した%値の平均値と標準偏差で示した。*p<0.01 対照と比較して、1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

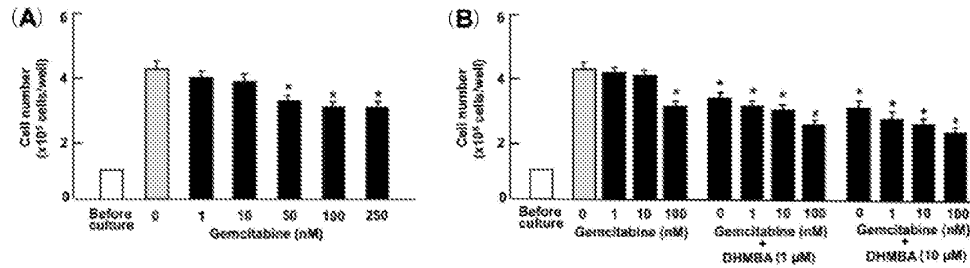
【図5】



3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)のヒト前立腺がんPC-3およびDU-145細胞死に及ぼす効果。

PC-3図5(A,B)およびDU-145図5(D,E)細胞(1×10⁵/24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液において)は、DMEM培養液中(10% FBS, 1% P/S および1% ファンギソン含有)で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養し、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、培養液をDHMBA(0.01, 0.1, 1, 10, 100, あるいは1000 μM)を含むものに交換し、24及び48時間培養した。培養後に、デッシュに付着している細胞を計数した。別の実験において、3日間培養後、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、PC-3図5(C)あるいはDU-145図5(F)細胞は、DHMBA(1あるいは10 μM)ならびにカスパーゼ-3阻害剤(10 μM)を含む培養液に交換して、48時間培養後、細胞計数した。さらに、3日間培養後、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、DHMBA(1あるいは10 μM)含有あるいは非含有のDMEM培養液に、gemcitabine(0.1, 1, 10, 50 or 100 nM)あるいはCH223191(1, 10, 及び25 μM)を加えた培養液に交換して、48時間培養し、細胞を計数した。培養後、デッシュに付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、異なる培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。**p*<0.001 対照(グレーバー)と比較して、1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test。図5(G): PC-3細胞(1×10⁵細胞/10 ml, 100 mm デッシュ)は、10% FBS, 1% P/S および1% ファンギソン含有するDMEM培養液中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した。また、培養液にDHMBA(10 μM)を含有させた。培養後、細胞はタンパク分解酵素及びプロテインホスファターゼ活性阻害剤を含む細胞溶解液cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)を添加して調整した。タンパク試料液の40 μgを用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(12% SDS-PAGE)で分離し、その後、タンパク分子は「ナイロンメンブレン」に転写した。このメンブレンは、タンパク分子に特異的に結合する抗体を用いて、免疫プロットした。図5(A): 各々のタンパク分子のバンドは、異なる培養細胞の4デッシュから得られた代表的なものを示した。図5(B): 各々のバンドの濃さを測定した値の対照群と比較した%値の平均値と標準偏差で示した。**p*<0.01 対照と比較して、1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test。

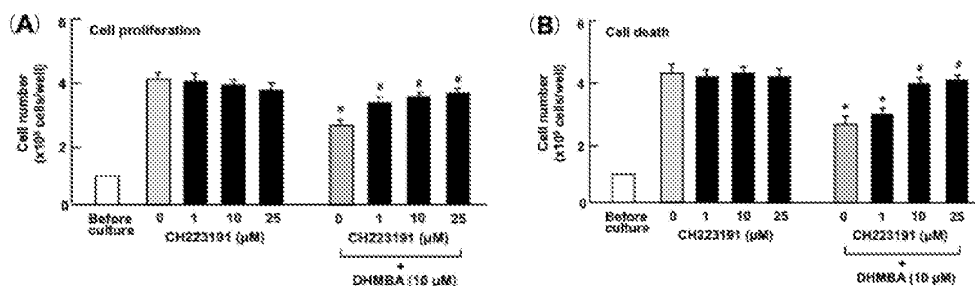
[図6]



3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)のヒト前立腺がんPC-3細胞死に及ぼす効果と抗がん剤gemcitabineとの比較。

図6(A): PC-3細胞 (3×10^4 /24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液において)、DMEM培養液中 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養し、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、培養液をgemcitabine (1, 10, 50, 100, あるいは 250 nM)を含むものに交換し、48時間培養した。培養後に、デッシュに付着している細胞を計数した。図6(B): 3日間培養後、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、DHMBA (1 あるいは 10 μM)ならびにgemcitabine (1, 10, 100 nM)を含む培養液に交換して、48時間培養後、細胞計数した。培養後、デッシュに付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対照(グレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

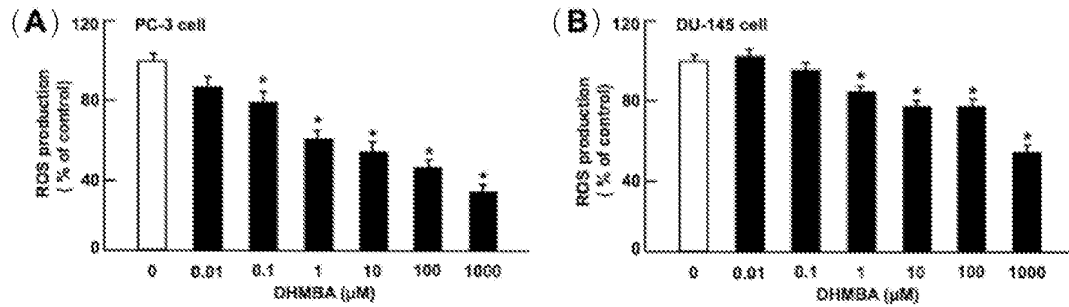
[図7]



DHMBAの前立腺がん細胞の増殖抑制並びに細胞死誘導作用におよぼすアрилヒドロカーボンレセプター阻害剤の効果

図7(A): PC-3細胞 (1x10⁵/24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液において)は、DMEM培養液中 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、DHMBA (10 μM) 及びアрилヒドロカーボンレセプター阻害剤 CH223191 (1, 10, あるいは 25 μM)の存在下で3日間培養し、細胞増殖に及ぼす作用を調べた。図7(B): PC-3細胞 (1x10⁵/24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液において)は、DMEM培養液中 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養し、細胞がサブコンフルエントに達した時点で、培養液をDHMBA (10 μM) 並びにCH223191 (1, 10, あるいは 25 μM)を含むものに交換し、48時間培養した。培養後、デッシュの底面に付着した細胞をはがし、計数した。各々のデータは、培養細胞の3ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。**p*<0.001 対照(CH223191 a及びDHMBA を含まないグレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

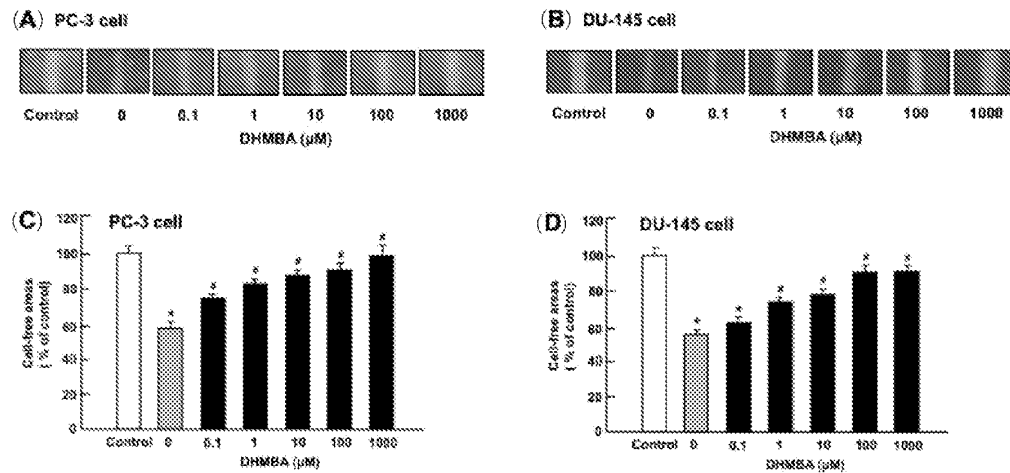
[図8]



前立腺がん細胞の活性酸素産生に対するDHMBAの抑制効果

PC-3 および DU-145 細胞 (2.5x10⁴/96穴プレートを使用して、1穴あたり0.1ml培養液)は、DHMBA (0.1, 1, 10, 100, あるいは 1000 μM) を含むDMEM培養液中 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギゾン含有) で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、24時間培養した。培養後、細胞は、PBS で洗浄後、25 μM H₂DCFDA溶液の0.1mlを添加して45分間インキュベートした。PBSで洗浄後、細胞は蛍光測定プレートリーダーを用いて、波長Ex/Em=485/535 nmにおいて、蛍光強度を測定した。結果は、DHMBAを添加しなかった対照群に対する蛍光強度の%として表示した。各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対照(白バー)と比較して、1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

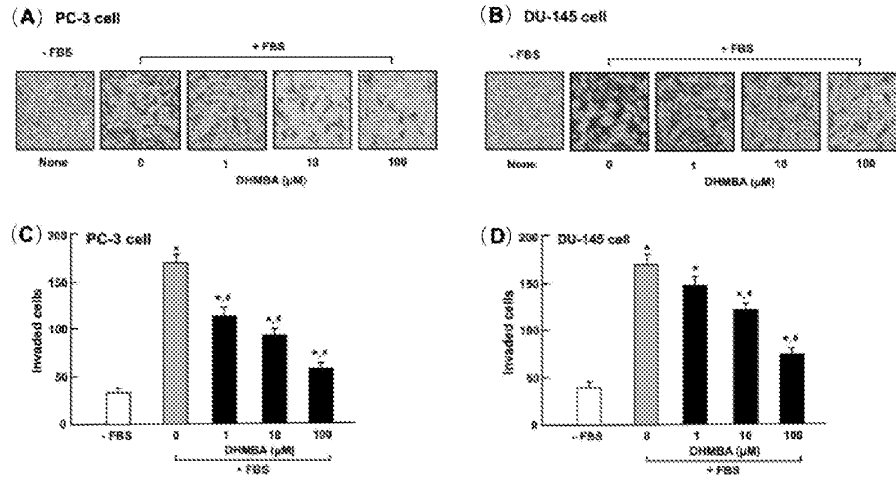
[図9]



前立腺がん細胞の移動性(migration)に及ぼすDHMBAの抑制効果

PC-3 およびDU-145 細胞 (2×10^5 細胞数/24穴プレートを使用して、1穴あたり 1 ml 培養液)は、DMEM培養液中10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、48時間培養し、細胞がコンフルエントに達した時点で、ピペットチップ (200 μ l) を用いて、直線のスクラッチを行なった。遊離の細胞をPBSで洗浄除去し、上記の培養液 (DHMBA 0.1, 1, 10, 100, あるいは 1000 μ Mを含有)を添加して、48時間培養した。培養後、細胞フリーの部分の間隔を測定した。図9(A,B): クリスタルバイオレット染色した細胞。図9(C,D):培養前のスクラッチを行なった時の間隔に対する培養後の間隔を比較し、対照 (DHMBAを含まない時の値) に対する%として表示した。各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対照(白バー)と比較して。# $p < 0.001$ 、DHMBAを含まない対照(グレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

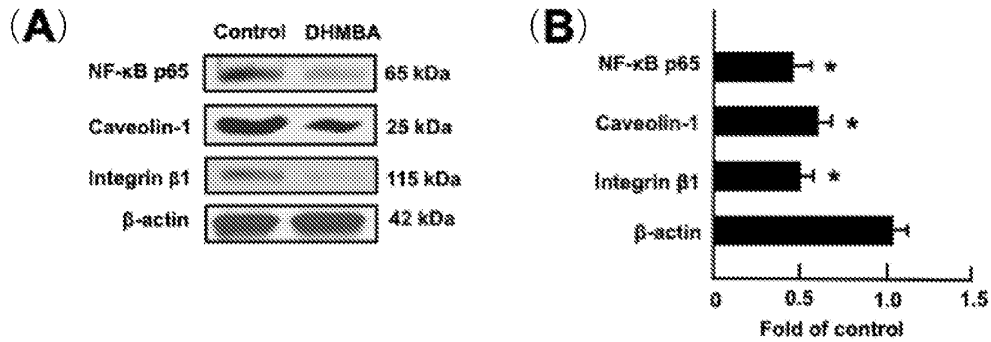
[図10]



前立腺がん細胞の浸潤性(invasion)に及ぼすDHMBAの抑制効果

前立腺がんPC-3及びDU-145細胞の細胞侵入活性はtranswell chamberを用いて測定した。PC-3あるいはDU-145細胞(2.5×10^4 細胞数/ml FBSを含まないDMEM)懸濁液500 μlを添加した。この細胞懸濁液にはDHMBA (0, 1, 10, あるいは100 μM)を含有した。チャンパーに細胞懸濁液を添加後、1時間インキュベートし、細胞をゲルの表面に付着させた。チャンパーの下面には、FBSを含有しない培養液と10% FBSを含有する培養液の0.75 mlを添加した。このプレートは、5% CO₂, 95% 空気下で、37 °C で24時間培養した。培養後、チャンパーの上面の培養液を除去し、フィルターを回収し、冷70% エタノール (1 ml)中に30分間置き、フィルターの下面にゲルを浸潤した細胞を固定した。その後、0.75 ml, 20% メタノールにクリスタルバイオレット0.5%を含む)液に30分間浸して染色した。染色後、PBSで洗浄し、乾燥した。乾燥後、染色された細胞数を顕微鏡(Olympus MTV-3; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)で計数した。また、染色された細胞の映像は写真撮影された。図10(A,B):代表的な画像を示した。図10(C,D):各々のデータは、培養細胞の8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した。* $p < 0.001$ FBS を含まない対照(白バー)と比較して。# $p < 0.001$, DHMBAを含まない対照(グレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[図11]



DHMBA の前立腺がん細胞の移動と浸潤性の増進に關与するたんぱく分子の発現レベルに及ぼす効果。

PC-3細胞 (1x10⁶ 細胞数/10 ml, 100 mm デッシュ)は、10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有するDMEM培養液中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した。また、培養液にはDHMBA (10 μM)を含有させた。培養後、細胞はタンパク分解酵素及びプロテインホスファターゼ活性阻害剤を含む細胞溶解液cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を添加して調整した。タンパク試料液の40 μgを用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(12% SDS-PAGE) で分離し、その後、タンパク分子は「ナイロンメンブレンにトランスファーした。このメンブレンは、タンパク分子に特異的に結合する抗体を用いて、免疫プロットした。図11(A): 各たんぱく分子のバンドは、異なった培養細胞の4デッシュから得られた代表的なものを示した。図11(B): 各々のバンドの濃さを測定した値の対照群と比較した%値の平均値と標準偏差で示した。**p*<0.01 対照と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.