

明 細 書

発明の名称： 転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制剤に関するものである。

背景技術

[0002] ヒト前立腺がんは転移性がんであり、男性において、もっとも共通したがんであり、がんに関連した男性の死因の2位にランクされている。

特に、前立腺がんは優先的に骨に転移することが知られている。種々のがんにおいて、骨転移は共通の合併症であり、その発生率を比較すると、多発性骨髄腫では70-79%、前立腺がんは65-90%、乳がんでは65-75%、肺がんにおいては17-64%、大腸がんでは10%を示すことが知られている。このように、前立腺がんの骨転移性は極めて高いことがわかる。前立腺がんの骨転移は、激しい痛み、骨折、脊髄圧迫、骨髄抑制などの合併症を引き起こす。局所の前立腺がんの5年間の生存率は100%であるが、転移性前立腺がんはわずかに30%の生存率を示す。そのために、より効果的な治療抑制剤が必要とされている。現在の治療法には、外科的切除、化学療法、ホルモン去勢、免疫療法、および放射性同位元素療法などがあるが、これらの治療抑制剤では不十分であり、そのために、より効果的な治療抑制剤の開発が期待されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2017-132753公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 新規のフェノール性のアンチオキシダントである3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (本明細書の中でDHMBAと称する)は、海洋性カキから、単離

された新規の化合物である。DHMBAは、細胞内の酸化ストレスの抑制に調節に役割を果たしていることが知られている。しかし、転移性ヒト前立腺がん細胞への作用は全く知られていない。

[0005] それゆえに、本発明者らは、転移性ヒト前立腺がん細胞（PC-3 ならびにDU-145）に及ぼすDHMBAの作用 について調べた。その結果、DHMBAは前立腺がん細胞の増殖を抑制するとともに、その細胞死をも増進して、がん細胞の増殖制御作用を発揮するとともに、さらにはがん細胞の転移活性をも抑制することが発明された。このように、DHMBAは、ヒト前立腺がんの治療に有用な薬物手段になりえるものと考えられる。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は、
3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制作用を有する、
ことを特徴とし、
または、
3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞死誘導作用を有する、
ことを特徴とし、
または、
3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の移動と浸潤作用の抑制作用を有する、
ことを特徴とするものである。

発明の効果

[0007] ヒト前立腺がんは転移性がんであり、がんに関連した男性の死因の上位にランクされている。そのために、より効果的な治療抑制剤のさらなる開発が必要とされている。本発明において、海洋カキから同定された新規の3,5-dih

ydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を含め、合成された3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)がヒト前立腺がん細胞 (PC-3 ならびにDU-145) に及ぼす効果について調べた。

[0008] DHMBA (1および10 μ M) を含有する培養液にて培養したがん細胞のコロニー形成と細胞増殖を優位に抑制することが見だされた。

この作用は、細胞内情報伝達に關与するシグナリング因子の阻害剤の存在下では有意な抑制効果を示さなかった。

[0009] これは、DHMBAが細胞内シグナリング系に作用していることを示唆した。さらにこのメカニズムとして、細胞増殖を増進する情報伝達系に關与する分子のRas, PI3K, Akt, MAPK, およびmTORの発現レベルを調べると、それらは低下された。

興味あることに、がん細胞抑制遺伝子たんぱくのp53, p21, Rb, レギュラチンの発現レベルは増加した。

一方、DHMBAは、細胞死を促進した。アンチオキシダントであるDHMBAはがん細胞内の活性酸素の産生を抑制した。DHMBAのがん細胞増殖抑制作用は、aryl hydrocarbon receptorを介する遺伝子発現に關係することが示唆された。

さらに、がん細胞の転移に關与するたんぱく因子のNF- κ B, caveolin-1, integrin β 1の発現レベルは低下された。

[0010] このように、新規天然化合物DHMBAは、前立腺がん細胞の増殖を抑制するとともにその細胞死をも増進して、がん細胞の増殖制御作用を発揮し、さらにはがん細胞の転移活性をも抑制することが確認された。

このように、DHMBAは、ヒト前立腺がんの治療に有用な手段になりえるものと考えられる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol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である。

[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を説明する説明図である。

[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を説明する説明図である。

[図4]前立腺がん細胞の細胞増殖の増進に関与するたんぱく分子の発現レベルに及ぼすDHMBAの効果を説明する説明図である。

[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を説明する説明図である。

[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gemcitabinとの比較を説明する説明図である。

[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リルハイドロカーボンレセプター阻害剤の効果を説明する説明図である。

[図8]前立腺がん細胞の活性酸素産生に対するDHMBAの抑制効果を説明する説明図である。

[図9]前立腺がん細胞の移動性(migration)に及ぼすDHMBAの抑制効果を説明する説明図である。

[図10]前立腺がん細胞の浸潤性(invasion)に及ぼすDHMBAの抑制効果を説明する説明図である。

[図11]DHMBA の前立腺がん細胞の移動と浸潤性の増進に関与するたんぱく分子の発現レベルに及ぼす効果を説明する説明図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明において、3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)が転移性ヒト前立腺がんの抑制剤などの有効成分となりうるか否かにつき実験を行った。

[0013] (実験材料と方法)

(試薬)

ダルベッコ変法イーグル培養液 (4.5 g/グルコース, L-グルタミン・ピルビン酸、抗生物質 (100 units/mL penicillin、 100 μ g/mL streptomycin; 1% P/S)含有の培養液は、Corning (Mediatech, Inc. Manassas, VA, USA)から得られた。牛血清 (Fetal bovine serum;FBS)は Hyclone (Logan, UT, USA)から購入した。Amphotericin B (fungizone), カスパーゼ-3 阻害剤 (CAS 169332-60-9-Calbiochem), gemcitabine, 2-Methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH223191) はSelleckchem Com. (Houston, TX, USA)から、購入した。他のすべての試薬類はSigma-Aldrich (USA)から購入した。カスパーゼ-3 阻害剤はリン酸緩衝液 (PBS)に溶解し、 また、CH223191 はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した。 DHMBA 並びに他の試薬は100% エタノールに溶解し、実験に使用するまで-20℃ において保冷保存した。

[0014] (3, 5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA))

3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA) は、100%純度の合成品を使用した。実験には100%エタノールに溶解して使用した。使用するまで、-20℃ において保冷保存した。なお、カキ肉から抽出したカキ肉エキスに3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)が多く含有されていることは本発明者らが取得した特許から証明されており、かかる3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を使用しても同様の結果がもたらされると確信する。

[0015] (ヒト前立腺がん細胞)

転移性のヒト前立腺がん細胞 PC-3, DU-145 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC CRL-1435™, ATCC; Rockville, MD, USA) から購入した。PC-3細胞は、62歳の成人男性のアデノカルシノーマで骨転移したがんから単離されたものである。また、DU-145 細胞は、69歳の成人男性のアデノカルシノーマで、脳に転移したがんから単離されたものである。これらのがん細胞は、ダルベッコ変法イーグル培養液 (4.5 g/グルコース, L-グルタミン・ピルビン酸、抗生物質 (100 units/mL ペニシリン、 100 μ g/mL ストレ

プトマイシン; 1% P/S、1% fungizone含有) 中で培養した。

[0016] (コロニー形成)

PC-3 およびDU-145 細胞 (1×10^3 /6穴プレートを使用して、1穴あたり2 ml 培養液において)は、DHMBA (1および10 μ M) を含む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、9日間培養した。培養後、培養液を除去し、細胞はPBSで2回洗浄し、95%メタノール (0.5 ml) を添加して20分間固定した。固定後、培養デッシュの各ウェルはPBS (1 ml) で4回洗浄後、0.5%クリスタルバイオレット (0.5 ml) を添加して2時間室温にて放置して染色した。染色液を洗浄除去し、乾燥後、細胞が50個の以上を含むコロニーをOlympus MTV-3; Olympus Corporation, Tokyo, Japan)の顕微鏡にて計数した。

[0017] (細胞増殖)

PC-3 およびDU-145 細胞 (1×10^5 細胞数/24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液中において)は、DHMBA (1および10 μ M) を含む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、1、2、3、4及び6日間培養した。別の実験において、PC-3 細胞 (1×10^5 細胞数/ml per well) は、DMEM培養液中 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) で、DHMBA (10 μ M)、細胞増殖サイクル阻害剤のroscovitine (10 あるいは 100 nM), butyrate (10 あるいは100 μ M)、および sulforaphane (1 あるいは 10 nM), また、細胞内シグナル伝達阻害剤のwortmannin (10 あるいは 100 nM), PD98059 (1 あるいは10 μ M) ならびにstaurosporin (1 あるいは 10 nM), さらに、aryl hydrocarbon receptor (AHR) 阻害剤CH223191 (1, 10, あるいは 25 μ M)の存在下で、3日間培養した。培養後、培養デッシュの底面に付着している細胞をCa²⁺/Mg²⁺-含有しないPBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に溶解した 0.05%トリプシン-EDTA溶液0.1mlを添加し、37°Cで2分間インキュベーションして付着している細胞を遊離させ、10% FBS および1% P/SをふくむDMEM培養液0.9mlを添加して反応を停止した。この細胞懸濁液中の細胞数を“細胞数測定”の項目に記し

た方法で計数した。

[0018] (細胞死)

PC-3 および DU-145 細胞 (1×10^5 /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 μ M)を含むものに交換し、24及び48時間培養した。培養後に、デッシュの底面に付着している細胞をはがし、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、DHMBA (1 あるいは10 μ M)ならびにカスパーゼー3阻害剤(10 μ M)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 μ M)含有あるいは非含有のDMEM培養液に、gemcitabine (0.1, 1, 10, 50 あるいは100 nM) あるいは CH223191 (1, 10, 及び 25 μ M)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。

[0019] (細胞計数)

細胞培養後、培養デッシュの底面に付着している細胞をCa²⁺/Mg²⁺-含有しないPBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に溶解した0.05%トリプシン-EDTA溶液0.1mlを添加し、37°Cで2分間インキュベーションして付着している細胞を遊離させ、10% FBS および1% P/SをふくむDMEM培養液0.9mlを添加して反応を停止した。可視的な細胞は、Olympus MTV-3の顕微鏡にて、Hemocytometer (Sigma-Aldrich)を用いて、細胞計数した。

[0020] (細胞内活性酸素の測定)

細胞内活性酸素 (ROS) は、pro-fluorescent 基質のH₂DCFDAを用いたROS測定キット(MAK144-1 Kit, Sigma-Aldrich)を用いて測定した。PC-3 および DU-145 細胞 (2.5x10⁴細胞数/ウェルあたり、96穴プレートを使用して、1穴あたり0.1ml培養液中)は、DHMBA (0.1, 1, 10, 100, あるいは 1000 μ M)を含む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℃において、24時間培養した。培養後、細胞は、PBS で洗浄後、25 μ M H₂DCFDA溶液の0.1mlを添加して45分間インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、細胞中に産生した活性酸素量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象群に対する蛍光強度の%として表示した。

[0021] (細胞移動性(migration)の測定)

前立腺がんPC-3及びDU-145細胞の移動性は、スクラッチアッセイを用いて調べた。PC-3 およびDU-145 細胞 (2x10⁵細胞数/24穴プレートを使用して、1穴あたり1 ml 培養液中)は、10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソンを含有したDMEM培養液中で、5% CO₂ 下で、37℃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。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。

[0022] (細胞侵入活性 (invasion) の測定)

前立腺がんPC-3及びDU-145細胞の細胞侵入活性は、transwell chambers (Corning, Life Sciencesのカタログナンバー CLS3464-48EA, USA)を用いて測定した。24穴のプレートの各ウェルにチャンバーを置いた。チャンバーの上面にはマトリゲル (Corning Life Sciences, Cat. No 356230, U S A)の50 μ lを添加した。ゲルの乾燥後に、ゲルの上面にPC-3 あるいはDU-145細胞(2.5 x10⁴ 細胞数/mlの FBSを含まないDMEM)懸濁液500 μ lを添加した。この細胞懸濁液にはDHMBA (0, 1, 10, あるいは 100 μ M)を含有した。チャンバーに細胞懸濁液を添加後、1時間インキュベートし、細胞を付着させた。チャンバーの下面には、F B Sを含有しない培養液と10% F B S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、チャンバ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、ゲルを浸潤したフィルターの下面に存在する細胞を固定した。その後、0.75 ml, 20% メタノールに溶解したクリスタルバイオレットの0.5%を含む)液に30分間浸して染色した。染色後、PB S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顕微鏡写真撮影された。

[0023] (ウエスタンブロット)

PC-3細胞 (1x10⁶ 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DHMB (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。細胞溶解液は、17,000xgで4°C、10 分間遠心分離して、その上清液を回収した。上清液中のタンパク質量は、Bio-Rad Protein Assay Dye (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)を用いて、アルブミンを標準タンパクとして、測定した。タンパクサンプルは、使用するまで、-80°Cの冷凍庫に保存した。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) に添加し、分離した。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、免疫ブロットした。Ras (cat. no. 3339, rabbit), Akt (cat. no. 9272, rabbit), mitogen-activated protein kinase (MAPK; cat. no. 4695, rabbit), phosphorylated-MAPK (cat. no. 4370, rabbit), mechanistic target of rapamycin (mTOR, cat. no. 4517, mouse), Rb (cat. no. 9309, mouse), p21 (cat. no. 2947, rabbit), caveolin-1 (cat. no. 3267, rabbit), および β-actin (cat. no. 3700, mouse) などの抗体はCell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)から購入した。また、p53 (cat. no. sc-126, mouse), NF-κB p65 (cat. no. sc-109, rabbit) および integrin β1 (cat. no. sc-13590,

mouse) は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)から入手した。さらに、Rabbit anti-regucalcin 抗体はSigma-Aldrich (cat. no. HPA029103, rabbit)から購入した。標的プロテインは、上記の1次抗体を用いて16時間低温でインキュベートした。その後、2次抗体のhorseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., mouse sc-2005 or rabbit sc-2305; diluted 1:1,000) を用いて60分間室温でインキュベートした。その後、プロテインのバンドはChemiluminescence substrate (cat. no. 34577, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) をもって発光させて、X 線フィルム上で、デヴェロッパーを使用して感光し、検出した。

[0024] (統計的处理)

データの統計処理は、GraphPad InStat version 3 for Windows XP (Graph Pad Software Inc. La Jolla, CA)を用いておこなった。データは、平均値±標準偏差で表示した。多重比較検定は、Tukey-Kramer 多重比較検定にて行った。危険率0.05%以下をもって有意差ありと判定した。

[0025] (実験結果)

(ヒト前立腺がん細胞の増殖に及ぼすDHMBAの効果)

まず、転移性のヒト前立腺がんのPC-3及び DU-145細胞のコロニー形成に及ぼす効果を調べた。

PC-3細胞及び DU-145細胞のコロニー形成は、DHMBA (1あるいは10 μM)の存在下で、9日間培養すると、有意に抑制された(図1、図2参照)。

さらに、細胞増殖に及ぼす効果を調べたところ、DHMBA (10 μM)の存在下で、1-6日間培養することにより、PC-3細胞及び DU-145細胞の増殖は抑制された。細胞増殖に及ぼすDHMBAの有意な効果は、0.01 μM の低濃度でも認められた(図1、図2参照)。

[0026] 次に、DHMBAの効果の作用機序を知るために、DHMBA存在下での各種阻害剤の共存による効果を調べた。

PC-3及び DU-145細胞を、細胞サイクル阻害剤のroscovitine (10 あるいは

100 nM), butyrate (10 あるいは 100 μ M), および sulforaphan (1 あるいは 10 nM)の存在下で3日間培養すると、細胞増殖は抑制された(図3 A)

。

DHMB A (10 μ M)の細胞増殖抑制効果は、これら阻害剤の存在下では観察されなかった(図3 B)。

この結果は、DHMB Aは、細胞増殖サイクルのG1ならびにG1/M 期に作用していることが示唆した。

[0027] さらに、DHMB A の前立腺がん細胞の細胞増殖抑制効果が、細胞内における増殖をうながすシグナリング過程への作用に基づくのかを、それらの阻害剤を用いて調べた。

wortmannin (10 あるいは 100 nM), PD98059 (1 あるいは 10 μ M), 及び staurosporine (1 あるいは 10 nM)の存在下で、前立腺がん細胞(PC-3)を3日間培養すると、細胞増殖は抑制された(図3 C)。これら阻害剤の存在下において、DHMB A (10 μ M)の有意な細胞増殖抑制効果は発現しなかった(図3 D)。これらの結果は、DHMB A の細胞増殖抑制作用の発現には、細胞増殖を促進するシグナル過程に作用していることを示唆した。

[0028] (DHMB Aの細胞増殖に関連したプロテインの発現レベルに及ぼす効果)

DHMB Aが前立腺がん細胞(PC-3)の増殖を抑制する作用の分子メカニズムを明らかにするために、細胞増殖の増進に関与するたんぱく分子の発現レベルの変動を、ウェスタンブロッティングで調べた(図4)。

PC-3 細胞は、DHMB A (10 μ M) の存在下で、3日間培養した。細胞増殖の増進に寄与する, Ras, PI3 kinase, Akt, MAP kinase, phospho-MAP kinase, 並びに mTORの発現レベルは有意に抑制された。興味あることに、細胞増殖を抑制する分子のp53, Rb, p21, および regucalcin (レギュカルチン) の発現レベルは有意に増加した。これらのプロテイン分子の変動が、DHMB Aの細胞増殖抑制効果の発現に寄与しているものと示唆された。

[0029] (DHMB Aの細胞死誘導に及ぼす効果)

さらに、DHMB Aの前立腺がん細胞の細胞死誘導作用について調べた。PC-3

およびDU-145細胞は、DHMBAの不在下で、3日間培養し、サブコンフルエントに達した状態で、DHMBAを含む培養液に交換して、24及び48時間培養後、デッシュの底面に付着している細胞数を計数して、細胞死誘導の作用を調べた（図5）。PC-3（図5A、5B）およびDU-145（図5D、5E）の細胞死は、DHMBA（1, 10, 100, あるいは1000 μ M）の存在下で培養すると有意に増加した。これらの増加は、カスパーゼ3阻害剤（10 μ M）の存在下では引き起こされなかった（図5C, 5F）。

[0030] DHMBA（10 μ M）の培養は、カスパーゼ3および活性化カスパーゼ3（cleaved caspase-3）のレベルを増加した（図5G）。これらの結果は、DHMBAがアポトーシス様細胞死を誘導していることを示唆した。

[0031] Gemcitabinは、多くのがん細胞死を誘発するがん治療薬として臨床使用されている。この作用は、細胞核のDNA合成を抑制する作用に基づいている。PC-3細胞をgemcitabin（1, 10, 50, 100 および 250 nM）の存在下で3日間培養すると、有意な細胞死が引き起こされた（図7A）。DHMBA（1 および 10 μ M）のPC-3細胞死誘導作用は、gemcitabine（1 あるいは 10 nM）の存在下では引き起こされなかった（図7B）。

[0032] 興味あることに、DHMBA（1 および 10 μ M）の細胞死誘導効果は、gemcitabine（100 nM）の共存下において、有意に高められることが見だされた（図7B）。これらの結果から、DHMBAは、gemcitabineの細胞死誘導作用の過程に部分的に関係していることが示唆された。

[0033] （DHMBAの細胞増殖の抑制効果ならびに細胞死誘導効果はアリルハイドロカーボンレセプターを介している）

アリルハイドロカーボンレセプター（aryl hydrocarbon receptor ; AHR）は、細胞質内でAHRと核移行たんぱく因子と結合して、核移行して遺伝子に結合し、薬物代謝酵素並びに他の多くの遺伝子発現をもたらす。DHMBAは、AHRに結合して、遺伝子発現作用をもたらすと推察された。このことを実証するために、AHRの特異的阻害剤のCH223191を用いて、DHMBA（10 μ M）の細胞増殖作用ならびに細胞死誘導作用が引き起こされるのかを調べた（図8）。

[0034] CH223191 (1, 10, あるいは 25 μ M)の存在下で、PC-3 細胞を3日間培養して、細胞増殖に及ぼす作用を調べたところ、有意な効果は発現されなかった(図8 A)。同様に、細胞を3日間培養して、サブコンフルエントの状態において、CH223191 (1, 10, あるいは 25 μ M)を添加して48時間培養した場合においても、細胞死誘導を引き起こさなかった(図8 B)。これらの結果は、実験に使用した濃度のCH223191 は、細胞に有害な効果をもたらさないことが示された。そこで、このCH223191 (1, 10, あるいは 25 μ M)の存在下で、DHMBA (10 μ M)の細胞増殖抑制効果ならびに細胞死誘導効果は、発現されないことが見出された。これらの知見から、DHMBA の作用の一部は、AHRを介しての遺伝子発現に関係していることが推察された。

[0035] (前立腺がん細胞の活性酸素産生に対するDHMBAの抑制効果)

DHMBAは、アンチオキシダントであることがよく知られている。そこで、前立腺がん細胞のPC-3およびDU-145 細胞の活性酸素の産生に及ぼす効果を調べた(図8)。

DHMBA (1, 10, 100, および 1000 μ M)の存在下で、細胞を24時間培養したときの細胞内活性酸素産生量を測定すると、有意な抑制が認められた。この結果は、DHMBAの前立腺細胞に及ぼす効果の一部は活性酸素産生低下に起因していることが推察された。

[0036] (DHMBAは前立腺がん細胞の移動と浸潤作用を抑制する)

ヒト前立腺がん細胞のPC-3 ならびにDU-145細胞は、転移性のがん細胞である。この転移性に及ぼす作用を、前立腺がん細胞の移動 (migration)と浸潤 (invasion) 性への効果を調べることにより、評価した。

DHMBA (1, 10, 100, あるいは 1000 μ M)の存在下で、PC-3細胞(図9 A、9 C)並びにDU-145細胞(図9 B、9 D)を培養すると、その移動性は有意に抑制された。さらに、PC-3 細胞(図10 A、10 C)並びにDU-145細胞(図10 B、10 D)の浸潤性も有意に抑制されることが見いだされた。さらに、前立腺がん細胞の移動と浸潤性の増進に関与するたんぱく分子の発現レベルを調べると、NF- κ B p65, caveolin-1, 並びにintegrin β 1の発現レ

ベルが有意に低下されることが見いだされた（図 1 1）。

[0037] （各図についての説明）

図 1 は、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について実験を行った説明図である。

図 1 (A) は、PC-3 細胞 (1×10^3 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 $10 \mu\text{M}$) を含む DMEM 培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン (fungizone) 含有) 中で、5% CO_2 下で、 37°C において、9 日間培養した図である。

図 1 (B) は、コロニー数を計数した図である。

図 1 (C) は、PC-3 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 ($10 \mu\text{M}$) を含む DMEM 培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) 中で、5% CO_2 下で、 37°C において、1-6 日間培養した図である。

[0038] 図 1 (D)、(E) は、PC-3 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 μM) を含む DMEM 培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) 中で、5% CO_2 下で、 37°C において、3 (D) 及び 6 (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図である。 $*p < 0.001$ 対照 (白あるいはグレーバー) と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0039] 図 2 は、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につき実験を行った説明図である。

(A) は、DU-145 細胞 (1×10^3 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 $10 \mu\text{M}$) を含む DMEM 培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) 中で、5% CO_2 下で、 37°C において、9 日間培養した図である。

(B) は、コロニー数を計数した図である。

(C) は、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% ファンギソン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、1-6日間培養した図である。

(D)、(E) は、DU-145細胞 (1x10⁵ 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% ファンギソン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3 (D) 及び 6(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図である。*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.

[0040] 図3は、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につき実験を行った説明図である。

(A)、(B) は、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 μ M), および sulforaphan (1、10 nM)を含有した DHMBA (10 μ M) を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した図である。

(C)、(D) は、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 μ M), 及び staurosporine (1 あるいは 10 nM)を含有したDHMBA (10 μ M) を含むDMEM培養液 (10% FBS, 1% P/S および 1% ファンギソン含有) 中で、5% CO₂ 下で、37°Cにおいて、3日間培養した図である。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.

[0041] 図4は、前立腺がん細胞の細胞増殖の増進に関与するたんぱく分子の発現レベルに及ぼすDHMBAの効果につき実験を行った説明図である。

PC-3細胞 (1×10^6 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 μ M)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 μ g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、免疫ブロットした。

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である。

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図である。* $p < 0.01$ 対照と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0042] 図5は、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について実験を行った説明図である。PC-3 (A、B図) および DU-145 (D、E図) 細胞 (1×10^5 /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 μ M)を含むものに交換し、24及び48時間培養した図である。培養後に、デッシュに付着している細胞を計数した図である。

[0043] 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 (C図) あるいはDU-145 (F図) 細胞は、DHMBA (1 あるいは10 μ M)ならびにカスパーゼ-3阻害剤(10 μ M) 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 μ M)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 CH223 191 (1, 10, 及び 25 μ M)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.

[0044] G図では、PC-3細胞 (1×10^6 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DHMB (10 μ M)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 μ g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、免疫ブロットした。

各々タンパク分子のバンドは、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である。

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図である。 $*p<0.01$ 対照と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0045] 図6は、3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMB)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との比較した実験を説明する説明図である。

PC-3細胞 (1×10^5 /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

を計数した図である。

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図である。 $*p<0.001$ 対照(グレーバー)と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0046] 図7は、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よぼすアリルハイドロカーボンレセプター阻害剤の効果につき実験を行った説明図である。

PC-3細胞 (1×10^5 /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、DHMBA (10 μM) 及び アリルハイ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。図である

PC-3細胞 (1×10^5 /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 (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8ウェルから得られた値の平均値と標準偏差で示した図である。 $*p<0.001$ 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.

[0047] 図8は、前立腺がん細胞の活性酸素産生に対するDHMBAの抑制効果につき実験を行った説明図である。

PC-3 および DU-145 細胞 (2.5×10^4 /96穴プレートを使用して、1穴あたり0.1 ml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% ファンギソン含有）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 μ M H₂D CFDA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図である。* $p < 0.001$ 対照（白バー）と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0048] 図9は、前立腺がん細胞の移動性(migration)に及ぼすDHMBAの抑制効果につき実験を行った説明図である。

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1ml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。

（A）、（B）クリスタルバイオレット染色した細胞の図である。

（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図である。* $p < 0.001$ 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.

[0049] 図10は、前立腺がん細胞の浸潤性(invasion)に及ぼすDHMBAの抑制効果につき実験を行った説明図である。

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DM

EM)懸濁液500 μ lを添加した。この細胞懸濁液にはDHMBA (0, 1, 10, あるいは 100 μ M)を含有した。チャンバ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。チャンバーの下面には、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、チャンバ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。

(A)、(B) 代表的な画像を示した図である。

(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図である。 $*p<0.001$ 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.

[0050] 図11は、DHMBA の前立腺がん細胞の移動と浸潤性の増進に与関するたんぱく分子の発現レベルに及ぼす効果につき実験を行った説明図である。

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 μ M)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 μ g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、免疫ブロットした。

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である。

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図である。 $*p<0.01$ 対照と比較して。1-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test.

[0051] (考察)

前立腺がんは、転移性がんであり、男性において、がんに関連した死因の第2にランクされている。そのために、転移性前立腺がんのより効果的な治療法の更なる開発が必要とされている。

DHMBは、創始的に、海洋性カキから、単離同定されたフェノール性のアントキシダントである。

[0052] 本発明においては、DHMBが転移性ヒト前立腺がん細胞のPC-3 ならびにDU-145細胞に対して抑制効果を発現するののかについて実験を行った。

その結果、DHMBは、がん細胞のコロニー形成、細胞増殖、活性酸素産生、細胞の転移に関連した細胞移動性ならびに浸潤性を抑制し、さらにはがん細胞死を誘導する作用をも発揮することが見だされた。このように、本発明は、転移性前立腺がんの治療における新たな方法を提供している。

[0053] DHMBの前立腺がん細胞の増殖抑制効果は、細胞サイクル阻害剤のoscovitine, butyrate, あるいは sulforaphaneの存在下で培養すると、発現されなかった。Butyrate は、細胞サイクルのG1後期におけるcdc2 mRNAの蓄積を抑制し、G1期の初期と後期の増進を阻害する。Roscovitine は、cyclin-依存性 kinases cdc2, cdk2 及び cdk5の選択的な強い阻害剤である。Sulforaphane は、チェックポイントキナーゼに媒介された細胞サイクルのリン酸化に関連したG2/M期の細胞分裂サイクルの抑制をもたらす。

[0054] このことから、DHMBは、G1 及びG2 M期の細胞増殖サイクルの阻害を引き起こしているものと考えられる。さらに、DHMBのPC-3細胞の増殖抑制効果は、PC-3細胞増殖抑制を引き起こしたPI3K阻害剤のwortmannin, MAPK阻害剤のPD98059, プロテインキナーゼC阻害剤のstaurosporineの存在下では認められなかった。

[0055] DHMBAの細胞増殖抑制効果は、細胞増殖を促す細胞内シグナリング過程にも作用して、引き起こされているものと推察された。そこで、細胞増殖に関与しているRas, Akt, MAPK, phospho-MAPK, 及びmTORの発現レベルを調べると、これらの因子は低下していることが見だされた。さらに、細胞増殖抑制に関与するがん抑制遺伝子であるp53, p21, Rb, および regucalcinの発現レベルは増加することが明らかになった。

このように、DHMBAのがん細胞増殖抑制効果は、広範な細胞シグナリング過程に作用して、発揮されているもの推察された。

[0056] さらに、DHMBAは、前立腺がんPC-3, DU-145 細胞の死を誘導することが明らかになった。この知見は、DHMBAの細胞増殖抑制効果の発揮において、細胞死誘導効果が部分的に寄与しているものと推察された。DHMBA の細胞死誘導作用は、細胞核DNA の分解に関与するカスパーゼ3の発現レベルの低下が関係しているものと推察された。興味あることに、がん治療に臨床使用されているgemcitabineの存在下で、DHMBAを併用すると有意な細胞死誘導効果が増大された。本知見から、Medical food factor のDHMBA と抗がん剤gemcitabineの併用が効果的ながん治療に有用と考えられた。

[0057] DHMBAの細胞増殖抑制効果と細胞死誘導作用は、アリルハイドロカーボンレセプター (aryl hydrocarbon receptor ; AHR)の特異的阻害剤CH223191の共存下で、発現されなかった。AHRは、AHR結合核移行たんぱくに結合して、核移行し、DNAに結合して、多種の遺伝子たんぱくの誘導を引き起こす。その中には薬物代謝に関与する酵素たんぱくが存在する。AHRは、polychlorinated hydrocarbon, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) に強く結合することの研究から、創始的に発見された。TCDDは、大腸がん細胞や肝臓がん細胞の増殖抑制効果を発揮することが知られている。なお、生体内化合物や栄養性イソフラボンなどとも結合する。DHMBA の前立腺がん細胞の増殖抑制作用並びに細胞死誘導効果は、部分的には、AHRへの結合を介して、遺伝子発現に作用して、発揮されているものと推察された。

[0058] DHMBA は、アンチオキシダントとして知られている。DHMBA は、前立腺が

ん細胞のPC-3 ならびにDU-145 細胞の活性酸素産生を抑制することが見だされた。この知見から、DHMBAの前立腺がん細胞の増殖抑制ならびに細胞死誘導作用の発現に部分的に寄与しているものと推察された。

[0059] さらに、DHMBAは、転移性前立腺がん細胞PC-3 ならびにDU-145細胞の移動性と浸潤性を抑制することが、明らかになった。DHMBAは、がん細胞の転移に関与する分子の NF- κ B p65, caveolin-1 及び integrin β 1の発現レベルを低下した。これらの知見から、DHMBA は、前立腺がん細胞の転移活性を抑制するものと考察された。

[0060] (結論)

本発明において、海洋性新規化合物のDHMBAが、転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制、細胞死誘導ならびにがん細胞の転移活性の抑制などの作用を発揮するとの新規の知見が解明された。

[0061] 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA) は、medical food factorであり、生体毒性は極めて低い。DHMBAを有効成分とし、転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制作用を有する転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制剤、あるいは3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とし、転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞死誘導作用を有する転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞死誘導剤、あるいは3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とし、転移性ヒト前立腺がん細胞の移動と浸潤作用の抑制作用を有する転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞の移動と浸潤作用の抑制剤は、転移性前立腺がん細胞の新規治療薬としての有用であるものと断言できるものである。

請求の範囲

- [請求項1] 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制作用を有する、
ことを特徴とする転移性ヒト前立腺がん細胞の増殖抑制剤。
- [請求項2] 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞死誘導作用を有する、
ことを特徴とする転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞死誘導剤。
- [請求項3] 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol (DHMBA)を有効成分とした転移性ヒト前立腺がん細胞の移動と浸潤作用の抑制作用を有する、
ことを特徴とする転移性ヒト前立腺がん細胞の細胞の移動と浸潤作用の抑制剤。