

博士論文

**Ginnalin B および アゾベンゼン誘導体の  
生物活性に関する研究**

医学薬学教育部 博士課程 薬学専攻  
臨床薬剤学研究室（附属病院薬剤部）  
新澤 健太

## 目次

緒言	1
第1章 ヒト表皮細胞およびヒト三次元皮膚モデルを用いた ginnalin B の 生物活性評価	
1. 序論	2
2. 結果	4
2-1. 形態学的評価	4
2-2. 分化マーカーの遺伝子発現評価	5
1) Ginnalin B が <i>keratin 10</i> および <i>filaggrin</i> に与える作用と評価時間 の検討	5
2) 各分化マーカーの発現に与える作用の濃度依存性の検討	7
3) Ginnalin B と類似した構造を有する化合物を用いた検討	9
2-3. ヒト皮膚三次元モデルを用いた分化マーカーの発現評価	12
2-4. 増殖および生存に与える作用の評価	14
1) Ginnalin B が細胞増殖に与える作用の検討	14
2) Ginnalin B の細胞傷害性に関する検討	17
2-5. ヒト表皮細胞に与える作用機序の評価	20
1) 細胞周期に与える作用の検討	20
2) p21, cyclin D1, cyclin E の発現に与える作用の検討	22
3) NOTCH1 の発現に与える作用の検討	24
3. 考察	26
4. 結論	28
5. 実験方法	29
5-1. 被験化合物	29
5-2. 細胞培養	29
5-3. 形態学的評価	29
5-4. Real time RT-PCR による遺伝子発現の評価	29
5-5. ヒト皮膚三次元培養モデルを用いた評価	31
5-6. 細胞生存率および細胞増殖の評価	31

5-7.	細胞傷害性の評価 .....	32
5-8.	Hoechst 33342 を用いた細胞核の形態評価 .....	33
5-9.	フローサイトメトリーによる細胞周期の評価 .....	33
5-10.	gel-free Simple Western <sup>TM</sup> system によるタンパク質発現の評価 .....	33

## 第2章 栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対するアゾベンゼン誘導体の生物 活性評価

1.	序論 .....	35
2.	結果 .....	40
2-1.	栄養飢餓条件における抗がん活性の評価 .....	40
2-2.	富栄養条件における細胞毒性の評価 .....	43
1)	膵臓がん細胞株 PANC-1 を用いた検討 .....	43
2)	正常細胞株 GM05659 を用いた検討 .....	45
2-3.	細胞周期に与える作用およびその栄養飢餓選択性の評価 .....	48
1)	栄養飢餓条件における作用の検討 .....	48
2)	富栄養条件における作用の検討 .....	50
2-4.	血清またはグルコース添加条件における活性の評価 .....	53
3.	考察 .....	55
4.	結論 .....	57
5.	実験方法 .....	58
5-1.	被験化合物 .....	58
5-2.	細胞培養 .....	58
5-3.	栄養飢餓培地 .....	59
5-4.	細胞生存率の評価 .....	59
5-5.	フローサイトメトリーによる細胞周期の評価 .....	60
	結言 .....	61
	謝辞 .....	62
	参考文献 .....	63

## 緒言

生物活性を示す小分子に関する検討を行い、医薬品などへの応用を目指す研究が近年数多く行われている。本研究では、ヒト表皮または膵臓がんを標的とし、化粧品や医薬品などへの応用性を視野に入れて生物活性の検討を行った。第1章では、ヒト表皮の恒常性維持において重要となる分化に着目し、先行検討で見出した ginnalin B (6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol) を用いた生物活性の評価を行い、皮膚に対する有益性について検討した。また第2章では、難治性である膵臓がんを標的として設定し、アゾベンゼン誘導体が栄養飢餓条件下のヒト膵臓がんに対して示す生物活性を評価することで、新規抗悪性腫瘍薬としての応用可能性を検討した。以下、これらの検討の詳細について述べる。



## 第1章

### ヒト表皮細胞およびヒト三次元皮膚モデルを用いた ginnalin B の生物活性評価

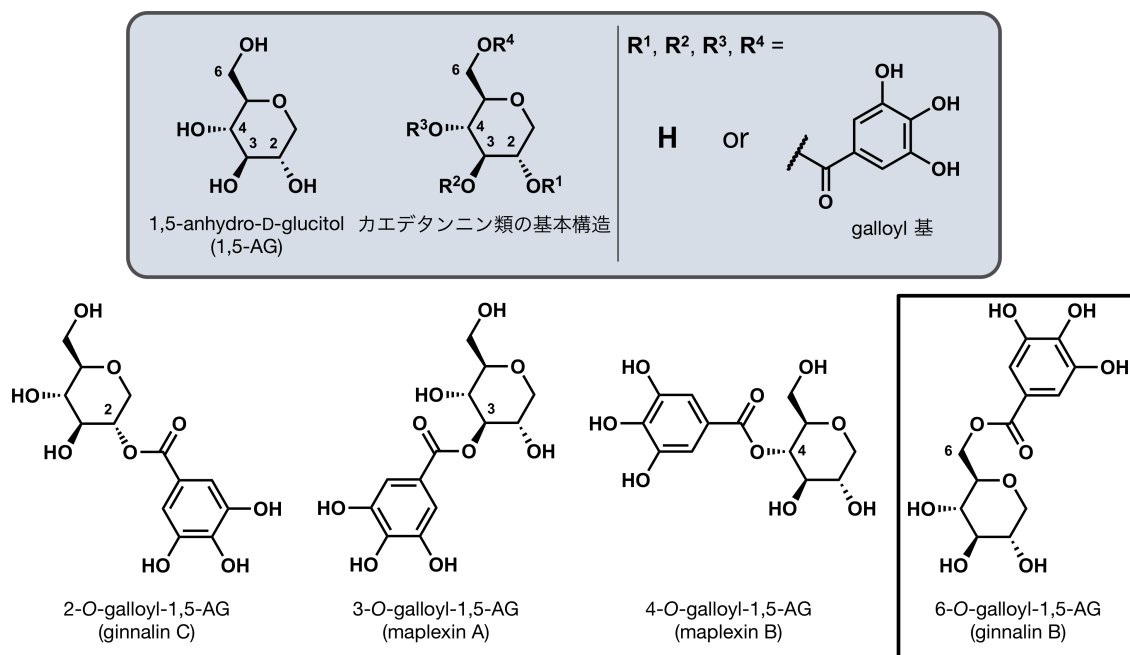
#### 1. 序論

皮膚は生体と外界とを隔てることで外界からの刺激に対してバリアとして働き、生体の維持において重要な役割を担う臓器である。皮膚は表皮、真皮、そして皮下組織に大別され、その中でも直接外界と接する表皮は、生体の維持に加えて、他者から直接見える部位を構成することから美容面においてもその健全な機能維持が必要となる<sup>[1]</sup>。表皮は外側から順に角質層、顆粒層、有棘層、そして基底層から構成され、最外層に該当する角質層では、脂質が水分を挟み込むラメラ構造が水分の保持やバリア機能の維持などを担っている<sup>[2,3]</sup>。これらの機能維持においては、角質層に存在する脂質が重要であると考えられており、特に細胞間脂質の約 50 %を占めるセラミドは、皮膚機能の維持に重要とされている<sup>[4]</sup>。しかし、角質層のセラミド量は加齢に伴って減少することが報告されており<sup>[5]</sup>、表皮の機能維持に支障をきたす。また、皮膚セラミド量の減少はアトピー性皮膚炎や乾皮症など疾患の原因となることも報告されており<sup>[6]</sup>、セラミド量の維持は、生体機能の維持、美容的問題点の改善、さらには皮膚疾患の予防など、幅広く重要である。

こうした点を踏まえ、当研究室での先行研究として、多くの弊害をもたらすセラミド量の減少に対して皮膚におけるセラミドの分解抑制および合成促進をもたらす化合物の探索を、保有する 237 種類の植物エキスをを用いて実施した。セラミド分解酵素に対する阻害活性を評価した結果、複数のカエデ科植物エキスを良好な阻害活性が見出された。また、カエデ科植物エキス中のカエデタンニン類と呼ばれる化合物群が阻害活性に寄与していることを同定した。カエデタンニン類は、単糖の中でも「天然での存在量が少ない単糖およびその誘導体」と定義される希少糖<sup>[7]</sup>のひとつである 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG) を基本骨格に有する化合物群である (Figure 1) <sup>[8]</sup>。カエデタンニン類はこれまでに糖分解酵素である  $\alpha$ -glucosidase に対する阻害作用や抗酸化作用などの生物活性に関して報告がされている<sup>[9-12]</sup>。我々の検討において、カエデタンニン類の中でも 6-O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (ginnalin B) はセラミド分解酵素の阻害に加え

て、セラミド合成酵素の発現促進活性を併せ持つことが先行研究により明らかとなった<sup>[13]</sup>。

これらの検討の際、ginnalin B はセラミド関連酵素群に対する作用の他に、ヒト表皮角化細胞（ケラチノサイト）に敷石上の形態変化を生じさせる作用が見出された。ケラチノサイトは分化すると形態が変化することが知られていること<sup>[14]</sup>を踏まえ、ginnalin B は皮膚におけるセラミド量増加作用に加えて、表皮における分化に対して何らかの促進的な影響を与えているのではないかという仮説を立てた。そこで、本研究ではこれらの仮説に基づき、ginnalin B がヒト表皮の分化および分化と関連のある細胞増殖に対して示す作用について、ヒト表皮細胞株およびヒト三次元皮膚モデルを用いた分化マーカーの遺伝子およびタンパク質発現、そして細胞増殖に与える影響を評価した。さらに、分化および増殖に与える作用の機序を明らかにするために、細胞周期についても評価を行い、関連する因子群に対して ginnalin B が与える影響についても検討を行った。これらの検討によって、ginnalin B がヒト表皮細胞の分化と増殖において示す生物活性を明らかにすることに成功した。以下、その詳細について述べる。



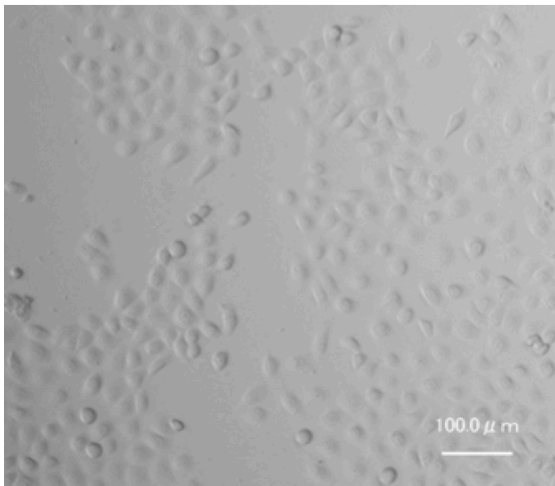
**Figure 1.** Ginnalin B および関連するカエデタンニン類の構造

## 2. 結果

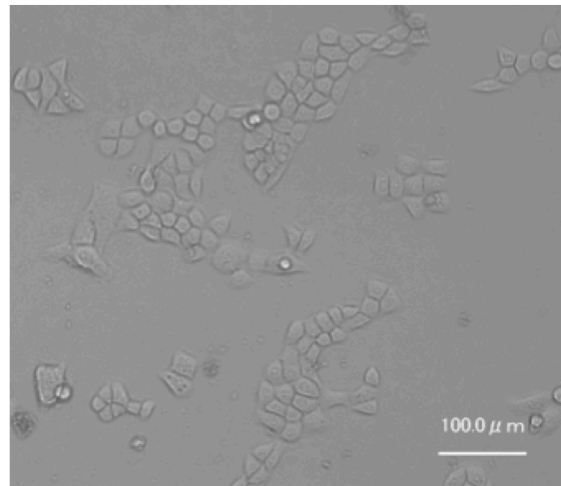
### 2-1. 形態学的評価

本研究では、ヒトケラチノサイトである PHK 16-0b<sup>[15]</sup>を検討に用いた。PHK 16-0b に対して ginnalin B が与える影響を、72 時間の処置後に画像を取得することで形態学的に評価した。PHK 16-0b を 100  $\mu$ M の ginnalin B で 72 時間処置したところ、対照群と比較して細胞辺縁の明確化などの形態変化が認められた (Figure 2)。

A) コントロール



B) Ginnalin B 100  $\mu$ M



**Figure 2.** Ginnalin B がケラチノサイトの形態に与える影響

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (100  $\mu$ M) を 72 時間処置し、顕微鏡を用いて形態を評価した。スケールバーは 100  $\mu$ m を示す。

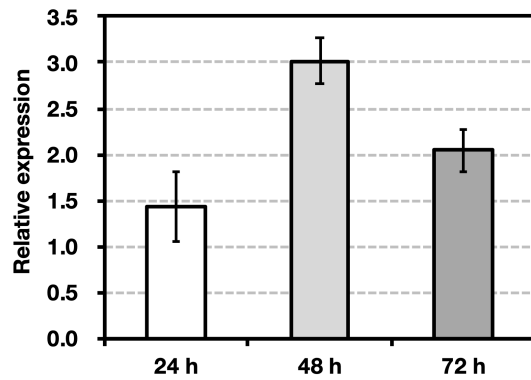
## 2-2. 分化マーカーの遺伝子発現評価

ヒト表皮では、分化の進行に伴って分化マーカーと呼ばれるタンパク質の発現が亢進することが知られている<sup>[16]</sup>。今回の検討では、有棘層の分化マーカーとして *keratin 10* と *keratin 1* を、顆粒層の分化マーカーとして *filaggrin* を選択し、それぞれの分化マーカーの mRNA 発現に対して ginnalin B および関連構造を有する化合物が与える影響をリアルタイム PCR (polymerase chain reaction) を用いた評価を行った。

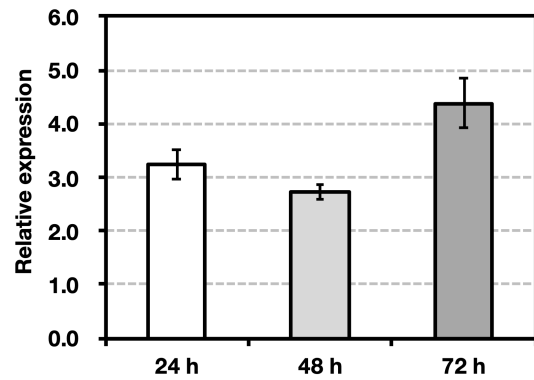
### 1) Ginnalin B が *keratin 10* および *filaggrin* に与える作用と評価時間の検討

本項では、形態学的評価によって分化への作用が示唆された ginnalin B について、分化マーカーの発現に与える影響および評価時間の最適化を行うために、ginnalin B の処置濃度を 50  $\mu$ M に固定し、有棘層の分化マーカーである *keratin 10* と顆粒層の分化マーカーである *filaggrin* の発現を、ginnalin B 処置開始後 24, 48, 72 時間の各時点において検討した。その結果、*keratin 10*, *filaggrin* の両分化マーカーについて、ginnalin B 処置による mRNA 発現量の増加が認められた。また、各処置時間における評価では、*keratin 10* については処置開始後 48 時間で最大の発現が認められ (Figure 3A)、*filaggrin* については処置開始後 72 時間で最大の発現が認められた (Figure 3B)。これらの検討により、ginnalin B は分化マーカーである *keratin 10* および *filaggrin* の遺伝子発現を促進させる作用を有することが明らかとなった。

A) *Keratin 10*



B) *Filaggrin*

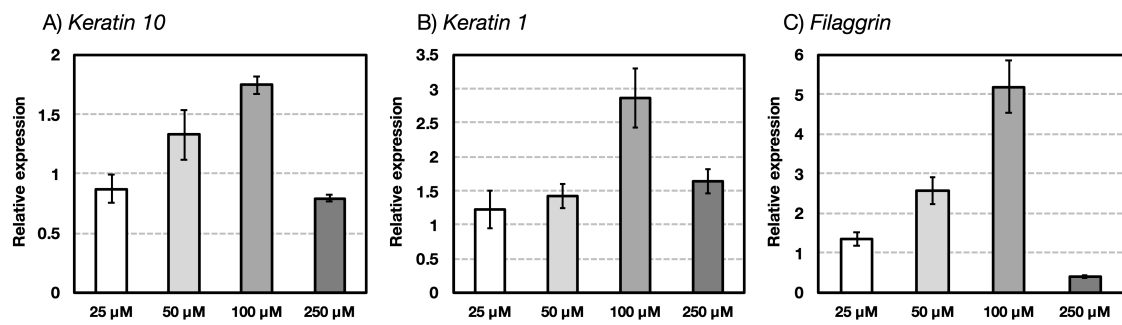


**Figure 3.** Ginnalin B が *keratin 10*, *filaggrin* の発現に与える作用の時間依存性  
ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (50  $\mu$ M) を 24, 48, 72 時間処置し、*keratin 10*  
(A) および *filaggrin* (B) の mRNA 発現を PCR によって評価した。値は平均値  $\pm$   
標準誤差で示した ( $n = 3-5$ )。

## 2) 各分化マーカーの発現に与える作用の濃度依存性の検討

前項の検討で ginnalin B が分化マーカーの発現を促進する作用を有することが明らかとなったことを踏まえ、より詳細な検討を行うために、有棘層の分化マーカーである *keratin 10* および *keratin 1* の発現に対して与える影響を、25–250  $\mu\text{M}$  の各処置濃度について、48 時間の処置の後に評価した。その結果、前項で発現促進効果が認められた *keratin 10* のみならず、*keratin 1* に関しても発現促進効果が認められ、その効果は両者に対して 100  $\mu\text{M}$  の処置において最大となり、それぞれ 1.75 倍、2.86 倍であった (Figure 4A and B)。

同様に、顆粒層の分化マーカーである *filaggrin* の発現に対して与える影響を、25–250  $\mu\text{M}$  の処置濃度について 72 時間の処置の後に評価した結果、*filaggrin* 発現の促進効果は、*keratin 10* および *keratin 1* と同様に、100  $\mu\text{M}$  の処置において 5.20 倍と最大となった (Figure 4C)。



**Figure 4.** 各分化マーカーに対する作用の濃度依存性

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (25–250 μM) を 48 時間処置し、*keratin 10* (A), *keratin 1* (B) および *filaggrin* (C) の mRNA 発現を PCR によって評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。

### 3) Ginnalin B と類似した構造を有する化合物を用いた検討

化学構造の面から ginnalin B の生物活性に関する知見を得るために、ginnalin B を含むカエデタンニン類の基本骨格である 1,5-anhydro-D-glucitol (1,5-AG)、ginnalin B が有する galloyl 基を構造が類似する他の置換基に置き換えた化合物、そして、galloyl 基の置換位置を他の部分に変更した化合物について、それぞれが *keratin 10* の発現に与える作用について検討を行った (Figure 5)。各化合物の処置濃度は 50  $\mu$ M とし、処置時間を 24 時間として評価を行った。

Ginnalin B 処置によって *keratin 10* の発現量は 1.91 倍と増加した。これに対し、基本骨格となる 1,5-AG では *keratin 10* の発現を促進する効果が認められず (1.08 倍)、galloyl 基部分を benzoyl 基や trimethoxy benzoyl 基に置換した化合物ではそれぞれ 1.23 倍、1.28 倍の増加と、ginnalin B と比較して作用が減弱した。置換位置の検討では、4 位を galloyl 基に置換したものが 1.71 倍、2 位や 3 位に関してもそれぞれ 1.45 倍、1.19 倍と、いずれも増加傾向を示したが、6 位の置換体である ginnalin B が最も強力な発現促進作用を示すことが明らかとなった (Figure 6)。



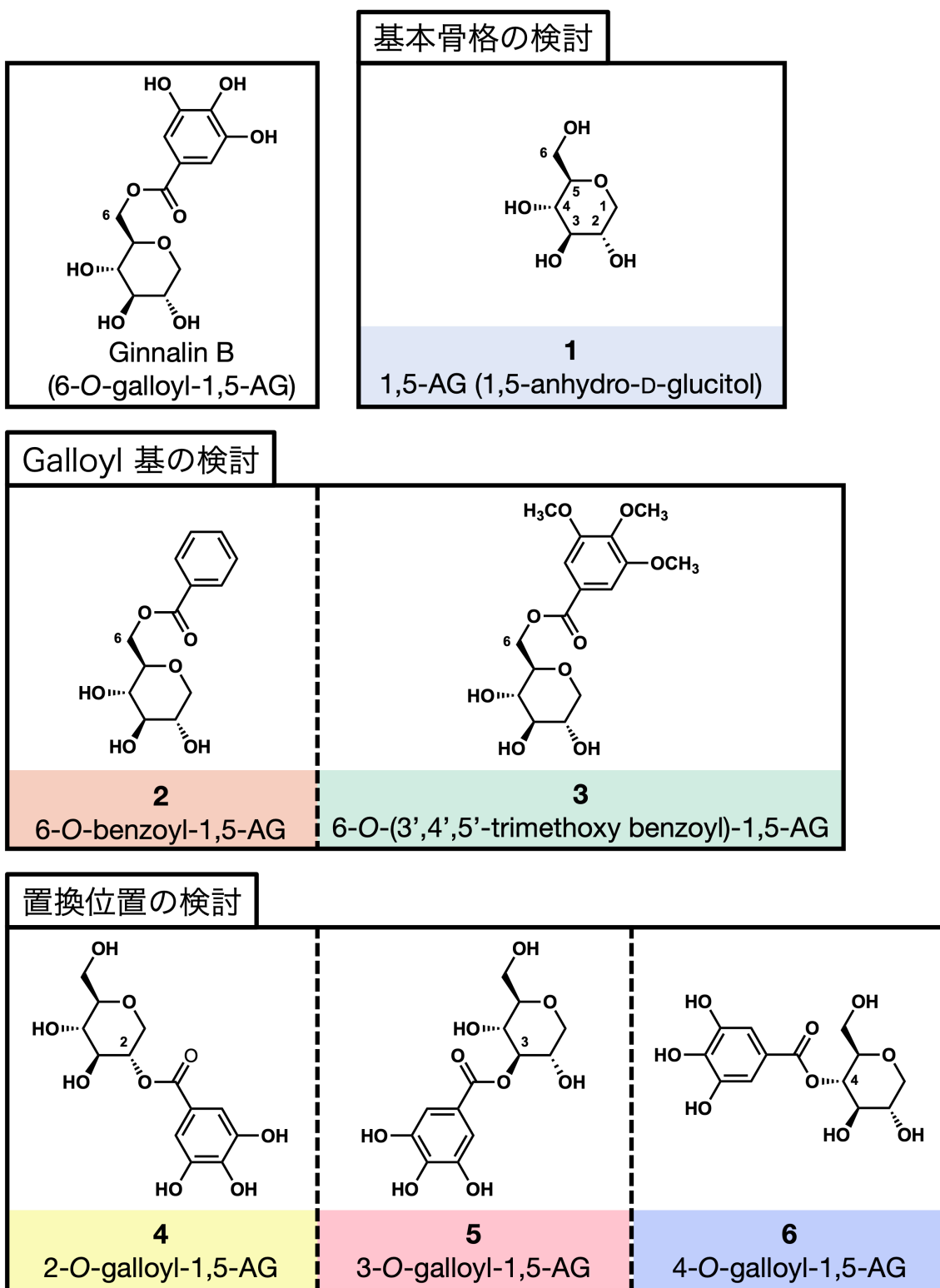
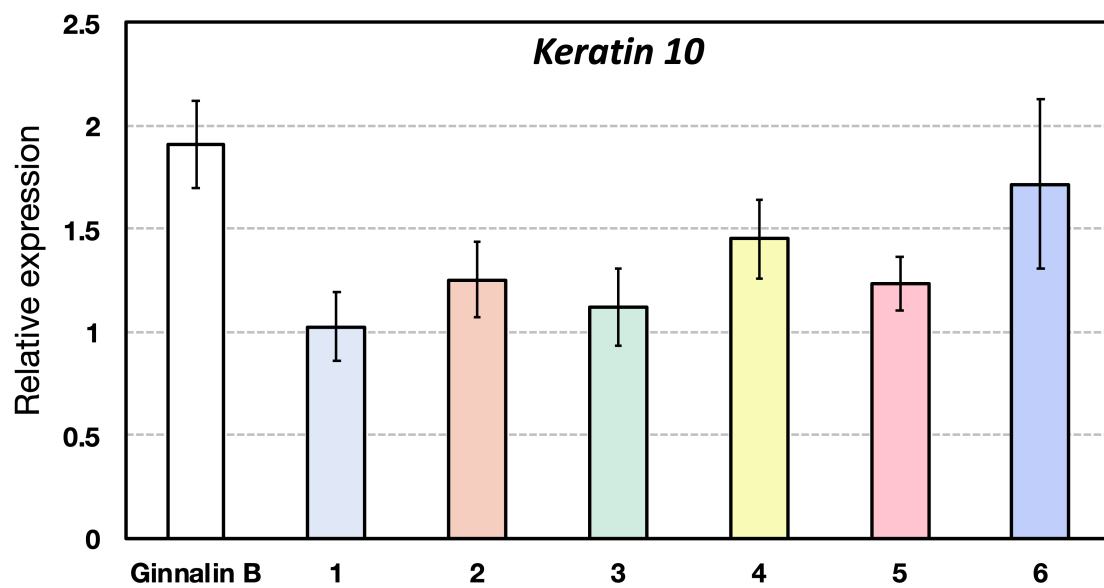


Figure 5. Ginnalin B と関連化合物の構造

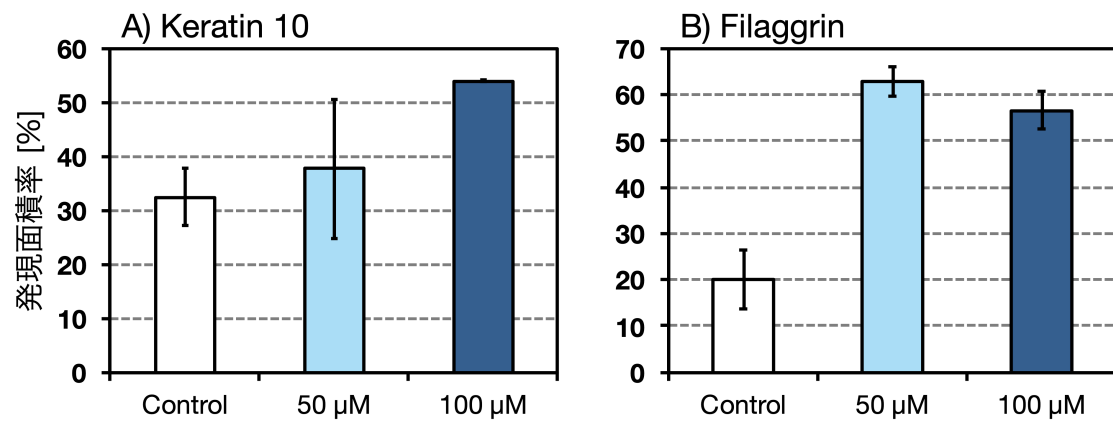


**Figure 6.** Ginnalin B および関連化合物が *keratin 10* の発現に与える作用  
ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B および関連化合物 (50  $\mu$ M) を 48 時間処  
置し、*keratin 10* の mRNA 発現を PCR によって評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤  
差で示した (n = 4-9)。

### 2-3. ヒト皮膚三次元モデルを用いた分化マーカーの発現評価

前項までの PCR を用いた検討によって、ginnalin B による分化マーカーの mRNA 発現量増加作用が明らかとなった。これに続き、分化マーカーのタンパク質発現に関して、ヒト三次元皮膚モデルを用いた検討を行った。ヒト三次元皮膚モデルは単層培養細胞と比べて表皮の層状構造を反映しており、よりヒト表皮に近い条件での検討を行うことが可能なことから動物実験の代替法として知られており<sup>[17]</sup>、皮膚分化に関する生物活性をより詳細に評価するための方法として選択した。本項では ginnalin B 処置による分化マーカーのタンパク質発現について、ヒト三次元皮膚モデルを用いた免疫組織化学的評価および画像解析による評価を行った。なお、本項の検討において、組織切片の作成および免疫染色の実験操作、発現領域の画像解析は外部機関（株式会社バイオ病理研究所、大分県国東市）に委託した。

ヒト皮膚三次元モデルを 50  $\mu$ M または 100  $\mu$ M の ginnalin B で 7 日間処置した結果、切片における keratin 10, filaggrin のタンパク質発現は、対照群ではそれぞれ 32.5 %, 20.0 %であったが、50  $\mu$ M の ginnalin B 処置ではそれぞれ 37.8 %, 62.8 %に、100  $\mu$ M の処置ではそれぞれ 54.0 %, 56.6 %に発現面積が増加した (Figure 7)。Ginnalin B による分化マーカーの発現は遺伝子レベルのみならずタンパク質レベルでも、また、単層培養細胞のみならず三次元皮膚モデルにおいても認められることが明らかとなった。



**Figure 7.** ヒト皮膚三次元モデルを用いた分化マーカーの発現評価

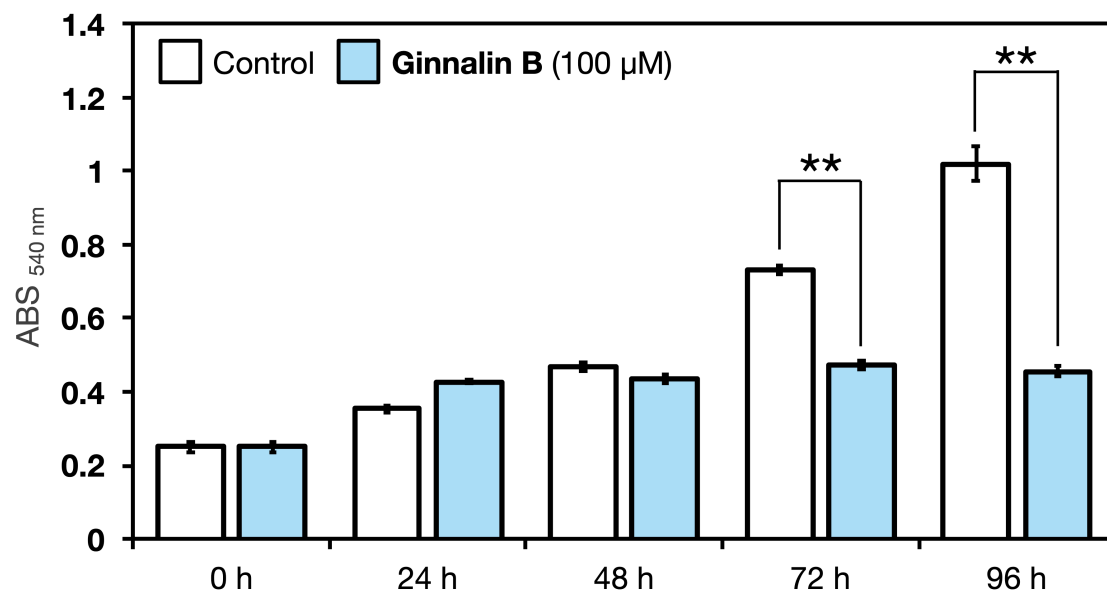
ヒト皮膚三次元モデル EPI-212 に ginnalin B (50, 100 μM) を 7 日間処置後に固定して切片を作成し、keratin 10 (A) および filaggrin (B) のタンパク質発現面積率を免疫組織化学法と画像解析によって評価した。値は平均値 ± 標準偏差で示した (n = 5)。

## 2-4. 増殖および生存に与える作用の評価

これまでの検討では、ヒト表皮細胞およびヒト皮膚三次元モデルにおける分化に与える影響に主眼を置いた評価を行った。ヒト表皮細胞において、分化と合わせて重要な生物学的過程として増殖が挙げられる。一般的に、分化が促進されるに伴って、細胞増殖は抑制され、停止に至ると考えられている。そこで本項では、これまでの検討で示唆された分化促進作用に対応した増殖の停止が生じるかについて評価を行うため、MTT 法<sup>[18]</sup>を用いて細胞数を経時的に評価した。また、増殖停止の原因が分化に伴うものか、細胞死や細胞傷害などによって細胞生存に影響が生じたことによるものかを検討するため、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) を用いた評価である LDH 法<sup>[19]</sup>、細胞核染色剤である hoechst 33342 を用いた細胞核形態変化の評価<sup>[20]</sup>をそれぞれ実施し、ginnalin B による細胞傷害性に関しても検討を行なった。

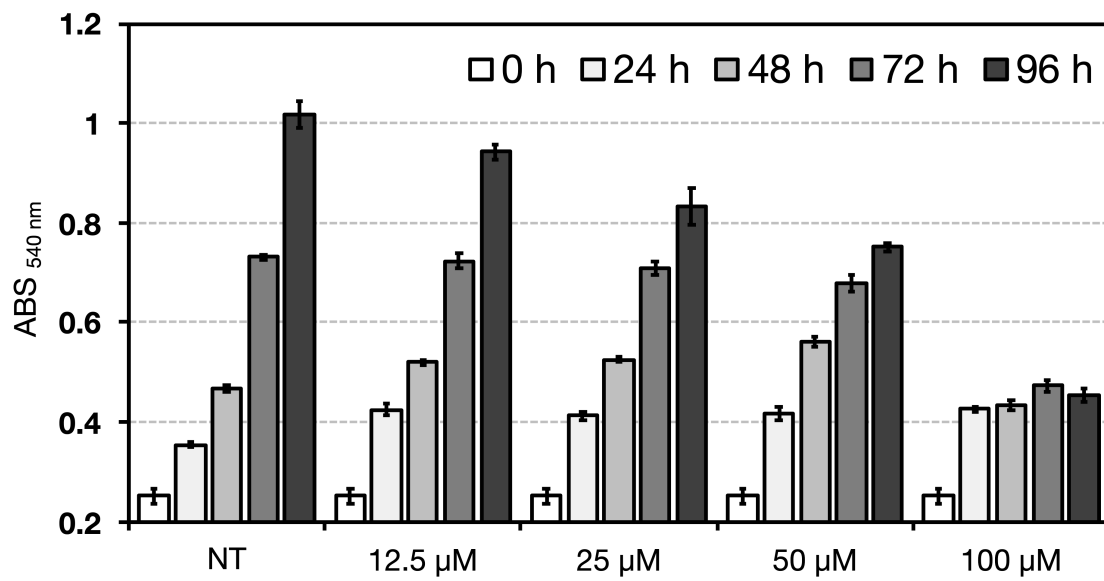
### 1) Ginnalin B が細胞増殖に与える作用の検討

ヒト表皮細胞 PHK 16-0b に 100  $\mu$ M の ginnalin B を処置し、処置開始時 (0 時間)、および 24, 48, 72, 96 時間後における細胞数を MTT 法によって評価した。その結果、処置開始後 72, 96 時間の各時点において、対照群と ginnalin B 処置群の吸光度 (細胞数に比例) に有意な差が認められた (Figure 8)。また、ginnalin B 処置群の吸光度は処置開始後 48 時間以降顕著な増加も減少も認められず、一定の数値を保っていた。濃度依存性についても検討を行ったところ、12.5–100  $\mu$ M の範囲では 100  $\mu$ M において最大の増殖抑制作用が認められた (Figure 9)。



**Figure 8.** Ginnalin B がヒト表皮細胞の増殖に与える作用

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (100 μM) を処置し、処置開始時および 24, 48, 72, 96 時間後の細胞数を MTT 法によって評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。\*\*, p < 0.01 vs control (Welch's t-test).



**Figure 9.** ヒト表皮細胞へ与える作用の濃度依存性

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (0–100  $\mu$ M) を処置し、処置開始時および 24, 48, 72, 96 時間後の細胞数を MTT 法によって評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n = 3$ )。

## 2) Ginnalin B の細胞傷害性に関する検討

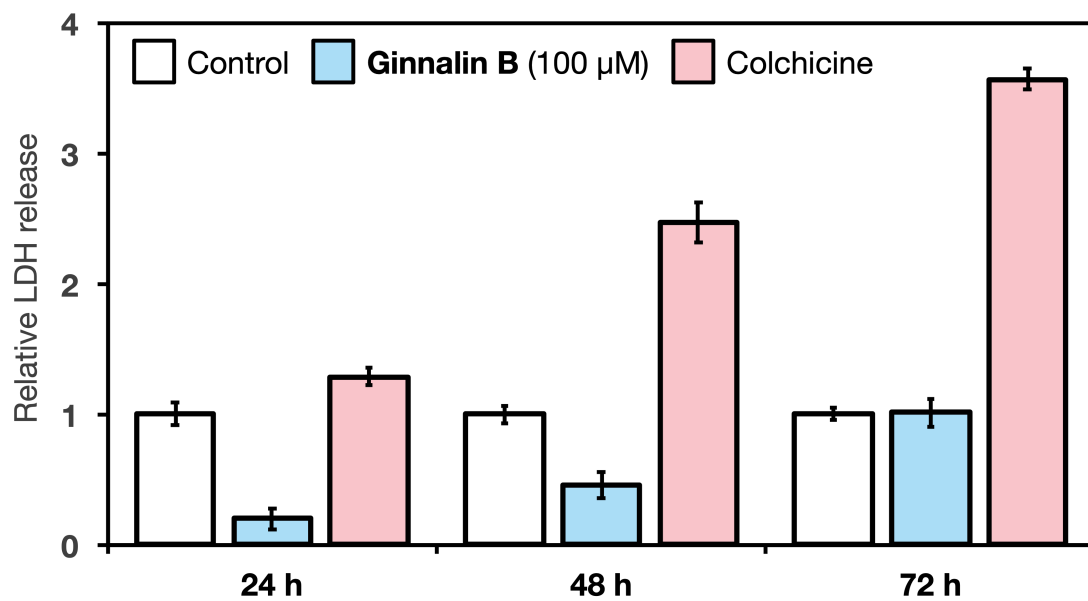
前項の MTT 法では細胞傷害によって増殖の停止や細胞死が生じている可能性を否定することができない。そこで、細胞膜に傷害が生じることで逸脱する酵素による評価である LDH 法およびアポトーシスの評価である hoechst 33352 による細胞核染色法を用いて ginnalin B の細胞傷害性を評価した。本項の検討では、細胞毒性を示す化合物(ポジティブコントロール)として colchicine を用いた<sup>[21]</sup>。

ヒト表皮細胞に 100  $\mu$ M の ginnalin B または 50  $\mu$ M の colchicine を処置し、処置開始後 24, 48, 72 時間後における逸脱酵素量を LDH 法によって評価した。その結果、細胞毒性を示す化合物である colchicine 処置群では LDH 量の増加が経時的に認められたのに対し、ginnalin B 処置群では対照群を超える LDH 量を示すことはなかった (Figure 10)。

さらに、アポトーシスが生じている可能性を検討するために細胞核染色剤である hoechst 33352 を用いて核形態の評価を行った。アポトーシスを起こした細胞では核の断片化が生じることが知られており、蛍光色素を用いた染色と蛍光顕微鏡による検出により、形態学的な評価を行うことが可能となる<sup>[20]</sup>。その結果、細胞毒性が知られている colchicine 処置群ではアポトーシスで特異的に生じる核の断片化が認められたのに対し、ginnalin B 処置では核の断片化が認められなかった (Figure 11)。

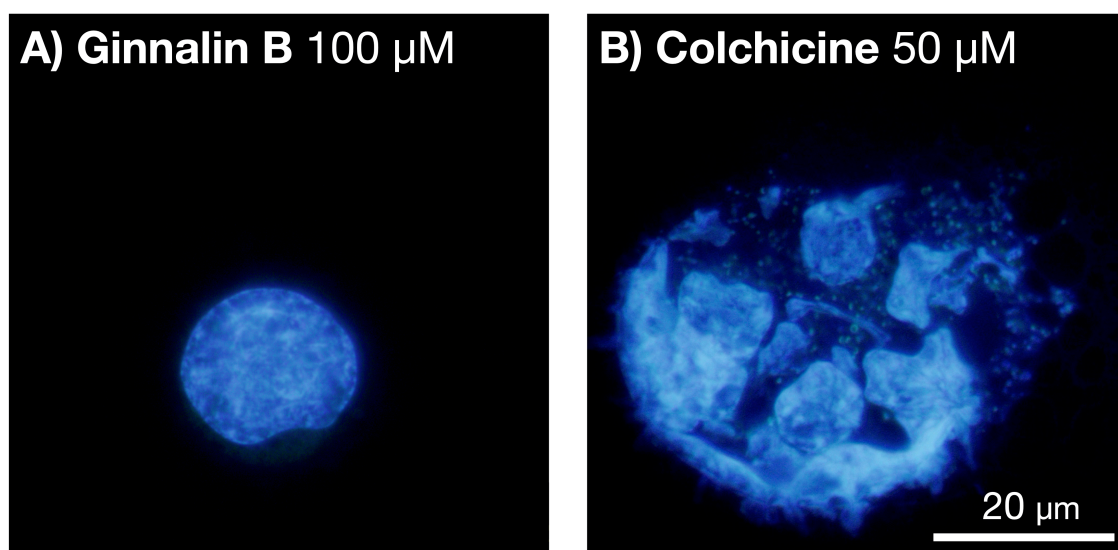
これらの結果より、ginnalin B は 100  $\mu$ M において細胞毒性を示さないことが示され、前項の結果は細胞毒性や細胞死によるものではなく、増殖の停止によるものであることが強く示唆された。





**Figure 10.** Ginnalin B の細胞傷害性

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (100 μM) および colchicine (50 μM) を処置し、24, 48, 72 時間後における逸脱した LDH 量を評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。



**Figure 11.** Ginnalin B が細胞核の形態に与える作用

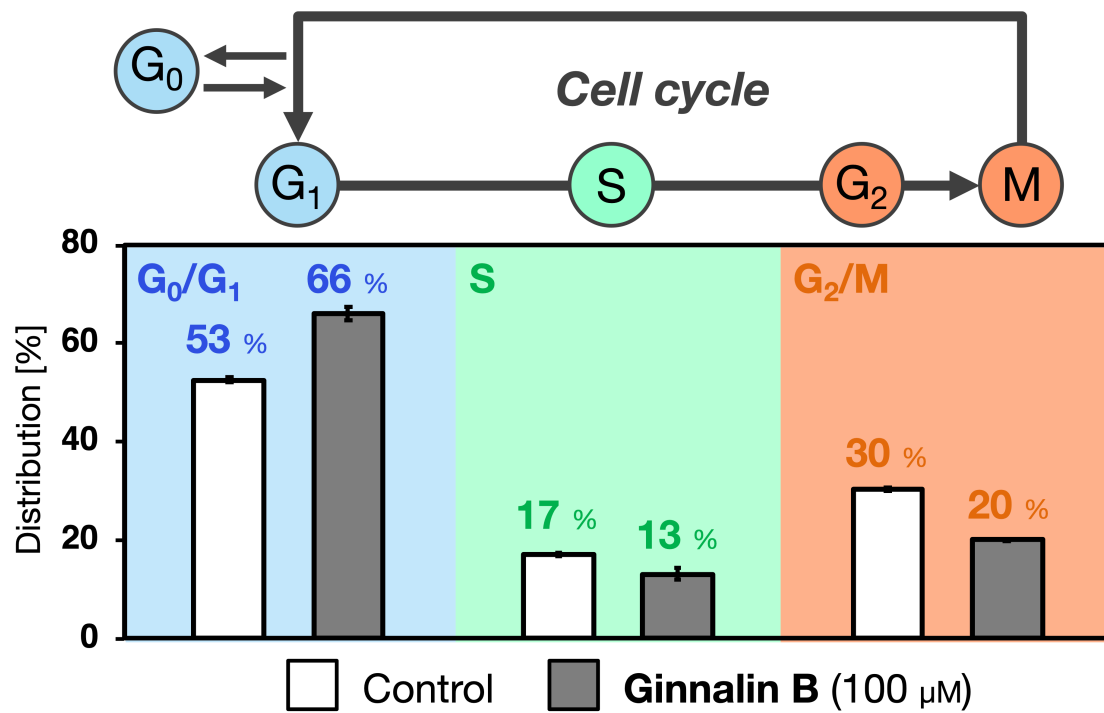
ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (100  $\mu$ M) および colchicine (50  $\mu$ M) を処置し、48 時間後に hoechst 33342 を用いて核染色を行って形態を評価した。スケールバーは 20  $\mu$ m を示す。

## 2-5. ヒト表皮細胞に与える作用機序の評価

### 1) 細胞周期に与える作用の検討

これまでの検討では、ginnalin B がヒト表皮細胞の分化と増殖に与える作用の評価を行い、ginnalin B による分化マーカーの発現促進作用および増殖停止作用を見出した。本項では、これらの作用機序に関する知見を得るために、ginnalin B 処置による細胞周期の変動を評価した。

ヒト表皮細胞を 100  $\mu$ M の ginnalin B で 48 時間処置し、propidium iodide 染色の後にフローサイトメーターを用いて分析したところ、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞数が対照群では 53 % であったのに対して、ginnalin B 処置群では 66 % に増加した (Figure 12)。また、S 期および G<sub>2</sub>/M 期では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の増加に伴い、対照群と比べて細胞数の減少が認められた。これらの結果から、ginnalin B はヒト表皮細胞の細胞周期を G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止させることが明らかとなった。



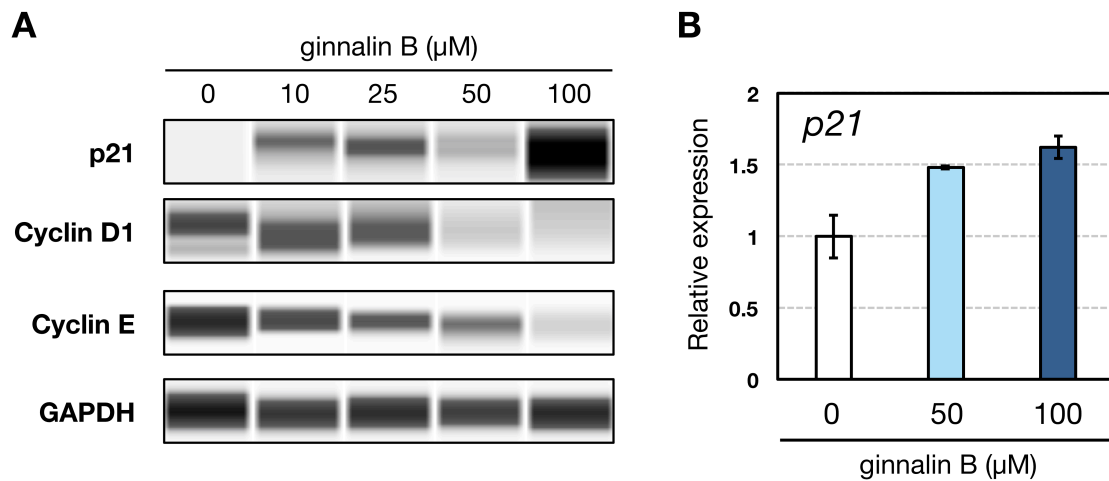
**Figure 12.** Ginnalin B がヒト表皮細胞の細胞周期に与える作用

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (100  $\mu$ M) を 48 時間処置し、各細胞周期の割合をフローサイトメトリーによって評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した (n = 3)。

## 2) p21、cyclin D1, cyclin E の発現に与える作用の検討

前項の検討により、ginnalin B が示す増殖停止において G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期での細胞周期停止が認められた。これに続き、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止に関与する因子の発現に与える作用を評価することとした。本検討では、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の停止に関わる因子として p21 を、進行に関わる因子として cyclin D1 と cyclin E を選択した。p21 はサイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase; CDK) を阻害することで細胞周期を停止させる役割を有している<sup>[22,23]</sup>。表皮細胞の分化開始時に増殖を停止させる作用や表皮細胞の分化調節との関連性についての報告<sup>[24,25]</sup>があることから、今回の評価対象とした。また、cyclin D1 は CDK4 または CDK6 と、cyclin E は CDK 2 と複合体を形成し、G<sub>1</sub> 期から S 期への進行を生じさせる役割を果たしており<sup>[26,27]</sup>、ginnalin B による G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止との相関性を検討する目的で評価対象に選定した。このような点を踏まえ、これらの因子の発現に対して ginnalin B が与える作用について、gel-free Simple Western<sup>TM</sup> system<sup>[28]</sup> (以下 Simple Western と表記する) によるタンパク質レベルおよび PCR による遺伝子レベルの評価をそれぞれ行なった。

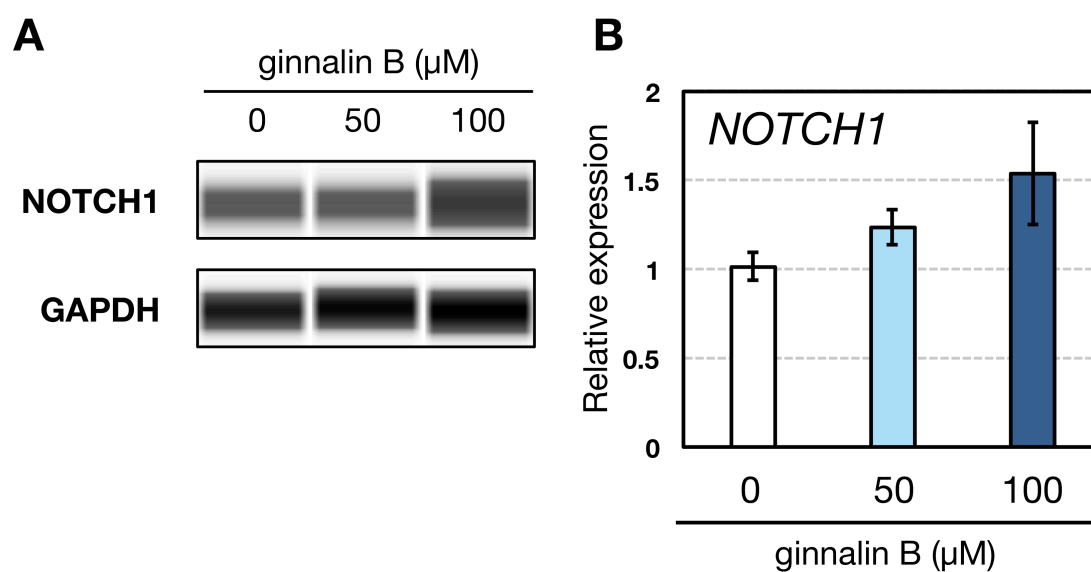
Simple Western 法によるタンパク質発現の評価では、p21 の発現が ginnalin B の濃度依存的に増加し、cyclin D1 および cyclin E の発現は濃度依存的に減少した (Figure 13A)。また、p21 については PCR による遺伝子レベルでの評価を合わせて実施した結果、濃度依存的な発現量の増加が認められた (Figure 13B)。



**Figure 13.** Ginnalin B が  $G_0/G_1$  停止に関連する因子の発現に与える作用  
 ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (0–100  $\mu\text{M}$ ) を 72 時間処置し、p21, cyclin D1, cyclin E, そして GAPDH のタンパク質発現量を Simple Western 法で評価した (A)。 *p21* の mRNA 発現量は PCR を用いて評価した (B)。(B) の値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n = 3$ )。

### 3) NOTCH1 の発現に与える作用の検討

前項の検討で、ginnalin B による増殖停止作用に p21、cyclin D1、そして cyclin E が関与していることが明らかとなった。これを踏まえ、シグナル経路における上流の因子の検討を行うこととした。p21 の発現を上昇させ、皮膚分化との関連が報告されている因子として、本検討では NOTCH1 について評価を行うこととした。NOTCH1 は細胞膜に存在する受容体であり、リガンドとの結合によって細胞内ドメインが核へと移行することで作用を示す<sup>[29]</sup>。これまで検討を行ってきた因子の発現に対しても作用を示すことが知られており、p21 の発現を上昇させ、cyclin D1 および cyclin E の発現を低下させることが報告されている<sup>[30]</sup>。またこれらの増殖停止に関わる因子のみならず、分化に関連する keratin 10 や keratin 1 の発現上昇にも関与することが報告されており<sup>[31]</sup>、皮膚分化に重要な役割を果たす因子である。これらを踏まえ、NOTCH1 の発現に対して ginnalin B が与える作用を Simple Western 法および PCR 法によって評価した。その結果、50  $\mu$ M 処置群では若干の発現上昇が、100  $\mu$ M 処置群ではタンパク質および遺伝子の各レベルにおける発現の上昇が認められた (Figure 14)。



**Figure 14.** Ginnalin B が NOTCH1 の発現に与える作用

ヒト表皮細胞 PHK16-0b に ginnalin B (50, 100  $\mu$ M) を 72 時間処置し、NOTCH1 および GAPDH のタンパク質発現量を Simple Western 法で評価した (A)。

*NOTCH1* の mRNA 発現量は PCR を用いて評価した (B)。(B) の値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n = 3$ )。



### 3. 考察

形態学的評価から示唆された分化に与える影響について、分化マーカーの発現を遺伝子レベルおよびタンパク質レベルで評価することで検討を行った。その結果、ginnalin B 処置によって、ヒト表皮細胞 PHK16-0b における分化マーカーの発現（遺伝子レベル）およびヒト皮膚三次元モデルにおける分化マーカーの発現（タンパク質レベル）が促進されることを明らかとした。ヒト表皮において、分化促進作用は表皮における細胞の健全な入れ替わりに寄与し、その恒常性を保つ一助となることが知られており、先行研究で明らかとなった ginnalin B による皮膚セラミド量の増加によるバリア機能の維持に加えて、本研究の結果によって ginnalin B は恒常性の維持にも寄与することが示唆され、ヒト表皮に対して有益な作用を示すことが明らかとなった。

また、ginnalin B と類似した構造を有する化合物を用いて分化マーカーの発現に与える作用を検討したところ、基本構造である 1,5-AG のみでは発現促進作用が認められなかったこと、ginnalin B の galloyl 基部分を構造が類似する他の置換基に変換したところ、発現促進作用が減弱すること、そして galloyl 基上のフェノール性水酸基が作用に関与している可能性がそれぞれ示された。さらに、galloyl 基の置換位置の検討により、1,5-AG の 6 位に galloyl 基が結合している構造を有する ginnalin B が最も強力な発現促進作用を示すことも明らかとなった。これらの結果より、ginnalin B の分化促進作用と galloyl 基およびそのフェノール性水酸基、そして置換位置との間に関連があることが示唆された。この検討では、当研究室での先行研究<sup>[13]</sup>で実施したセラミドに関する検討においては細胞内セラミド量の増加を生じさせなかった 4-*O*-galloyl-1,5-AG が *keratin 10* の発現を促進させる結果が得られた。セラミドは細胞内の様々なシグナルに関与することが知られており、増殖や分化に関与するという報告<sup>[32,33]</sup>もされているが、今回検討した ginnalin B が分化に対して与える作用は、セラミド産生およびセラミドによるシグナル経路とは独立した機序によって生じている可能性が示唆された。

次に分化促進作用に対応する増殖停止が生じるか検討した結果、ginnalin B はヒト表皮細胞に対して濃度依存的な増殖停止作用を示すことが明らかとなった。

また、細胞毒性の検討を実施したところ、細胞傷害性やアポトーシスが否定的な結果が得られ、増殖停止は分化促進に起因して生じている可能性が示唆された。

作用メカニズムの検討では、NOTCH1 の関与を明らかとした。Ginnalin B と NOTCH1 との相互作用様式や、NOTCH1 に関連するシグナル経路の各因子の発現変動、NOTCH のリガンドに関する評価などについて更なる検討の余地はあるものの、ginnalin B による分化促進および増殖停止の作用機序に関する知見を得ることに成功した。

#### 4. 結論

本研究によって以下の知見を得ることに成功した。

- Ginnalin B はヒト表皮の分化マーカーである keratin 10, keratin 1, そして filaggrin の発現を上昇させ、皮膚分化を促進させる
- Ginnalin B による keratin 10 および filaggrin の発現促進作用は単層培養細胞のみではなくヒト皮膚三次元モデルにおいても認められる
- Ginnalin B は p21 の発現上昇および cyclin D1 と cyclin E の発現低下をそれぞれ生じさせ、細胞周期を G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止させる
- Ginnalin B は NOTCH1 の発現上昇を介して分化および増殖に対して作用を与える

以上の結果は、ginnalin B がヒト表皮の分化を促進させ、皮膚の恒常性および機能の維持に寄与することを示唆するものであり、ginnalin B はヒト皮膚に有益な作用を示す化合物として化粧品などへの応用が期待される。

## 5. 実験方法

### 5-1. 被験化合物

活性評価に用いた ginnalin B および関連化合物は、石川 文博 博士（株式会社伏見製薬所）から提供されたものを用いた。

### 5-2. 細胞培養

ヒト表皮由来ケラチノサイト細胞株として PHK16-0b (JCRB0141) を用いた。この細胞は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより分譲を受けた。PHK16-0b は Keratinocyte Basal Medium 500 mL に対して BPE (bovine pituitary extract) 2.0 mL, EGF (epidermal growth factor) 0.5 mL, Insulin 0.5 mL, hydrocortisone 0.5 mL, GA-1000 (gentamicin, amphotericin-B) 0.5 mL, epinephrine 0.25 mL, transferrin 0.5 mL を添加した培地を用いて培養を行なった。上記の培地および添加因子は、Lonza (Basel, Switzerland) より購入したものを用いた。全ての培養は、37 °C かつ 5 % CO<sub>2</sub> 条件に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (MCO-175M, SANYO, Tokyo, Japan) 内で実施した。

細胞の洗浄には、Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>をどちらも含まない phosphate buffered saline (PBS) を用いた。PBS は蒸留水 1 L 中に KCl 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 28.8 g, および NaCl 200 g を含む PBS (25×)を調製し、それを蒸留水で 25 倍希釈することによって調整した。PBS の調製に用いた試薬は FUJIFILM WAKO Pure Chemical (Osaka, Japan)より購入した。

### 5-3. 形態学的評価

96 ウェルプレートに PHK16-0b を  $2 \times 10^3$  cells/well の密度で播種し、インキュベーター内で 24 時間前培養した。前培養終了後、ginnalin B を終濃度が 100 μM となるように添加し、72 時間培養を行なった。培養終了後、倒立顕微鏡 BZ-8000 (KEYENCE Corporation, Osaka, JAPAN) を用いて画像を取得した。

### 5-4. Real time RT-PCR による遺伝子発現の評価

96 ウェルプレートに PHK16-0b を  $5 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し、インキュベーター内で 24 時間前培養した。前培養終了後、被験化合物を添加し、所定の時間インキュベーター内で培養を行なった。被験化合物は蒸留水で溶解させ、0.2 μm のフィルターを用いた濾過滅菌を行なった後に用いた。

培養終了後に PBS を用いて細胞を洗浄し、NucleoSpin RNA Plus (Takara-Bio Inc, Shiga, Japan) を用いて total RNA の精製を行なった。Real time RT-PCR は One Step TB Green PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Takara-Bio Inc, Shiga, Japan) および Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) を用いて実施した。標的とした遺伝子の発現量は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) で補正し、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて算出した。

今回用いたプライマーの配列を以下に示す。

1) *p21*

Forward 5' - GACTCTCAGGGTCGAAAACGG - 3'

Reverse 5' - GCGGATTAGGGCTTCCTCTT - 3'

2) *Keratin 10*

Forward 5' - GTCCCAACTGGCCTTGAAAACAATC - 3'

Reverse 5' - AGTATTCTGGCACTCGGTTTCAGC - 3'

3) *Keratin 1*

Forward 5' - ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC - 3'

Reverse 5' - CTGATGGACTGCTGCAAGTT - 3'

4) *Filaggrin*

Forward 5' - CACAAGATTCTGCGTATCACTCAGG - 3'

Reverse 5' - GCCTTTCAGTGCCCTCAGATTG - 3'

5) *NOTCH1*

Forward 5' - AAGCTGCATCCAGAGGCAAAC - 3'

Reverse 5' - TGGCATAACACTCCGAGAACAC - 3'

6) *GAPDH*

Forward 5' - CATGAGAAGTATGACAACAGCCT - 3'

Reverse 5' - AGTCCTTCCACGATACCAAAGT - 3'

### 5-5. ヒト皮膚三次元培養モデルを用いた評価

培養細胞による単層での評価に加えて、皮膚に類似した層構造を有する 3 次元皮膚モデルを用いた評価を行った。3 次元皮膚モデルは EpiDerm Skin Model EPI-212 (MatTek Corporation, MA, USA)を用いた。3 次元皮膚モデルの培養は、EPI-100-NMM hydrocortisone-free maintenance medium (MatTek Corporation, MA, USA)を用いて、37 °C かつ 5 % CO<sub>2</sub> 条件に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (MCO-175M, SANYO, Tokyo, Japan) 内で行った。

3 次元皮膚モデルは、ginnalin B (5) を 100 μM となるように溶解させた培地中で 7 日間培養を行った。培養終了後、3 次元皮膚モデルは 4 % paraformaldehyde phosphate buffer solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) で 7 日間固定を行った。以下、組織標本の作成および免疫染色の操作、発現領域の解析は、外部機関（株式会社バイオ病理研究所、大分県国東市）に委託して実施した。

### 5-6. 細胞生存率および細胞増殖の評価

細胞生存率と増殖能は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 法を用いて評価した。被験化合物は、dimethyl sulfoxide (DMSO; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) に溶解させて使用した。96 ウェルプレートに PHK16-0b を  $2 \times 10^3$  cells/well の密度で播種し、インキュベーター内で 24 時間前培養した。前培養終了後、サンプルを種々の濃度で溶解させた培地を添加し、インキュベーター内で任意の時間 (24, 48, 72, 96 時間) 培養した。このとき、サンプルの代わりに溶媒を添加した群をコントロールとし、サンプルの代わりに溶媒を添加して MTT を添加しなかった群をブランクとした。培養終了後、PBS を用いて 2.0 mg/mL に調製した MTT (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を各 well に 20 μL ずつ添加して、インキュベーター内で 4 時間呈色反応させた。反応終了後、各ウェルの培地を吸引除去し、DMSO 200 μL を加えてホルマザンを溶解させて、540 nm における吸光度を測定した。測定には FilterMax F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を使用した。

各測定点におけるコントロールを生存率 100 %としたとき、サンプル処置群の細胞生存率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{細胞生存率 [\%]} = [(A_{\text{サンプル}} - A_{\text{ブランク}}) / (A_{\text{コントロール}} - A_{\text{ブランク}})] \times 100$$

上式において、A は 540 nm における吸光度を、添字はそれぞれがサンプル添加、コントロール、あるいはブランクの吸光度であることを示している。測定は 3 つの独立したウェルについて行った (n = 3)。

細胞増殖は、吸光度の変化によって評価を行った。サンプル添加時点 (0 h) における吸光度は、前培養終了後すぐに新しい培地および MTT を添加し、同様の方法で呈色反応をさせて得た値を用いた。

#### 5-7. 細胞傷害性の評価

細胞傷害性は、細胞膜が傷害されることによって逸脱する乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH) を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて評価した。

96 ウェルプレートに PHK16-0b を  $2 \times 10^3$  cells/well の密度で播種し、インキュベーター内で 24 時間前培養した。前培養終了後、ginnalin B (100  $\mu$ M) または colchicine (50  $\mu$ M, FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan) を溶解させた培地 200  $\mu$ L に交換し、インキュベーター内で培養した。コントロール群は同量の培地に交換した。予備検討により、ginnalin B を溶解させた培地では着色が生じ、LDH アッセイの測定波長である 490 nm における吸光度に対して影響を与えることが明らかとなった。そのため、サンプル由来の吸光度を補正するために、細胞を播種していない well に、サンプルを溶解させた培地を 200  $\mu$ L 加え、同様にインキュベーションを実施したものを試薬入りブランク群として準備した。

培養終了後、各 well より培養上清 100  $\mu$ L を回収し、そこに Working Solution 100  $\mu$ L を添加して室温で 30 分間呈色反応させた。反応終了後、Stop Solution 50  $\mu$ L を加えて呈色反応を停止させ、490 nm における吸光度を FilterMax F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を使用して測定した。

#### 5-8. Hoechst 33342 を用いた細胞核の形態評価

6 ウェルプレートに PHK16-0b を  $5 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し、インキュベーター内で 24 時間前培養した。前培養終了後、ginnalin B または colchicine (FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan) を終濃度が 100  $\mu$ M となるように溶解させた培地 2 mL に交換し、インキュベーター内で 48 時間培養した。培養終了後、trypsin-EDTA (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて細胞を回収した。PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を終濃度が 4  $\mu$ g/mL となるように添加し、遮光した上で 30 分室温で染色を行った。細胞核の蛍光観察は、蛍光顕微鏡 BX-61 および CCD カメラ DP70 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan)で行い、取得した画像は Image J<sup>[34]</sup> で処理を実施した。

#### 5-9. フローサイトメトリーによる細胞周期の評価

PHK16-0b は 100  $\mu$ M の ginnalin B の存在および非存在下で 48 時間培養を行い、trypsin-EDTA (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて回収した。2 %の BS を含む PBS (PBS-BS) で 2 回洗浄を行った。その後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で予冷した 70 % ethanol (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を加えて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で一晩固定した。固定した細胞は、PBS-BS で 2 回洗浄を行い、0.25 mg/mL RNase (Nacalai Tesque Inc, Kyoto, Japan) 溶液で再懸濁の後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 15 分反応させた。反応終了後、propidium iodide (PI; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を終濃度が 50  $\mu$ g/mL となるように加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 、遮光条件下で 30 分染色した。染色終了後、サンプルは測定直前に 35  $\mu$ m ナイロンメッシュ (Corning, NY, USA)を通して測定に供した。測定および解析は FACS CantoII および FACSDiva (version 6.1.2; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて行った。

#### 5-10. gel-free Simple Western<sup>TM</sup> system によるタンパク質発現の評価

本研究では、タンパク質発現の評価はキャピラリー電気泳動による全自動ウエスタンブロットのための機器である Wes および gel-free Simple Western<sup>TM</sup> system (Protein Simple, San Jose, CA, USA) を用いて実施した。以下に実験操作の概略を述べる。



各種処置細胞および未処置細胞（対照群）は回収後に超音波処理を行い、ライセートとした。ライセートはタンパク質濃度を決定後 100 µg/mL となるように Sample buffer で希釈を行い、5× Fluorescent Master Mix と 4:1 の比率で混合させた後に 95 °C で 5 分間処理した。以下、製品のプロトコールに沿って反応および検出を行なった。使用した一次抗体と希釈倍率を以下に示す。

Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 社製の抗体

p21: anti-p21 Waf1/Cip1 (12D1), Rabbit, 1:200

cyclin D1: anti-cyclin D1, Rabbit, 1:10

cyclin E: anti-cyclin E, Rabbit, 1:10

Abcam (Cambridge, UK) 社製の抗体

NOTCH1: anti-NOTCH1 [EP1238Y], Rabbit, 1:500

画像の取得および解析は Compass for Simple Western (ver.3.1.7, Protein Simple, San Jose, USA) を用いて行なった。

## 第 2 章

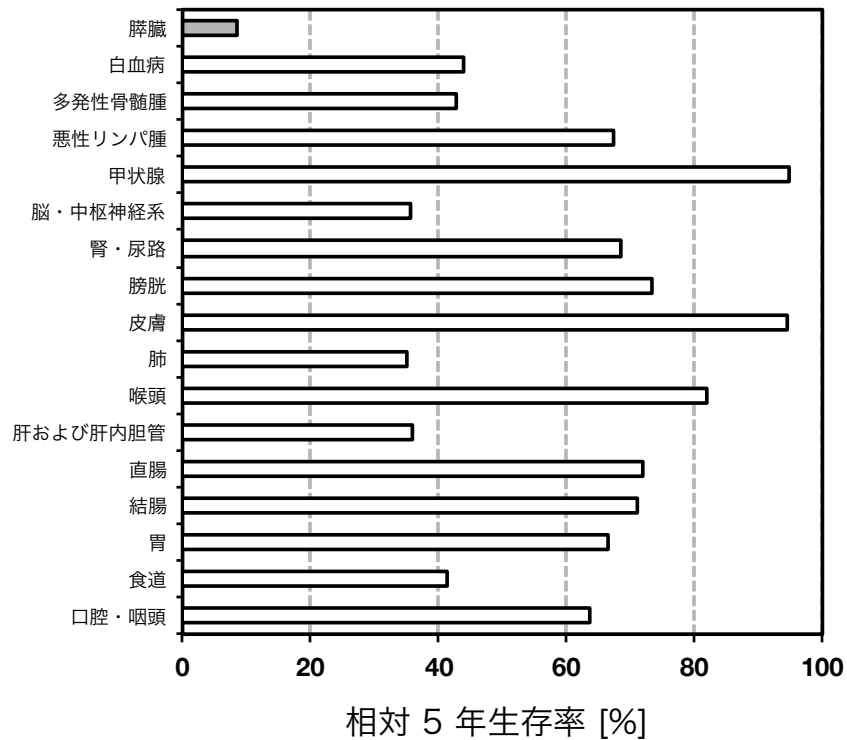
### 栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対するアゾベンゼン誘導体の生物活性評価

#### 1. 序論

我が国におけるがん罹患数および死亡数は年々増加している。2020 年 11 月現在、国立がん研究センターは「最新がん統計」のなかで、男女ともに 2 人に 1 人が生涯のどこかでがん罹患し、男性では 4 人に 1 人、女性では 7 人に 1 人が、がんによって死亡していると発表している<sup>[35]</sup>。その一方で、がんにおける生存率は多くの部位において改善傾向にある。この理由として、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬など新薬の開発、そしてそれらを用いた新規治療法の発展が関連していると考えられる<sup>[36,37]</sup>。

このような発展がみられている一方で、治療困難ながんも依然として存在している。その代表例に膵臓がんが挙げられる<sup>[38]</sup>。膵臓がんの相対 5 年生存率は 8.5 % と、部位別の数値としては最も低い (Figure 15A)。これは我が国に限ったことではなく、全世界での 5 年生存率も約 9 % と報告されており<sup>[39]</sup>、世界的に治療成績が不良である。さらに、統計値が公表されている 1993 年から 2011 年における 5 年生存率の推移についても改善傾向はみられていない (Figure 15B)。また、近年の臨床試験では、膵臓がん治療で用いられる薬剤である gemcitabine による治療では全生存期間中央値がわずか 6.8 ヶ月であり、4 剤併用の強力な化学療法である FOLFIRINOX を用いても 11.1 ヶ月であるという結果を報告している<sup>[40]</sup>。膵臓がん治療で用いられる既存薬は効果が十分でないことに加えて、保険適応のある選択肢も少なく、富山大学附属病院で 2021 年 1 月現在使用可能なレジメンの種類は大腸がんでは 31 種類なのに対して、膵臓がんでは 7 種類しか存在しない。このように、難治性かつ治療成績の改善もみられておらず、既存薬の効果や数も十分ではない、というのが膵臓がん治療の現状であり、画期的な新規治療薬の開発が強く望まれている。

A) 部位別相対 5 年生存率（2009年～2011年診断例）



B) 相対 5 年生存率の推移

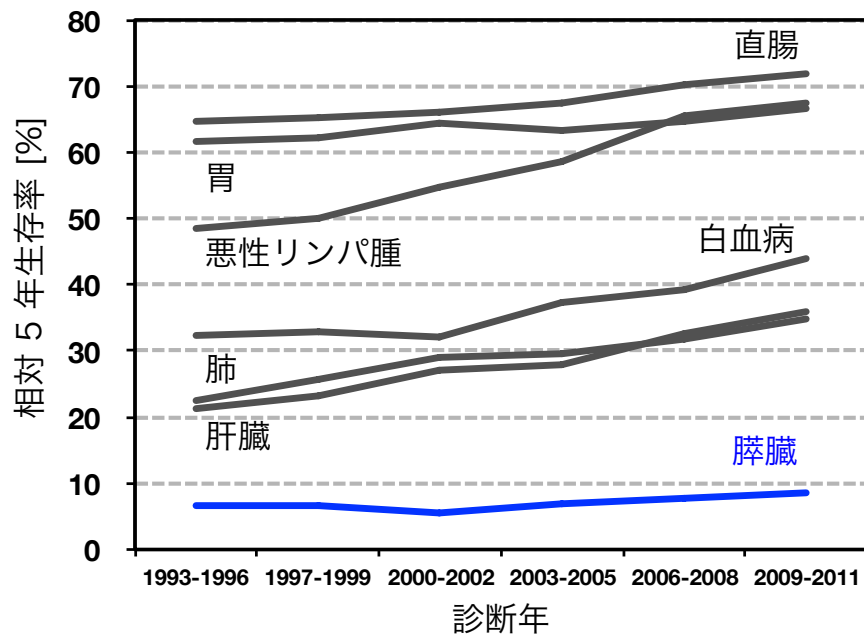


Figure 15. 脾臓がんの 5 年生存率とその推移

人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部編）のデータを使用して作成

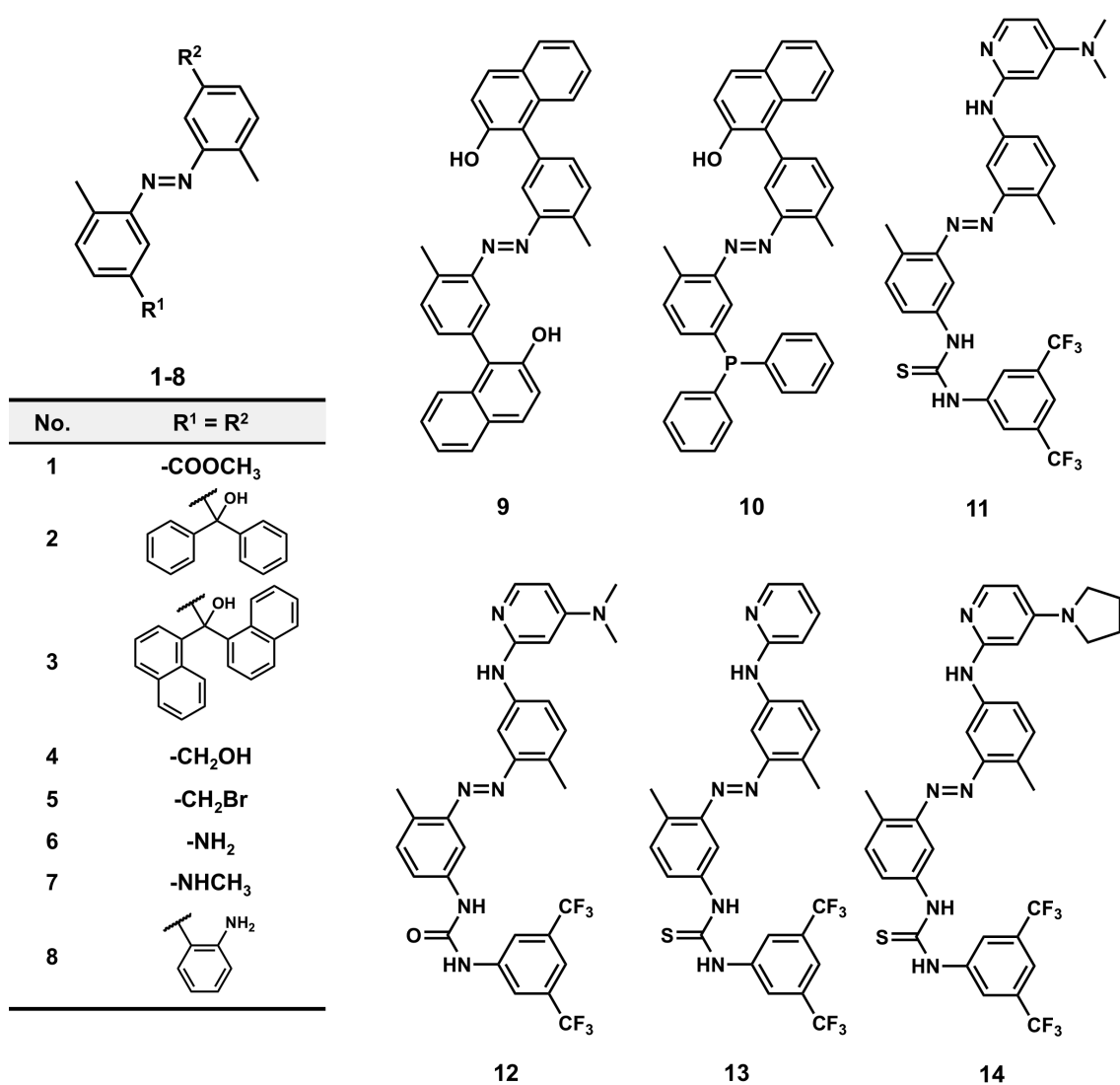
膵臓がん治療が困難である理由は様々な観点から研究が行われているが、そのひとつにがん細胞の周辺環境に着目したものがある。これまでの研究から、膵臓がんは乏血管性の腫瘍であり一部の細胞が栄養飢餓状態にあること<sup>[41]</sup>、膵臓がん細胞は血清やアミノ酸、グルコースを含まない栄養飢餓培地中でも生存すること<sup>[42]</sup>、そして、このような栄養飢餓条件では既存の抗悪性腫瘍薬に耐性を示すこと<sup>[43]</sup>がそれぞれ明らかとなった。また、栄養飢餓や細胞のストレス応答過程である autophagy が栄養飢餓状態における生存に関与している可能性が報告され<sup>[44,45]</sup>、このような特徴は治療成績不良に寄与することが示唆されている<sup>[46]</sup>。以上の各研究結果より、栄養飢餓条件において生存できるという膵臓がん細胞の特徴はその治療が困難であることと密接に結びついていると考えられており、打開策が必要である。

これまで述べてきたように、膵臓がんの新規治療薬は熱望されており、さらに栄養飢餓状態が治療を困難にさせているという知見が得られていることを踏まえ、本研究では栄養飢餓状態において抗膵臓がん活性を示す化合物の探索を目指した。栄養飢餓状態における抗膵臓がん活性を示す化合物に関するこれまでの研究では、天然物を中心に検討が行われ、栄養飢餓条件における抗がん活性を示す複数の化合物が報告されている<sup>[47-50]</sup>。また、報告された化合物のひとつである arctigenin<sup>[51]</sup>を含有する牛蒡子エキスは、実際に臨床試験へと進んでおり<sup>[52]</sup>、このことから栄養飢餓状態は有望な標的であると考えられる。その一方で、栄養飢餓状態での作用を示す化合物の臨床使用は現時点で承認されていないことからさらなる探索が必要である。また、これまでの検討は天然物およびその誘導体に関するものが多く、非天然の合成物に関する知見が十分得られていない。こうした点を踏まえ、当研究室が保有する合成化合物を用いて栄養飢餓条件において抗がん活性を示す化合物を探索することとした。

当研究室が保有する化合物を用いた初期検討において、アゾベンゼン誘導体に抗がん活性が見出されたことから、より多くのアゾベンゼン誘導体を用いた検討を進めた。今回見出された化合物が有する構造のアゾベンゼンは、高分子ポリマーに組み込むことで薬物輸送担体とする応用<sup>[53]</sup>や、光刺激で異性化する特性を用いた生物活性の制御などの報告<sup>[54,55]</sup>はあるものの、栄養飢餓状態にお

ける活性や抗腫瘍がん活性に関する検討は十分に行われておらず、検討を進めることによって新規かつ有用な知見を得ることができると判断した。

これらの点を踏まえ、本研究では 14 種類のアゾベンゼン誘導体 (**1–14**, Figure 16) を用いた生物活性評価を実施し、5 種類の化合物で栄養飢餓状態における抗がん活性を見出すことに成功した。さらに、栄養飢餓条件で抗がん活性を示す化合物について、富栄養状態における細胞毒性の評価を実施したところ、3,3'-di(2-hydroxynaphthyl)-6,6'-dimethylazobenzene (**9**) が栄養飢餓選択的な抗がん活性を示すことが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、化合物が細胞周期に対して与える影響などについても検討を行った。以下、これらの詳細について述べる。



**Figure 16.** 今回の検討で用いたアゾベンゼン誘導体（1-14）の構造

## 2. 結果

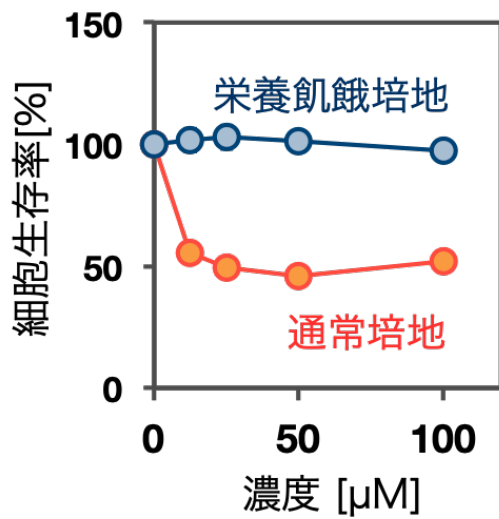
### 2-1. 栄養飢餓条件における抗がん活性の評価

栄養飢餓条件において化合物が抗がん活性を示すか検討を行った。今回の検討における「栄養飢餓条件」は、血清、アミノ酸、そしてグルコースを全て含まない栄養飢餓培地<sup>[42]</sup>を用いることで構築した。

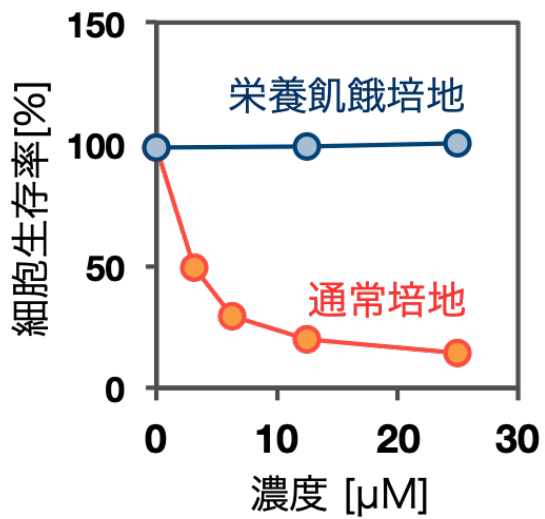
まず、今日の臨床で用いられている抗悪性腫瘍薬である gemcitabine および 5-fluorouracil の栄養飢餓条件における抗がん活性をヒト膵臓がん細胞株である PANC-1<sup>[56]</sup>を用いて検討した結果、どちらの化合物も抗がん活性を示さなかった ( $IC_{50} > 200 \mu M$ , Figure 17)。この他にも、paclitaxel や camptothecin など様々な抗悪性腫瘍薬が栄養飢餓条件において活性を示さないことが報告されている<sup>[43]</sup>。膵臓がん治療において、わずかな選択肢となる薬剤であっても、栄養飢餓状態においては効果を発揮することができないことが示された。

これらの点を踏まえ、既存の抗悪性腫瘍薬が効果を発揮しない栄養飢餓条件における 14 種類のアゾベンゼン誘導体 (**1-14**) の抗がん活性を評価した。その結果、14 種類のうち 5 種類の化合物 (**9, 11-14**) で栄養飢餓条件における抗がん活性が見出された ( $IC_{50} = 1.5-9.6 \mu M$ , Table 1)。

A) gemcitabine



B) 5-fluorouracil



**Figure 17.** 臨床で使用する抗悪性腫瘍薬の栄養飢餓条件における活性ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 を通常培地または栄養飢餓培地で gemcitabine (A) または 5-fluorouracil (B) を 72 時間処置し、細胞生存率を MTT 法で評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。



**Table 1.** アゾベンゼン誘導体 (1–14) および既存薬 (5-FU, GEM) が栄養飢餓条件で示す抗がん活性

No.	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>1</b>	> 80
<b>2</b>	> 80
<b>3</b>	> 80
<b>4</b>	> 80
<b>5</b>	> 80
<b>6</b>	> 80
<b>7</b>	> 80
<b>8</b>	> 80
<b>9</b>	4.1 ± 0.3
<b>10</b>	> 80
<b>11</b>	1.5 ± 0.1
<b>12</b>	3.6 ± 0.5
<b>13</b>	5.4 ± 0.8
<b>14</b>	9.6 ± 0.1
<b>5-FU</b>	> 200
<b>GEM</b>	> 200

処置時間：24 時間、値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。

5-FU; 5-fluorouracil, GEM; gemcitabine

## 2-2. 富栄養条件における細胞毒性の評価

抗悪性腫瘍薬を用いた治療において、骨髄抑制などの副作用は患者の QOL (quality of life) を低下させるのみならず、治療継続を困難にさせるなどの多くの弊害を生じさせる。これらの副作用は、抗悪性腫瘍薬が標的であるがん細胞以外に、正常細胞、特に増殖の速い骨髄細胞などに対してもその作用を発揮させてしまうことによって生じる<sup>[57]</sup>。そのため、副作用の回避においては、いかにがん細胞選択的に作用を発揮させるかということが問題となる。本章で標的としている栄養飢餓状態では、正常細胞が生存することはできない<sup>[42]</sup>。そのため、栄養飢餓状態選択的に抗がん活性が発揮されれば、がん細胞に対する選択性を高めて副作用の回避につながると考えられる。そこで、前項で行なった栄養飢餓条件における活性評価に続き、本項では正常細胞が生存する環境である富栄養条件を血清やアミノ酸、グルコースを含有する通常培地を用いて構築し、その細胞傷害性を評価した。骨髄細胞などの増殖の速い細胞を想定してがん細胞である PANC-1 を用いた細胞生存率の検討を実施し、それに続いて正常細胞 GM05659 を用いた細胞生存率の検討を行った。

### 1) 膵臓がん細胞株 PANC-1 を用いた検討

前項において栄養飢餓条件における抗がん活性が見出された 5 種類の化合物 (9, 11-14) を用いて、それらを富栄養条件 (通常培地である DMEM を使用) で 72 時間処置した PANC-1 の細胞生存率を評価することで検討した。その結果、化合物 11-14 は栄養飢餓条件と同様に、富栄養条件においても細胞毒性を発揮した ( $IC_{50} = 7.1-16.9 \mu M$ )。これらの化合物は、既存薬である gemcitabine ( $IC_{50} = 23.5 \mu M$ ) を上回る強力な細胞毒性を示した。それに対し、化合物 9 は富栄養状態における細胞毒性が認められず ( $IC_{50} > 80 \mu M$ )、栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を示すことが示唆された (Table 2)。

**Table 2.** 化合物 **9, 11–14** および既存薬 (5-FU, GEM) が富栄養条件で示す細胞毒性および栄養飢餓条件で示す活性との比較

No.	IC <sub>50</sub> [μM]	
	富栄養条件	栄養飢餓条件 (再掲)
	72 h	24 h
<b>9</b>	> 80	4.1 ± 0.3
<b>11</b>	7.1 ± 0.3	1.5 ± 0.1
<b>12</b>	14.3 ± 1.3	3.6 ± 0.5
<b>13</b>	16.9 ± 0.4	5.4 ± 0.8
<b>14</b>	7.7 ± 0.4	9.6 ± 0.1
<b>5-FU</b>	3.2 ± 0.3	> 200
<b>GEM</b>	23.5 ± 3.1	> 200

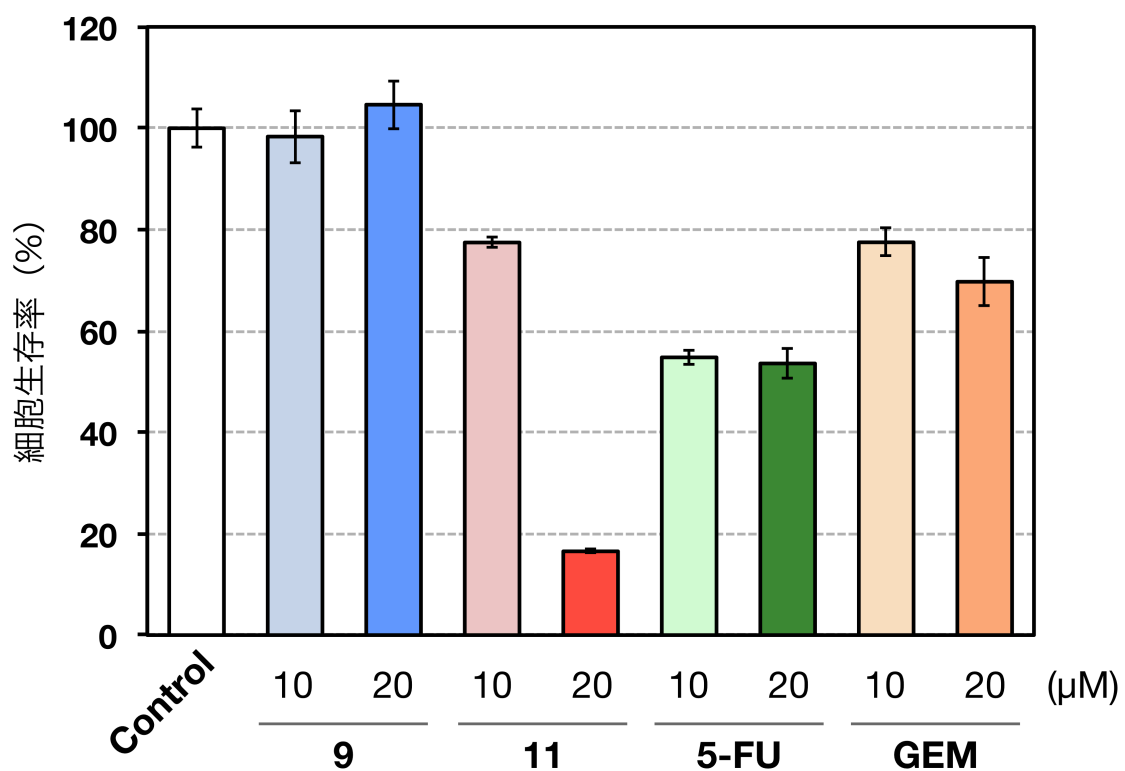
値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)

5-FU; 5-fluorouracil, GEM; gemcitabine

## 2) 正常細胞株 GM05659 を用いた検討

前項で富栄養状態において PANC-1 に細胞毒性を示さなかった化合物 **9** について、正常細胞を用いて富栄養状態における作用をより詳細に検討した。比較対象として、栄養飢餓条件と富栄養条件の両方で最も強力な細胞毒性を示した化合物 **11**、そして既存薬である gemcitabine と 5-fluorouracil を選択した。これらの化合物を 10 または 20  $\mu$ M で 72 時間処置したところ、化合物 **9** は細胞毒性を示さなかったのに対し、選択性を有さない化合物 **11**、既存薬である gemcitabine, 5-fluorouracil においては、程度の差はあるものの細胞毒性が発現した (Figure 18)。

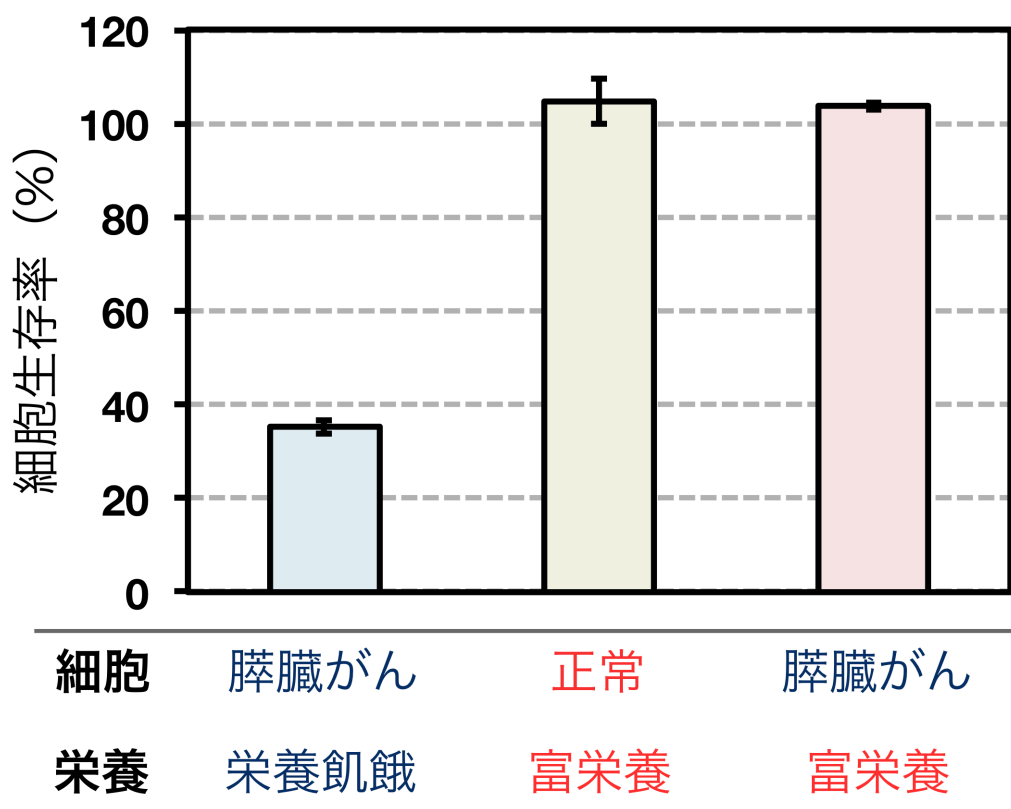
これらの結果から、化合物 **9** は栄養飢餓条件選択的に抗がん活性を示すことに加え、富栄養条件では増殖の早い PANC-1、そして正常細胞である GM05659 に対して毒性を示さないことが明らかとなった (Figure 19)。



**Figure 18.** 正常細胞に対する細胞毒性

ヒト正常線維芽細胞 GM05659 に通常培地条件下で 10 または 20  $\mu\text{M}$  の化合物 **9**, 化合物 **11**、5-fluorouracil (5-FU)、gemcitabine (GEM) を 72 時間処置し、細胞生存率を MTT 法で評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n = 3$ )。

5-FU; 5-fluorouracil, GEM; gemcitabine



**Figure 19.** 化合物 9 は栄養飢餓選択的な抗がん活性を示す

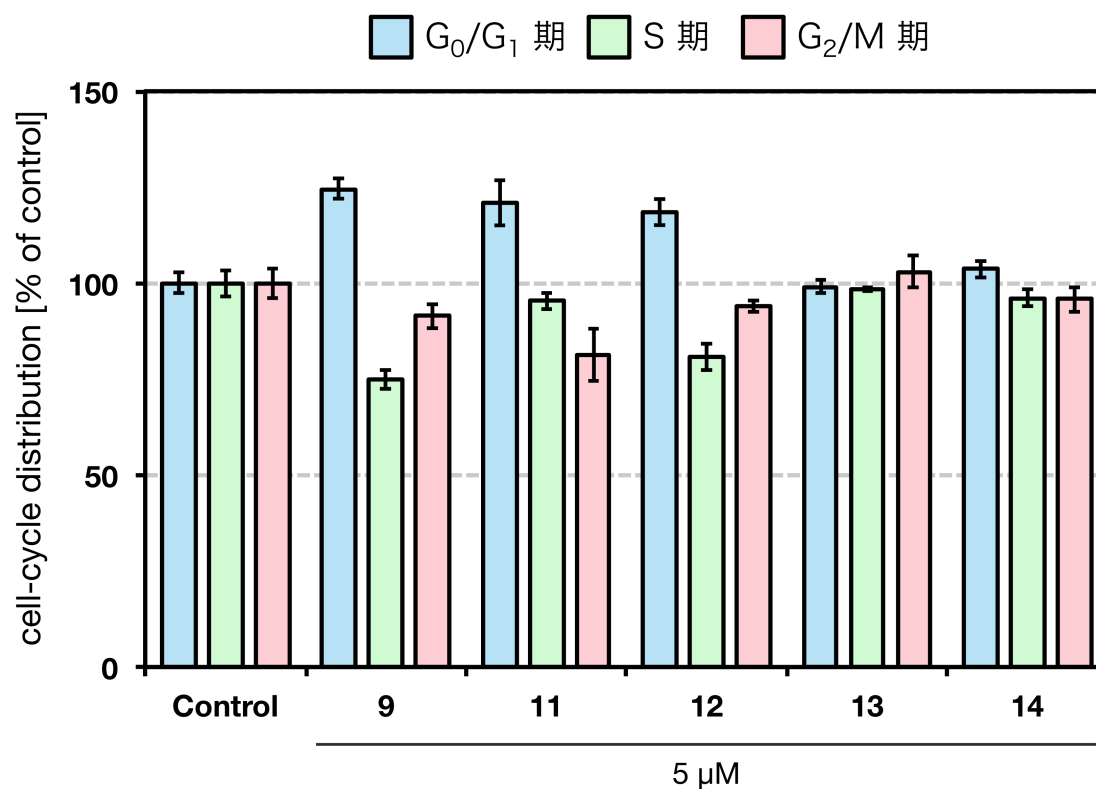
ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 またはヒト正常細胞 GM05659 に対して 20  $\mu$ M の化合物 9 を 24 時間（膵臓がん・栄養飢餓条件）または 72 時間（富栄養条件）処置し、細胞生存率を MTT 法で評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した（n = 3）。

## 2－3. 細胞周期に与える作用およびその栄養飢餓選択性の評価

前項までの検討では、化合物処置後の細胞生存率によって抗がん活性を評価してきた。本項では、細胞生存率以外の尺度による評価を追加すること、そして細胞に与える作用機序に関する知見を得ることを目的として、化合物処置が細胞周期に与える作用を検討した。本項の評価においても、正常細胞への作用を回避する観点から、富栄養条件における作用の検討を合わせて行った。

### 1) 栄養飢餓条件における作用の検討

まず、これまでの検討によって栄養飢餓条件における抗がん活性が見出された5種類のアゾベンゼン誘導体 (**9**, **11–14**) が細胞周期に対して与える作用の検討を行った。栄養飢餓条件下で各化合物 5  $\mu$ M で 24 時間処置した細胞を propidium iodide 染色の後にフローサイトメトリーで分析したところ、化合物 **9**, **11**, **12** 処置群では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞の割合が対照群と比較して増加し (各 125, 121, 118 %)、化合物 **13**, **14** 処置群では細胞周期の変動が生じさせないという結果を得た (Figure 20)。



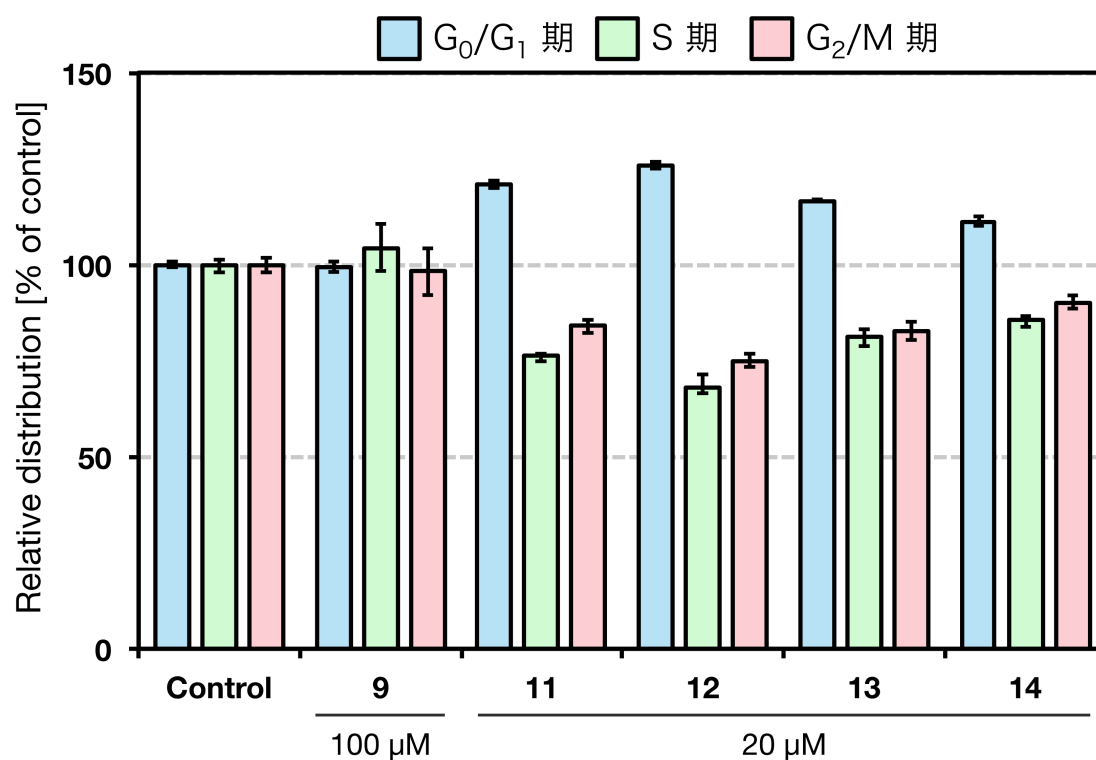
**Figure 20.** アゾベンゼン誘導体が栄養飢餓条件で細胞周期に与える作用  
PANC-1 に対して化合物 9, 11–14 (5 μM) を栄養飢餓条件下で 24 時間処置し、  
各細胞周期の割合をフローサイトメトリーによって評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。



## 2) 富栄養条件における作用の検討

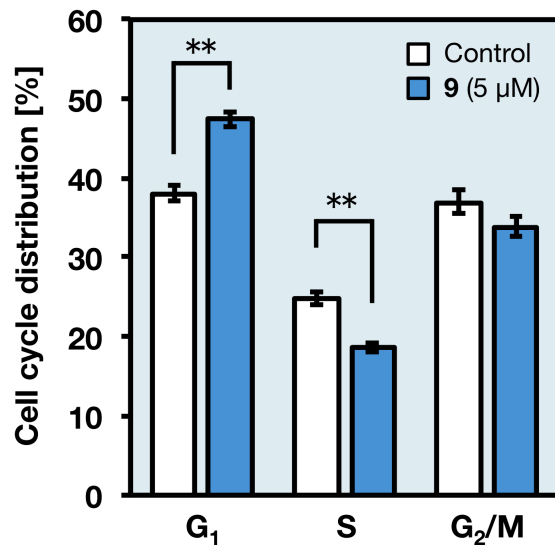
本項では、細胞毒性の検討と同様に、富栄養状態における各化合物の作用を評価し、特に化合物 **9** が細胞周期に対して与える作用は抗がん活性と同様の栄養飢餓条件選択性を有しているか、検討を行った。その結果、化合物 **11-14** 処置群では 20  $\mu$ M において G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の細胞の割合を増加させた (111-126 %) のに対し、化合物 **9** 処置群では 100  $\mu$ M においても細胞周期の変動は認められなかった (Figure 21)。

前項の栄養飢餓条件における検討結果と合わせて、化合物 **9** の栄養飢餓条件選択的に細胞周期を G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止させる作用が見出された (Figure 22)。さらに、抗がん活性および細胞毒性の検討結果を踏まえると、化合物 **9** が示す抗がん活性は G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止によって生じている可能性についても示唆された。



**Figure 21.** アゾベンゼン誘導体が富栄養条件で細胞周期に与える作用  
PANC-1 に対して化合物 9 (100 μM) および化合物 11–14 (20 μM) を富栄養条件下で 24 時間処置し、各細胞周期の割合をフローサイトメトリーによって評価した。値は平均値 ± 標準誤差で示した (n = 3)。

A) 栄養飢餓条件



B) 富栄養条件

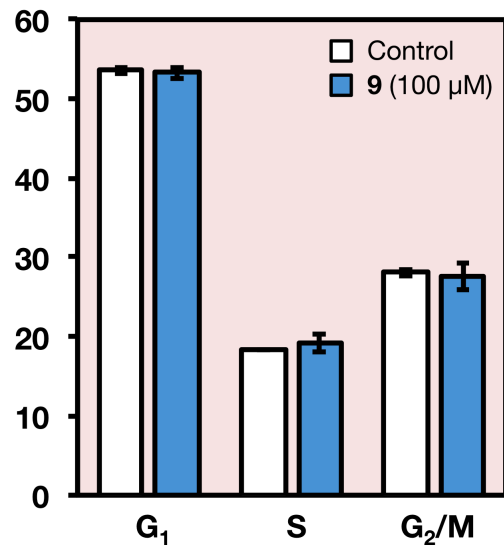


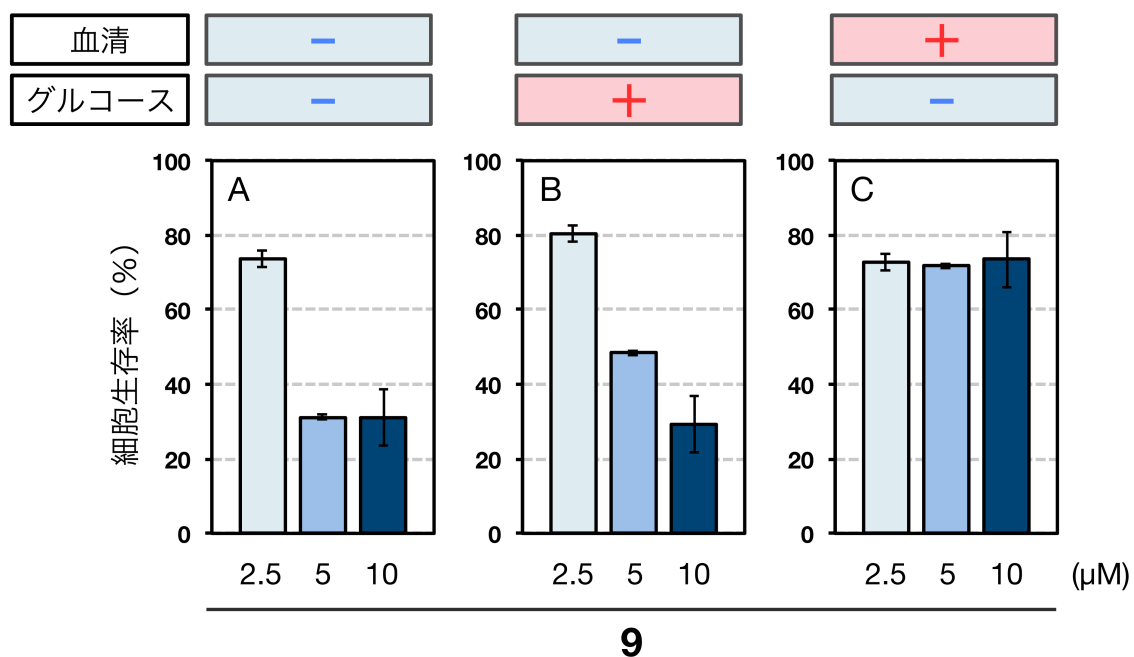
Figure 22. 化合物 9 は栄養飢餓条件選択的に G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止を生じさせる

\*\*,  $p < 0.01$  vs control (Welch's t-test).

#### 2-4. 血清またはグルコース添加条件における活性の評価

これまでの検討では「栄養飢餓条件」を血清、アミノ酸、そしてグルコースが全て欠乏している状態として生物活性評価を行ってきた。本項では、栄養飢餓培地に血清あるいはグルコースを添加した状態で抗がん活性を評価し、活性の変動は生じるかどうかを検討した。また、これまで報告されている化合物が示す活性の変動と比較することで、作用機序に関する知見を得ることを目指した。

血清、アミノ酸、そしてグルコースが全て欠乏している条件で抗がん活性を示し、これらが全て存在する条件では活性を示さないという特徴を有する化合物 **9** について、栄養飢餓培地に血清またはグルコースを富栄養培地と同じ含有量となるように添加し、抗がん活性の評価を行った。その結果、2.5–10  $\mu\text{M}$  における検討では、グルコースの添加では作用の減弱は生じないものの、血清の添加によって作用の減弱が認められた (Figure 23)。



**Figure 23.** 血清またはグルコース添加が化合物 **9** の作用に与える影響  
 ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 に対して 2.5, 5, 10  $\mu\text{M}$  の化合物 **9** を栄養飢餓条件  
 (A)、グルコース添加条件 (B)、血清添加条件 (C) で 24 時間処置し、細胞生  
 存率を MTT 法で評価した。値は平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n=3$ )。

### 3. 考察

本研究では、血清、アミノ酸、そしてグルコースが存在しない栄養飢餓条件において、複数のアゾベンゼン誘導体が抗がん活性を示すことを明らかにした。栄養飢餓条件では既存の抗悪性腫瘍薬は効果を発揮しないことを踏まえると、栄養飢餓条件における抗がん活性が見出されたアゾベンゼン誘導体は、新規抗悪性腫瘍薬となる可能性を有しており、アゾベンゼン誘導体の応用可能性に関して新たな知見を示すことに成功した。

副作用の回避を指向して実施した富栄養条件における細胞毒性評価では、栄養飢餓選択的な作用を示す化合物 **9** を見出すことに成功した。富栄養条件で活性を発揮しないことは、正常細胞に対する毒性を回避し副作用の軽減につながる一方で、全てのがん細胞が栄養飢餓状態にあるわけではないことから、単独では治療不良につながる可能性を有している。そのため、富栄養状態において抗がん活性を示す、副作用の少ない抗悪性腫瘍薬と併用することで効果的かつ安全な膵臓がん治療につながると考えられる。

栄養飢餓条件と富栄養条件の両方で細胞毒性が見出された化合物に関してもその応用可能性は存在すると考えられる。例えば化合物 **11** は栄養飢餓条件では既存薬にはない活性を示し ( $IC_{50} = 1.5 \mu M$ )、さらに、富栄養条件では既存薬である gemcitabine ( $IC_{50} = 23.5 \mu M$ ) を上回る強力な細胞毒性を示し ( $IC_{50} = 7.1 \mu M$ )、栄養の存在に依存しない強力な作用を有していることが明らかとなった。富栄養条件における細胞毒性は正常細胞に対して悪影響を与えることから、何らかの方法でがん細胞に対する選択性を高めることが必要であり、その方法のひとつとしてアゾベンゼンが有する光異性化による活性制御の試みが有用な手段であると考えられる。光を用いた化合物の活性制御は近年注目を集めており<sup>[58,59]</sup>、更なる検討は必要であるが、膵臓がん治療の「光」となる新たな知見がもたらされる可能性もあるだろう。

これらの化合物に共通して、今回の検討では化合物の濃度を高めても細胞生存率を 0% にすることはできなかった。実験的な問題の可能性もあり、推測の域を出ないが、栄養飢餓条件下にある細胞は一樣ではなく、一定程度の割合で今回検討を行った化合物が作用を発揮しない状態にあるという可能性がある。

栄養飢餓選択的な作用が見出された化合物 **9** は、栄養飢餓状態選択的に細胞周期を G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期で停止させることが明らかとなり、化合物の作用機序に関する知見を得ることに成功した。しかし、作用機序を明らかとするためにはこの知見のみでは不十分である。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止はがん治療の分野において標的として注目されているが<sup>[60]</sup>、第 1 章で着目した p21 など極めて多くの標的分子が存在していることから、本研究で得られた結果のみで論じることは困難である。細胞周期の評価は生細胞に限られていることから、栄養飢餓状態において細胞周期が G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期以外にある細胞に対して抗がん活性を示し、相対的に割合が上昇している可能性も否定はできない。細胞死の様式についても、バックグラウンドで生じる細胞死の影響が大きく、化合物処置による影響を評価するには至っていない。化合物 **9** の作用機序は栄養飢餓条件に対する選択性が生じた理由と密接に関連していると考えられることから、今後の検討による作用機序の解明が期待される。

また、栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を示す化合物 **9** を用いて、血清およびグルコースの存在が与える影響の検討を行った結果、化合物 **9** の作用はグルコース飢餓には依存せず、血清飢餓に依存している可能性が示された。これまでの研究で見出された化合物において同様の検討が行われているものがあり、例えば、kigamycin D<sup>[47]</sup>や arctigenin<sup>[51]</sup>ではグルコース欠乏状態が、grandifloracin<sup>[43]</sup>では血清およびグルコース欠乏状態が抗がん活性の発現に重要であると報告されている。アルブミンの関与に関する評価など、今後より詳細な検討は必要であるが、血清飢餓に依存する化合物 **9** は kigamycin D や arctigenin、そして grandifloracin とは異なる作用様式を有している可能性についても今回の検討で示された。

## 4. 結論

本研究によって以下の知見を得ることに成功した。

- ・ 既存薬が効果を発揮しない栄養飢餓条件において、複数のアゾベンゼン誘導体が抗がん活性を示す
- ・ 栄養飢餓条件における抗がん活性が見出された化合物のひとつである 3,3'-di(2-hydroxynaphthyl)-6,6'-dimethylazobenzene (**9**) は、富栄養条件では細胞毒性を示さず、栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を示す
- ・ 化合物 **9** は栄養飢餓条件選択的に G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期停止を生じさせる
- ・ 化合物 **9** が示す抗がん活性は血清飢餓に依存する

以上の結果は、既存薬が効果を発揮しない栄養飢餓条件において、これまで十分に検討されていなかったアゾベンゼン誘導体の応用可能性に関して、新規かつ有用な知見を与えるものである。さらに、化合物 **9** が示す栄養飢餓選択的な抗がん活性は副作用回避にも繋がると考えられ、新規抗悪性腫瘍薬として有望な特性を有する化合物を見出すことにも成功した。これらの知見を基に、治療困難である膵臓がんに対して新たな治療の選択肢が提供されることを期待する。



## 5. 実験方法

### 5-1. 被験化合物

実験に用いたアゾベンゼン誘導体は、今堀 龍志 博士（東京理科大学工学部）から提供されたものを用いた。

### 5-2. 細胞培養

ヒト膵臓がん由来細胞株 PANC-1 は、倉島 由紀子 博士（北陸大学薬学部）から供与を受けた。PANC-1 は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan) に heat-inactivated bovine serum (BS; Thermo Fischer Scientific, MA, USA, 終濃度 10 %)、non-essential amino acids (FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan)、penicillin-streptomycin (Thermo Fischer Scientific, MA, USA, 各終濃度 100 U/mL, 100 µg/mL) を添加した培地を用いて培養を行なった。

正常細胞として使用したヒト皮膚由来線維芽細胞株 GM05659 は、Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ, USA) より購入した。GM05659 は Eagle's minimum essential medium (EMEM; FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan) に heat-inactivated bovine serum (BS; Thermo Fischer Scientific, MA, USA, 終濃度 15 %)、および penicillin-streptomycin (Thermo Fischer Scientific, MA, USA, 各終濃度 100 U/mL, 100 µg/mL) を添加した培地を用いて培養を行なった。

全ての培養は、37 °C かつ 5 % CO<sub>2</sub> 条件に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター (MCO-175M, SANYO, Tokyo, Japan) 内で実施した。細胞の洗浄には、Ca<sup>2+</sup>および Mg<sup>2+</sup>をどちらも含まない phosphate buffered saline (PBS) を用いた。PBS は蒸留水 1 L 中に KCl 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 28.8 g, および NaCl 200 g を含む PBS (25×)を調製し、それを蒸留水で 25 倍希釈することによって調整した。PBS の調製に用いた試薬は FUJIFILM WAKO Pure Chemical (Osaka, Japan)より購入した。

### 5-3. 栄養飢餓培地

栄養飢餓条件での実験は、栄養飢餓培地 (nutrient-deprived medium; NDM) を用いて行った。本論文中における NDM の定義は「グルコース、アミノ酸、および血清を含有していない培地」とし、組成は Izuishi らの方法<sup>[42]</sup>を用いて調製した。また、血清またはグルコースを添加して検討を行う際は、通常培地と同じ終濃度となるように heat-inactivated bovine serum (BS; Thermo Fischer Scientific, MA, USA, 終濃度 10 %) または D-glucose solution (FUJIFILM WAKO Pure Chemical, Osaka, Japan, 終濃度 4.5 g/L) を添加して用いた。

### 5-4. 細胞生存率の評価

細胞生存率は MTT 法を用いて評価した。被験化合物は全て dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶解させて用いた。PANC-1 細胞を 96-well プレートに  $1.0 \times 10^4$  cells/well の密度で播種し、24 時間の前培養を行った。前培養終了後、培養上清を捨てて、200  $\mu$ L の PBS で洗浄を 2 回行った。洗浄後、種々の濃度の被験化合物を溶解させた通常培地 (DMEM) または栄養飢餓培地 (NDM) を最終的な量が 200  $\mu$ L/well となるように添加して、インキュベーター内で培養を行った。24 時間または 72 時間の培養終了後、PBS で 2.0 mL/mg となるように調製した MTT (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を各 well に 20  $\mu$ L 加えて、インキュベーター内で 4 時間 呈色反応をさせた。反応終了後、培養上清を吸引除去し、DMSO を 200  $\mu$ L/well 加えてピペッティングを行い、生成したホルマザンの結晶を溶解させた。540 nm における吸光度は、FilterMAX F5 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) を用いて測定した。

各測定点におけるコントロールを生存率 100 %としたとき、サンプル処置群の細胞生存率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{細胞生存率 [\%]} = [(A_{\text{サンプル}} - A_{\text{ブランク}}) / (A_{\text{コントロール}} - A_{\text{ブランク}})] \times 100$$

上式において、A は 540 nm における吸光度を、添字はそれぞれがサンプル添加、コントロール、あるいはブランクの吸光度であることを示している。測定は 3 つの独立したウェルについて行った (n = 3)。

#### 5-5. フローサイトメトリーによる細胞周期の評価

PANC-1 細胞を 6-well プレートに  $2.0 \times 10^5$  cells/well の密度で播種し、24 時間前培養を行なった。前培養終了後 PBS で洗浄し、アゾベンゼン誘導体を溶解させた通常培地 (DMEM) または栄養飢餓培地 (NDM) を添加して 24 時間培養した後、trypsin-EDTA (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて回収した。回収後、2 %の BS を含む PBS (PBS-BS) で 2 回洗浄を行った。その後、 $-20^{\circ}\text{C}$  で予冷した 70 % ethanol (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を加えて、 $-20^{\circ}\text{C}$  で一晩固定した。固定した細胞は、PBS-BS で 2 回洗浄を行い、0.25 mg/mL RNase (Nacalai Tesque Inc, Kyoto, Japan) 溶液で再懸濁の後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 15 分反応させた。反応終了後、propidium iodide (PI; FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を終濃度が  $50\text{ }\mu\text{g/mL}$  となるように加え、 $4^{\circ}\text{C}$ 、遮光条件下で 30 分染色した。染色終了後、サンプルは測定直前に  $35\text{ }\mu\text{m}$  ナイロンメッシュ (Corning, NY, USA) を通して測定に供した。測定および解析は FACS Celesta および FACSDiva (version 9.0; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて行った。

## 結言

以上の検討により、第 1 章では ginnalin B がヒト表皮における分化を促進することを示し、皮膚に対する有益性と応用性を有していることを明らかにした。また、第 2 章では 3,3'-di(2-hydroxynaphthyl)-6,6'-dimethylazobenzene が栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を示すことを示し、難治性である膵臓がんに対する新規抗悪性腫瘍薬としての応用可能性を有していることを明らかとした。

今回実施した生物活性の評価によって、検討した化合物の応用性を示すことに成功した。本研究によって得られた結果は、表皮に関連した化粧品開発および膵臓がんに関連した医薬品開発に対して有益な知見を与えるものであると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、長きにわたりご指導いただきました足立 伊佐雄前教授ならびに加藤 敦 教授に心より感謝いたします。本研究で使用した化合物をご提供いただいた石川 文博 博士（株式会社伏見製薬所）ならびに今堀 龍志 准教授（東京理科大学工学部）、そして細胞をご提供いただいた倉島 由紀子 講師（北陸大学薬学部）に厚く御礼申し上げます。また、所属研究室である富山大学附属病院薬剤部研究室の皆様には様々な場面でご支援をいただきました。その他にも、多くの方に励ましを頂くことによって本研究を進めることができました。ありがとうございました。

最後に、富山での長期間の学生生活を見守ってくれた家族に、心から感謝します。

## 参考文献

- [1] K. Kabashima, T. Honda, F. Ginhoux, G. Egawa, *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 19–30.
- [2] J. A. Bouwstra, M. Poncet, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, *1758*, 2080–2095.
- [3] M. Yang, M. Zhou, L. Song, *J. Cosmet. Dermatol.* **2020**, *19*, 3199–3204.
- [4] M. H. Meckfessel, S. Brandt, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2014**, *71*, 177–184.
- [5] G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano, *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 523–6.
- [6] Q. Li, H. Fang, E. Dang, G. Wang, *J. Dermatol. Sci.* **2020**, *97*, 2–8.
- [7] International Society of Rare Sugars, “Definition of Rare Sugars,” can be found under <http://www.isrs.kagawa-u.ac.jp/definition.html>
- [8] T. Hatano, S. Hattori, Y. Ikeda, T. Shingu, T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1990**, *38*, 1902–1905.
- [9] A. Honma, T. Koyama, K. Yazawa, *Food Chem.* **2010**, *123*, 390–394.
- [10] A. González-Sarriás, T. Yuan, N. P. Seeram, *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1369–1376.
- [11] C. Wan, T. Yuan, L. Li, V. Kandhi, N. B. Cech, M. Xie, N. P. Seeram, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 597–600.
- [12] H. Ma, L. Wang, D. B. Niesen, A. Cai, B. P. Cho, W. Tan, Q. Gu, J. Xu, N. P. Seeram, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 107904–107915.
- [13] A. Kamori, A. Kato, S. Miyawaki, J. Koyama, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, D. Miura, F. Ishikawa, I. Adachi, *Tetrahedron Asymmetry* **2016**, *27*, 1177–1185.
- [14] S. Iuchi, S. Dabelsteen, K. Easley, J. G. Rheinwald, H. Green, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 1792–1797.
- [15] T. Hashida, S. Yasumoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *172*, 958–964.
- [16] E. Fuchs, *J. Cell Sci.* **1993**, *1993*, 197–208.
- [17] H. Niehues, J. A. Bouwstra, A. El Ghalbzouri, J. M. Brandner, P. L. J. M. Zeeuwen, E. H. van den Bogaard, *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 501–511.

- [18] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 127–152.
- [19] G. Fotakis, J. A. Timbrell, *Toxicol. Lett.* **2006**, *160*, 171–177.
- [20] N. Atale, S. Gupta, U. C. S. Yadav, V. Rani, *J. Microsc.* **2014**, *255*, 7–19.
- [21] A. Slobodnick, B. Shah, M. H. Pillinger, S. Krasnokutsky, *Am. J. Med.* **2015**, *128*, 461–470.
- [22] S. Waga, G. J. Hannon, D. Beach, B. Stillman, *Nature* **1994**, *369*, 574–8.
- [23] B. Shamloo, S. Usluer, *Cancers (Basel)*. **2019**, *11*, 1–19.
- [24] C. Missero, E. Calautti, R. Eckner, J. Chin, L. H. Tsai, D. M. Livingston, G. P. Dotto, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 5451–5455.
- [25] C. Missero, F. Di Cunto, H. Kiyokawa, A. Koff, G. P. Dotto, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 3065–75.
- [26] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131–149.
- [27] M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 153–166.
- [28] U. Nguyen, N. Squaglia, A. Boge, P. A. Fung, *Nat. Methods* **2011**, *8*, v–vi.
- [29] T. Borggreffe, F. Oswald, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 1631–1646.
- [30] A. Rangarajan, C. Talora, R. Okuyama, M. Nicolas, C. Mammucari, H. Oh, J. C. Aster, S. Krishna, D. Metzger, P. Chambon, L. Miele, M. Aguet, F. Radtke, G. P. Dotto, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3427–3436.
- [31] R. Okuyama, H. Tagami, S. Aiba, *J. Dermatol. Sci.* **2008**, *49*, 187–194.
- [32] Y. Uchida, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 453–462.
- [33] S. A. Summers, B. Chaurasia, W. L. Holland, *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 1051–1058.
- [34] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [35] Ministry of Health Labour and Welfare, *Cancer Registry and Statistics.*, **2019**.
- [36] Y. T. Lee, Y. J. Tan, C. E. Oon, *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196.
- [37] P. Darwin, S. M. Toor, V. Sasidharan Nair, E. Elkord, *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–11.
- [38] J. D. Mizrahi, R. Surana, J. W. Valle, R. T. Shroff, *Lancet* **2020**, *395*, 2008–

2020.

- [39] P. Rawla, T. Sunkara, V. Gaduputi, *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 10–27.
- [40] V. Vaccaro, I. Sperduti, M. Milella, *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 768–769.
- [41] S. Li, H. X. Xu, C. T. Wu, W. Q. Wang, W. Jin, H. L. Gao, H. Li, S. R. Zhang, J. Z. Xu, Z. H. Qi, Q. X. Ni, X. J. Yu, L. Liu, *Angiogenesis* **2019**, *22*, 15–36.
- [42] K. Izuishi, K. Kato, T. Ogura, T. Kinoshita, H. Esumi, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 6201–7.
- [43] J. Ueda, S. Athikomkulchai, R. Miyatake, I. Saiki, H. Esumi, S. Awale, *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 39–47.
- [44] M. Piffoux, E. Eriau, P. A. Cassier, *Br. J. Cancer* **2020**, 1–12.
- [45] S. E. Kim, H. J. Park, H. K. Jeong, M. J. Kim, M. Kim, O. N. Bae, S. H. Baek, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *463*, 205–210.
- [46] S. Fujii, S. Mitsunaga, M. Yamazaki, T. Hasebe, G. Ishii, M. Kojima, T. Kinoshita, T. Ueno, H. Esumi, A. Ochiai, *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1813–1819.
- [47] J. Lu, S. Kunitomo, Y. Yamazaki, M. Kaminishi, H. Esumi, *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 547–552.
- [48] H. Esumi, J. Lu, Y. Kurashima, T. Hanaoka, *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 685–690.
- [49] A. M. Tawila, S. Sun, M. J. Kim, A. M. Omar, D. F. Dibwe, J. Ueda, N. Toyooka, S. Awale, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127352.
- [50] B. E. Alexander, S. Sun, M. J. Palframan, G. Kociok-Köhn, D. F. Dibwe, S. Watanabe, L. Caggiano, S. Awale, S. E. Lewis, *ChemMedChem* **2020**, *15*, 125–135.
- [51] S. Awale, J. Lu, S. K. Kalauni, Y. Kurashima, Y. Tezuka, S. Kadota, H. Esumi, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 1751–1757.
- [52] M. Ikeda, A. Sato, N. Mochizuki, K. Toyosaki, C. Miyoshi, R. Fujioka, S. Mitsunaga, I. Ohno, Y. Hashimoto, H. Takahashi, H. Hasegawa, S. Nomura, R. Takahashi, S. Yomoda, K. Tsuchihara, S. Kishino, H. Esumi, *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1818–1824.



- [53] P. Kulkarni, M. K. Haldar, F. Karandish, M. Confeld, R. Hossain, P. Borowicz, K. Gange, L. Xia, K. Sarkar, S. Mallik, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 12490–12494.
- [54] T. Imahori, R. Yamaguchi, S. Kurihara, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 10802–10807.
- [55] M. J. Fuchter, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11436–11447.
- [56] M. Lieber, J. Mazzetta, W. Nelson - Rees, M. Kaplan, G. Todaro, *Int. J. Cancer* **1975**, *15*, 741–747.
- [57] J. Crawford, D. C. Dale, G. H. Lyman, *Cancer* **2004**, *100*, 228–237.
- [58] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55*, 10978–10999.
- [59] I. M. Welleman, M. W. H. Hoorens, B. L. Feringa, H. H. Boersma, W. Szymański, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691.
- [60] A. Recasens, L. Munoz, *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40*, 128–141.