

がん細胞内への還元型ビタミン K<sub>2</sub> の送達法とその効果に関する研究  
Novel Approach for Intracellular Delivery and Enhanced Antitumor Effects of  
Vitamin K<sub>2</sub> Hydroquinone into Cancer Cells

2014 年 3 月  
(2015 年 1 月改訂)

福岡大学大学院 薬学研究科 薬学専攻  
博士課程後期 PD110504

瀬戸口 修一  
Shuichi Setoguchi

## 目次

### 緒論

### 本論

#### 第一章 Menahydroquinone-4 1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate HCl (MKH-DMG)による des- $\gamma$ -carboxyl prothrombin (DCP) 陽性および陰性肝細胞癌 (HCC) 細胞への menahydroquinone-4 (MKH) の送達性

##### 第一節 LC/MS-MS による細胞内 MKH-DMG, MK-4, MKO の測定

##### 第二節 HCC 細胞内への MKH 送達性に及ぼす MKH-DMG 処理時間の影響

##### 第三節 細胞内 MKH 送達性に及ぼす MKH-DMG の用量変化

##### 第四節 MKO 処理による MKO 取込みと MK-4 生成評価による HCC 細胞中の vitamin K cycle 構成還元酵素の能力評価

##### 小括

#### 第二章 MKH-DMG の HCC 細胞株に対する抗腫瘍効果

##### 小括

#### 第三章 MKH-DMG の HCC 細胞株に対する増殖抑制作用機構

##### 第一節 HCC 細胞の細胞周期に及ぼす MKH-DMG の影響

##### 第二節 HCC 細胞に対する MKH-DMG によるアポトーシス誘導

##### 第三節 DCP 陽性 HCC に対する MKH-DMG の DCP 産生抑制効果

##### 小括

#### 第四章 DCP 陽性 HCC 細胞株の脾-肝転移モデルマウスを用いた MKH-DMG 経口投与における抗腫瘍効果 (*in vivo* 評価)

##### 第一節 MKH-DMG 強制経口投与後のマウス体内動態

##### 第二節 MKH-DMG 飲水投与による肝転移 (増殖) 抑制効果

##### 小括

#### 第五章 DCP 陽性 HCC 細胞株への MKH 送達性および増殖抑制効果に及ぼす MKH ester type prodrug の promoiety の影響

##### 第一節 HCC 細胞への MKH 送達過程に及ぼす MKH ester type prodrug の promoiety の影響

## 第二節 HCC 細胞に対する MKH ester type prodrug の増殖抑制効果に及ぼす promoiety の影響

小括

総括

実験の部

引用文献

謝辞

## 緒論

肝癌は世界のがん発症の第五位であり、死亡率は第三位を占め死者は年間 695,000 人に上る(1). 肝細胞癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC) は肝癌の約 70-85%を占め(2), B 型および C 型肝炎ウイルスへの慢性的感染やアルコール性肝障害の結果による肝硬変から主として起こる(3, 4). HCC の罹患率はアジアばかりでなく、ヨーロッパやアメリカ合衆国においても増加し続けている. HCC 治療における最近の進歩は HCC 患者の予後を有意に改善しているが、全生存率の改善には未だ不十分である. その理由は、肝切除や経皮的ラジオ波焼灼術などの根治療法後でさえ HCC が頻繁に再発するためである(5). HCC の高頻度の再発は肝内転移と多中心性の発癌によるものである.

現在、化学療法剤に用いられている薬物を化学予防剤として用いることは副作用の面からやはり不十分である. HCC 患者の予後改善にインターフェロン(6, 7)やソラフェニブ(8, 9)が供給されている. しかし、これらの治療薬の肝硬変患者への長期投与においてしばしば重篤な副作用が生じている(10, 11). 有効な化学予防剤を開発するために選択可能な 1 つの方法は、化学予防剤としての活性を持ち長期投与における安全性が保証された、臨床に応用できる化合物を発見することである.

Vitamin K<sub>2</sub> の一種である menaquinone-4 (MK-4) が複数の HCC 細胞種に対して増殖制御できることが、*in vitro* や *in vivo* の研究において明らかにされている(12-17). MK-4 は骨粗鬆症治療薬として広く用いられており、その長期投与の安全性が確認されている(18-21). もし、MK-4 が原発性発癌や癌増殖を抑制することで HCC の再発を抑制できるなら、MK-4 は理想的な化学予防剤となる. このような背景から臨床試験が行われ、小規模の臨床試験では、MK-4 が肝硬変患者における *de novo* 発癌を抑制し(22)、外科的切除あるいは焼灼術後の HCC 再発を抑制した(23). しかしながら、最近の大規模なプラセボ対照無作為化二重盲検試験において、HCC の再発累積値に対して MK-4 はいかなる抑制効果も示し得なかった(24).

一方で、HCC 組織におけるビタミン K レベルが周りの正常肝組織に比して低く、特に menaquinone 類が著しく低下していることが報告されている(25)。また、他の報告は、diethylnitrosamine で惹起した肝臓小結節 HCC 細胞の MK-4 の取込み速度が正常肝細胞の速度に比べて有意に低いことを示している(26)。

Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) はカルボキシ化が不完全な異常 prothrombin であり、よく知られた HCC 腫瘍マーカーとして、血管浸潤、転移、再発の指標に用いられている(27-28)。最近の研究では、DCP が HCC の自家製 (autologous) 成長因子であり(29)、癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。DCP 産生は HCC の癌血管新生に寄与しており(30)、これは癌の浸潤や転移に必須のものであり、少なくとも HCC の悲観的な予後に関与している。すなわち、DCP 産生を抑制することは HCC 治療における新薬開発の 1 つの標的であると考えられる(31)。HCC における細胞骨格の変化は、ビタミン K の取込みを阻害して DCP を生成する決定的な機構を担っていることが報告されている(32)。他の報告では、HCC 組織中で vitamin K 欠乏が起こるために DCP 産生を招くとしている(25, 33, 34)。

Vitamin K は prothrombin などの vitamin K 依存性タンパク質の glutamic acid 残基 (Glu) を  $\gamma$ -carboxyglutamic acid 残基 (Gla) に変換させる  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (GGCX) の補因子として知られている(35-37)。GGCX の活性発現は vitamin K の二電子還元体である vitamin K hydroquinone ( $KH_2$ ) に依存しており、 $KH_2$  は vitamin K epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) によって生成される(38)。すなわち、 $KH_2$  の availability がカルボキシ化反応の速度を制御している(39)。以上を包括的に考えると HCC 組織では i) MK-4 の利用性低下あるいは ii) MK-4 の欠乏が起こっていると考えられる。

我々は MK-4 の二電子還元体 (活性体) である menahydroquinone-4 (MKH) を効率的に HCC 細胞に送達することで、i) MK-4 の利用性低下あるいは ii) MK-4 の欠乏を克服でき、その結果 HCC の増殖と転移を制御できると仮説を立て本研究を企図した。

本研究室では、先に MKH の ester type prodrug 化によって、MK-4 から MKH へ

の還元的活性化過程を回避して効率的に MKH を正常肝臓に送達することを可能にし、クマリン系抗凝血剤で vitamin K cycle が強く阻害された出血毒性状態を効率的に克服できることを明らかにしている(40, 41).

本研究では、まず、第一章において MKH の ester type prodrug による DCP 陽性および陰性 HCC 細胞内への MKH の送達性を評価し、MK-4 に比較して HCC 細胞内の MKH レベルを高くできることを明らかにした。すなわち、HCC 細胞においても正常肝臓と同様に MKH を効率よく送達できることを明らかにした。第二章では、MKH ester type prodrug の HCC 細胞株に対する増殖抑制効果を *in vitro* で評価し、MK-4 に比較して優れた増殖抑制効果を有することを明らかにした。また、第三章でその機構検討から増殖抑制効果が MKH に由来することが強く示唆された。第四章では、DCP 陽性 HCC 細胞株を脾-肝転移モデルマウスに移植し *in vivo* における MKH ester type prodrug の効果を評価し、有意に肝臓における腫瘍の発生と増殖ならびに血漿中 DCP レベルを抑制することを明らかにした。第五章では、prodrug の promoiety がカチオン性、中性、アニオン性の 3 種類の MKH エステル誘導体を用いて、HCC 細胞内への MKH の送達性と増殖抑制効果の比較検討から、HCC 細胞に対する高い取込みと MKH への再変換性 (加水分解) に優れた誘導体が、効率的な MKH の送達性ならびに増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

本研究は、世界で初めて HCC 細胞内への MKH の効率的な送達を可能にし、その結果優れた増殖抑制効果を発揮させることを可能にしたものであり、本研究の仮説を強く支持するものであった。

## 本論

第一章 Menahydroquinone-4 1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate HCl (MKH-DMG) による des- $\gamma$ -carboxyl prothrombin (DCP) 陽性および陰性肝細胞癌 (HCC) 細胞への menaquinone-4 (MKH) の送達性

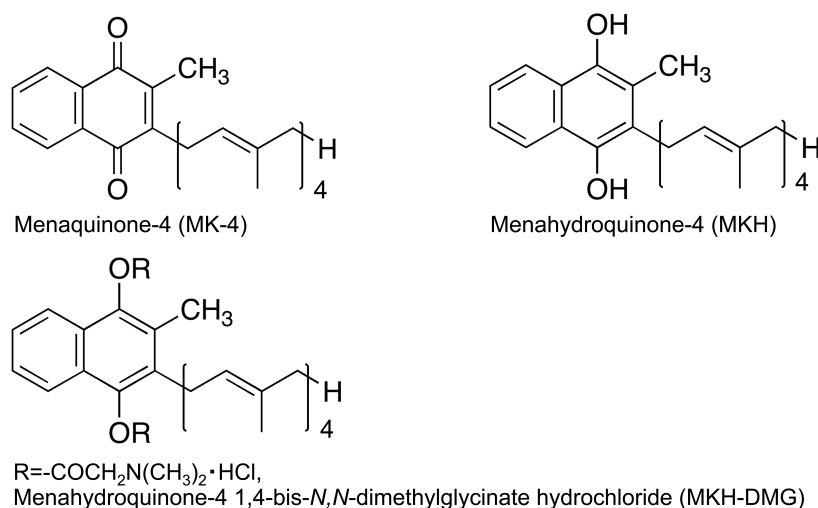


Figure 1-1. Chemical structures of menaquinone-4 (MK-4), menahydroquinone-4 (MKH) and MKH 1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG).

正常肝臓における vitamin K 依存性タンパク質の生成では, MK-4 (Fig. 1-1) は MKH に二電子還元され, MKH (Fig. 1-1) が GGCX の補因子として機能することで vitamin K 依存性タンパク質の前駆体中に存在する複数の Glu 残基を全て Gla 残基に変換する, この時 Gla 残基の生成に対して化学量論的に MKH が MK-4 epoxide (MKO) (Fig. 1-2) に代謝される. MKO が vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) によって MK-4 に還元されることで vitamin K cycle が完成し, MK-4 は効率よく機能している (Fig. 1-2).

HCC 細胞において MKH の送達性を評価するためには, MKH を測定する系が必要である. しかし, MKH 自身は MK-4 へと極めて酸化され易いために MKH を直接測定することは不可能である. DCP 陽性 HCC 細胞に MK-4 を投与すると DCP 濃度が低下することから, vitamin K cycle が機能していることが明らかであ

る. すなわち, DCP 陽性 HCC 細胞内においても GGCX の補因子として機能した MKH は Glu 生成に伴って化学量論的に MKO に代謝されと考えられ, 細胞中の MKO 量は少なくとも細胞内に送達された MKH 量とみなすことができる. 本研究では, MKH のエステル誘導体 menahydroquinone-4 1,4-bis-*N,N*-dimethylglycinate HCl (MKH-DMG) (Fig. 1-1) 投与後の HCC 細胞中の MKH-DMG, MKO, MK-4 濃度の変化から MKH 送達性を評価した.

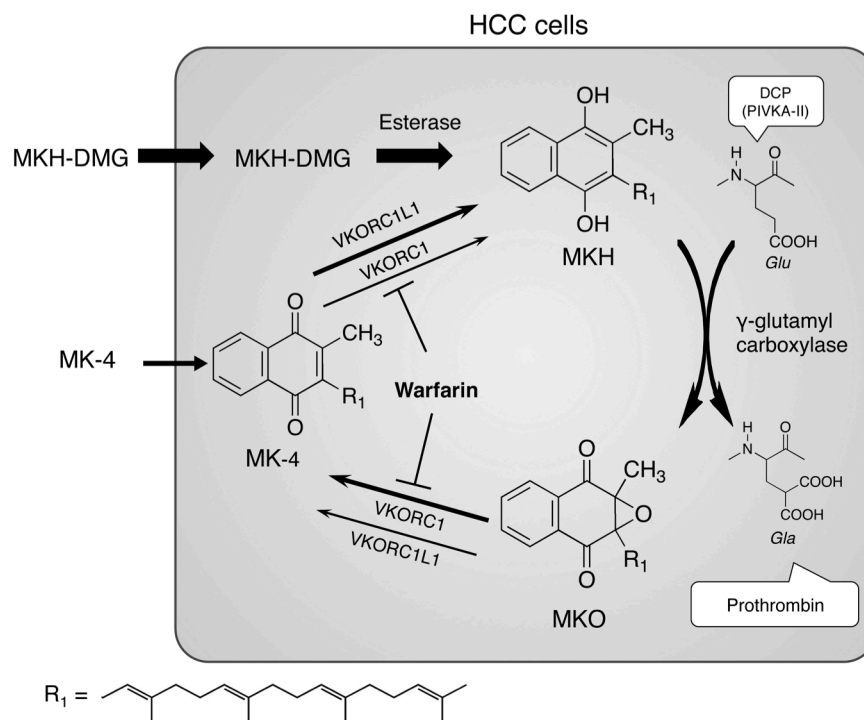


Figure 1-2. Schematic illustration of vitamin K cycle and concept for MKH delivery system.

### 第一節 LC/MS-MS による細胞内 MKH-DMG, MK-4, MKO の測定

HCC 細胞内での MKH-DMG, MK-4, MKO の動態を明らかにするためには、高感度の定量法が必要である。MK-4 および MKO の高感度な分離定量では、HPLC での分離後 post column で各化学種を MKH に還元したのちに蛍光検出する方法が用いられている。Post column 還元法には、Zn カラムによる還元や電気化学セルによる還元方法が用いられている。MK-4 の還元は比較的容易であるが、MKO の還元には強い還元力が必要であるため、いずれの方法でもカラムの速い劣化や電気化学反応セルの速い劣化が欠点となっている。本研究では、LC/MS-MS において APCI 法による MS-MS-multiple reaction monitoring (MRM) モードにより MKH-DMG, MK-4, MKO の高感度かつ高選択的定量法を確立して用いた。MRM の transition ion を Table 1-1 に示し、典型的クロマトグラムを Figure 1-3 に示した。以下に示す細胞内の薬物濃度は細胞タンパク量当りの薬物量 (nmol/mg of protein) で示した。

Table 1-1. Transition ion for MKH-DMG, MK-4, MKO and  $\gamma$ -Tocotrienol.

Compound	ionized form [M+H] <sup>+</sup>	fragment
MK-4	445	187
MKO	461	161
MKH-DMG	617	481
$\gamma$ -Tocotrienol	411	151

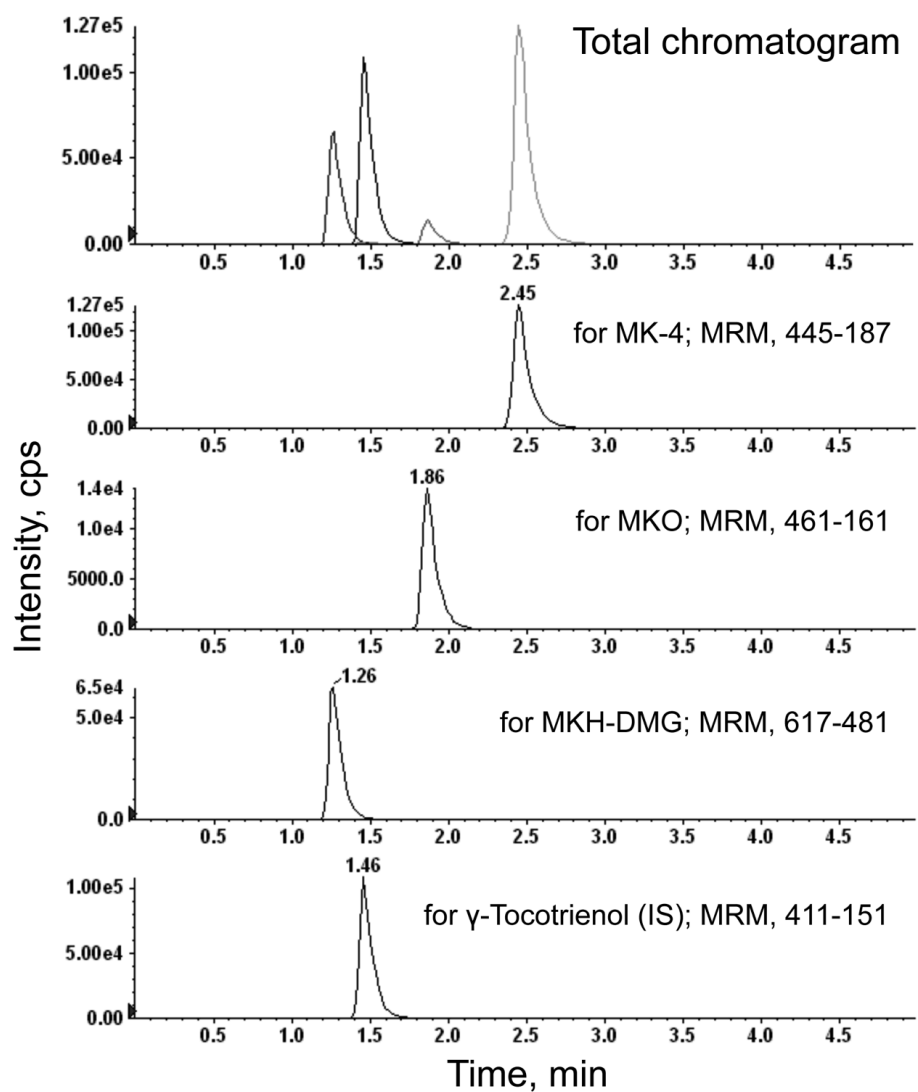


Figure 1-3. Typical LC/MS-MS chromatograms of MK-4, MKO and MKH-DMG in HCC cells.  $\gamma$ -Tocotrienol is used as an internal standard (IS).

## 第二節 HCC 細胞内への MKH 送達性に及ぼす MKH-DMG 処理時間の影響

DCP陽性HCC株 (PLC/PRF/5, Hep3B) およびDCP陰性HCC株 (SK-Hep-1) に対して, Figure 2-1 に後述する増殖抑制効果の  $IC_{50}$  に近似した  $25\ \mu\text{M}$  の MKH-DMG または MK-4 を曝露させ, その細胞中の MK-4, MKO 濃度の経時変化を Figure 1-4 に示した. MKH-DMG 投与後, 3 種の細胞中の MKH-DMG 濃度は速やかに上昇し, 投与後 24 時間までに培地中の MKH-DMG との平衡に達した (data not shown). 細胞内 MKO と MK-4 濃度は, 観察した 72 時間後まで経時的に上昇し (Fig. 1-4A, C, E), MKO と MK-4 の和は MK-4 投与 (Fig. 1-4B, D, F) に比べて高くなった. ここで, Hep3B に着目すると (Fig. 1-4C, D), MKH-DMG 投与後では MK-4 に比べ MKO が高く推移しており, GGCX が飽和していないために MKO の生成が効率的となり, かつ MKO から MK-4 の還元過程が飽和であるためと考えられた. 加えて第四節で示すように, PLC/PRF/5 細胞を用いた MKO 投与における検討から, MKH-DMG 投与における高い細胞内 MK-4 濃度 (Fig. 1-4A) は, HCC 細胞内で MKH-DMG が加水分解して生成した MKH の内, GGCX の補因子として使われなかった MKH が抽出過程で MK-4 に酸化されたものであることが強く示唆された. したがって, MKH-DMG 投与後の HCC 細胞中の MK-4 と MKO の和を, 細胞内に送達された MKH とみなすことができ, また MK-4 投与では MKH から MKO への変換に飽和は観察されないことから, 細胞中の MKO 量を送達された MKH 量とみなし, MKH の濃度時間曲線下面積 ( $AUC$ ) を用いて HCC 細胞内への送達性の強度を比較した. 投与後 72 時間までの細胞内 MKH 濃度時間曲線下面積を台形公式によって求め, Table 1-2 に示した. MK-4 投与に比較しての MKH-DMG 投与は MKH の  $AUC_{0-72h}$  が約 3.5-15 倍大きく MKH の送達性が 3.5-15 倍高いことが明らかとなった.

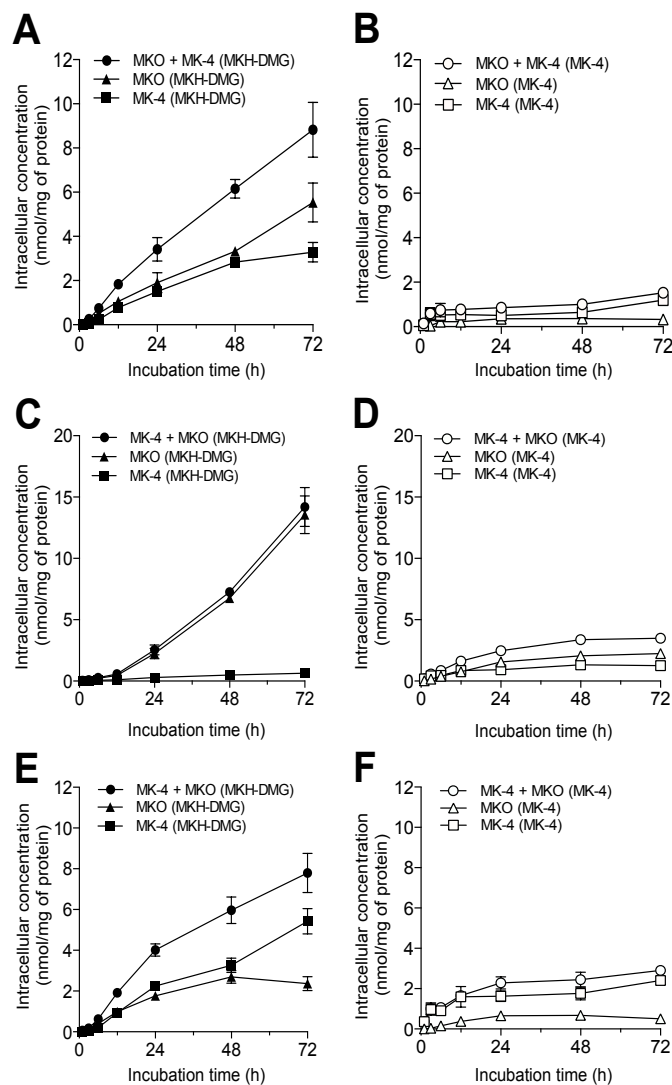


Figure 1-4. MKH delivery via MKH-DMG into HCC cell lines. Intracellular MK-4 and MKO concentration-time profiles following 25  $\mu$ M MKH-DMG treatment of PLC/PRF/5 (A), Hep3B (C), and SK-Hep-1 (E) cells. Intracellular MK-4 and MKO concentration-time profiles following 25  $\mu$ M MK-4 treatment of PLC/PRF/5 (B), Hep3B (D), and SK-Hep-1 (F) cell lines. Symbols: ■, MK-4; ▲, MKO; ●, MK-4+MKO after MKH-DMG treatment. □, MK-4; △, MKO; ○, MK-4+MKO after MK-4 treatment. Error bars indicate mean  $\pm$  SD (n = 3).

Table 1-2. Area under the intracellular concentration versus time curve (*AUC*) after treatment with MK-4 or MKH-DMG in HCC cell lines.

HCC cell line	Test drug	<i>AUC</i> <sub>0-72h</sub> for MKO (nmol·h·mg protein <sup>-1</sup> )	<i>AUC</i> <sub>0-72h</sub> for MK-4 (nmol·h·mg protein <sup>-1</sup> )	<i>AUC</i> <sub>0-72h</sub> for MKH <sup>a</sup> (nmol·h·mg protein <sup>-1</sup> )
PLC/PRF/5	MK-4	22.2 ± 3.72	47.7 ± 7.25	22.2 ± 3.72
	MKH-DMG	193 ± 25.1	143 ± 13.6	336 ± 37.2
Hep3B	MK-4	113 ± 4.87	74.5 ± 17.0	113 ± 4.87
	MKH-DMG	371 ± 31.0	25.9 ± 5.04	397 ± 34.2
SK-Hep-1	MK-4	38.4 ± 4.44	122 ± 19.5	38.4 ± 4.44
	MKH-DMG	136 ± 14.3	193 ± 21.5	329 ± 35.4

Doses are 25 µM (at near IC<sub>50</sub> value).

PLC/PRF/5 and Hep3B, DCP-positive cells; SK-Hep-1, DCP-negative cells.

<sup>a</sup>MKH value after MKH-DMG administration: sum of MKO and MK-4

MKH value after MK-4 administration: MKO

### 第三節 細胞内 MKH 送達性に及ぼす MKH-DMG の用量変化

MKH-DMG または MK-4 の投与量を変化させ、投与 24 時間後の PLC/PRF/5 細胞内の MK-4, MKO 濃度を Figure 1-5 に示した。MKH-DMG および MK-4 投与いずれにおいても細胞内 MK-4 と MKO 濃度は用量依存的に高くなった。MKH-DMG 投与の細胞内 MK-4 と MKO 濃度はどちらも、MK-4 添加群と比較して全ての投与量において高くなった。このことは MKH の送達性は MKH-DMG 投与量に依存して高くなることが明らかである。また、AUC 値も投与量に依存して高くなることが予測される。

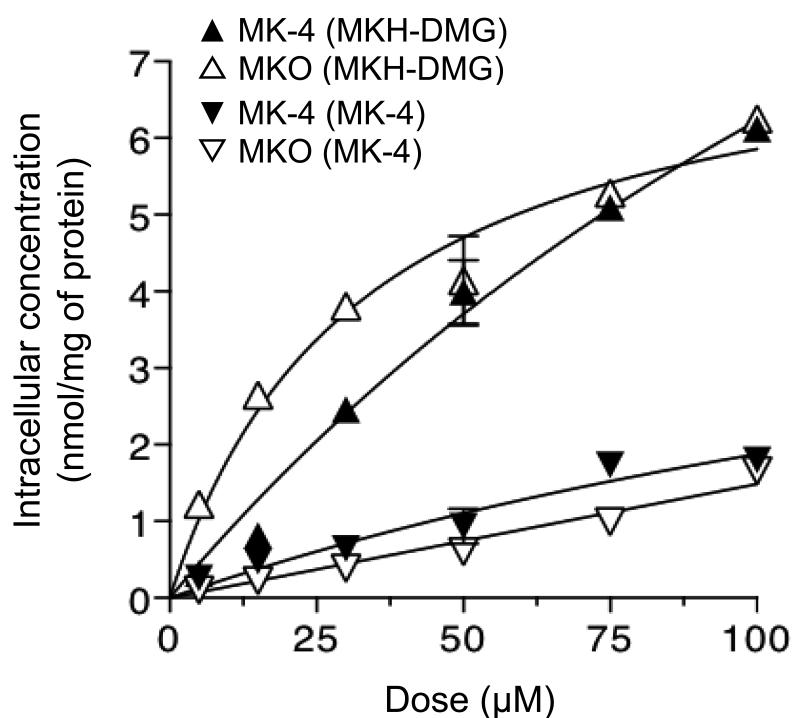


Figure 1-5. Intracellular MKO and MK-4 concentration-dose curves following MKH-DMG or MK-4 treatment. Cells were exposed to various concentrations of MK-4 or MKH-DMG for 24 h. Symbols; ▲, △ and ◆ are intracellular MK-4, MKO and the sum of these after MKH-DMG treatment, respectively; ▼, ▽ and ◇ are intracellular MK-4, MKO and sum of these after MK-4 treatment, respectively.

#### 第四節 MKO 処理による MKO 取込みと MK-4 生成評価による HCC 細胞中の vitamin K cycle 構成還元酵素の能力評価

MKO 濃度を変化させて PLC/PRF/5 細胞に投与し, 24 時間後の細胞内 MKO と MK-4 濃度をそれぞれ Figure 1-6A と 1-6B に示した. MKO 投与量に比例して細胞中 MKO 濃度は高くなり, MK-4 投与における細胞中 MK-4 濃度に比較すると非常に高くなり極めて膜透過性が高いことが示された (Fig. 1-6A). 一方で, MKO 投与後の細胞中 MK-4 濃度は, 飽和性を示し Michaelis-Menten 式に従った (Fig. 1-6B). 細胞内 MK-4 の割合は, 細胞内 MKO 濃度が高くなると小さくなり細胞内 MKO 濃度範囲において 3%~0.3%であった. このことは, 細胞内 MKO 濃度が高い場合には MK-4 への還元の割合が小さく, VKORC1 による MKO から MK-4 への還元過程が飽和していることが明らかとなった. すなわち, Figure 1-4B で示した MKH-DMG 投与における細胞内の高い MK-4 濃度は, MKO からの還元によるものではなく, MKH-DMG が HCC 細胞中で加水分解されて生成した MKH の中で GGCX の補因子として使われなかった MKH であり, 定量的ための抽出過程で MK-4 に酸化されたものであることが強く示唆された.

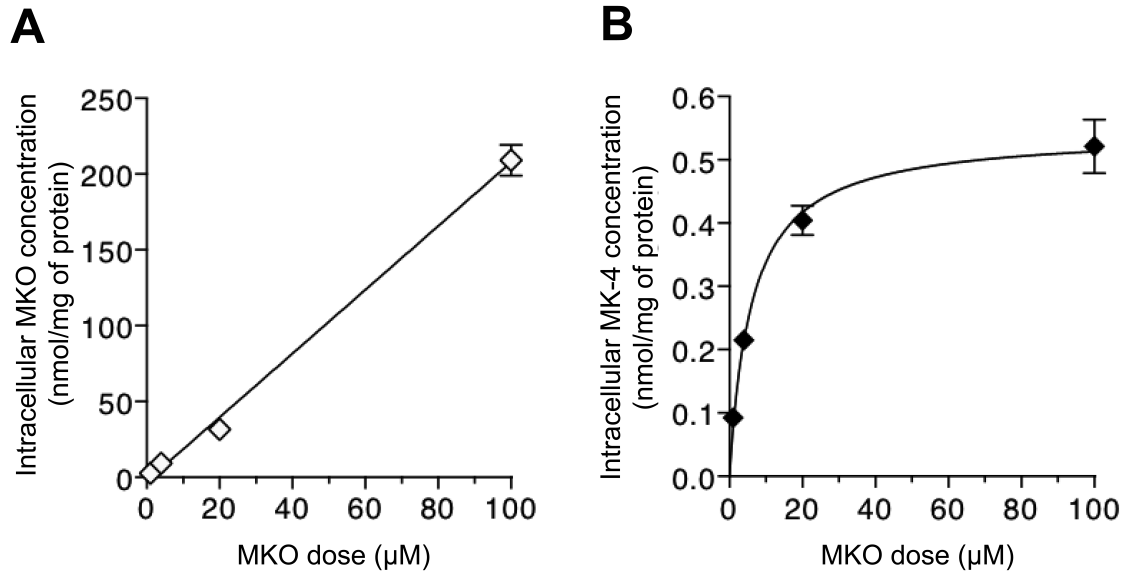


Figure 1-6. Intracellular MKO (A) and MK-4 (B) concentration-dose curve following MKO treatment for 24 h. Symbols;  $\diamond$  and  $\blacklozenge$  are intracellular MKO and MK-4 after treatment with various concentrations of MKO, respectively. Error bars indicate mean  $\pm$  SD of three experiments.

## 小括

本章において次に示すことが明らかになった.

- 1) 3 種の HCC 細胞株において, HCC 細胞中の MKH-DMG は投与後 24 時間までに培地中の MKH-DMG と平衡に達し, MKH-DMG は細胞内において MKH に再変換 (加水分解) され, HCC 細胞中に効率よく MKH を送達できる prodrug として機能することが明らかになった.
- 2) HCC 細胞内への MKH 送達性は, MKH-DMG は MK-4 投与に比較して MKH の  $AUC_{0-72h}$  が約 3.5-15 倍であることが明らかになった.
- 3) MKH-DMG は用いた投与液濃度 $\sim$ 100  $\mu$ M の範囲では, MKH-DMG 用量依存的に細胞内の MKH 送達量を高くすることが明らかとなった.
- 4) DCP 陽性 HCC 株 PLC/PRF/5 細胞では, MKO の取込みは極めて優れており, MKO を MK-4 還元する過程を担う酵素は, 細胞内 MKO 濃度が数十 nmol/mg protein 濃度で飽和しており, 高濃度では MK-4 の供給は極めて低いことが明らかになった. また, MK-4 を MKH に還元する VKORC1L1 も同様な酵素パラメータを有することが示されており, MK-4 から MKH への還元過程も酵素キャパシティが小さいことが考えられる.

## 第二章 MKH-DMG の DCP 陽性 HCC 細胞株に対する抗腫瘍効果

第一章において 3 種の HCC 細胞を用いて, MKH-DMG は MK-4 に比較して HCC 細胞に効率よく MKH を送達できることが明らかになった. 本章では PLC/PRF/5, Hep3B および SK-Hep-1 株に対する MKH-DMG の増殖抑制効果を MK-4 との比較により評価した.

HCC 細胞の培養液に MKH-DMG あるいは MK-4 を添加し, 経時的に生細胞数を測定した. 生細胞数は Cell-Titer Glo Luminescent Cell Viability Assay 試薬を用いて ATP に対応した発光強度の測定で行った. PLC/PRF/5, Hep3B および SK-Hep-1 に対する MKH-DMG と MK-4 の効果を Figure 2-1 に示した. MKH-DMG 投与では, 用量依存的かつ時間依存的な増殖抑制効果を示した (Fig. 2-1A, C, E). MK-4 投与では, 有意な増殖抑制効果は 72 時間後に観察された (Fig. 2-1B, D, F). MKH-DMG は MK-4 に比較して増殖抑制効果が低濃度で素早く発現することが明らかになった.

PLC/PRF/5, Hep3B, SK-Hep-1 株に対する薬物濃度-反応曲線から求めた  $IC_{50}$  値をそれぞれ Table 2-1 に示した. MKH-DMG 投与 72 時間後の  $IC_{50}$  は MK-4 投与の約 1/18-1/4 であった. MKH-DMG は MK-4 の約 4-18 倍の強い増殖抑制効果を示すことが明らかとなった. MKH-DMG 投与による細胞内 MKH 送達性が MK-4 投与の約 3.5-15 倍高いことから MKH-DMG による HCC 細胞の増殖抑制は細胞中 MKH によることが強く示唆された.

得られた MKH-DMG 投与における  $IC_{50}$  値は 3 種の HCC で 14-37  $\mu$ M の範囲であり, MK-4 が骨粗鬆症に用いられる用量 45 mg/day (15 mg/回) における最大血中レベルは 1  $\mu$ M であると報告されている. また, ラットを用いた分布実験では, 経口投与後の MK-4 の肝臓への分布は少なくとも血漿の 10 倍であることが示されている. したがって, 今回の MKH-DMG の HCC に対する増殖抑制効果の  $IC_{50}$  値はこれら報告された肝臓中レベルと同等であり, MKH-DMG が長期投与においても安全性な抗腫瘍薬として機能することが期待される.

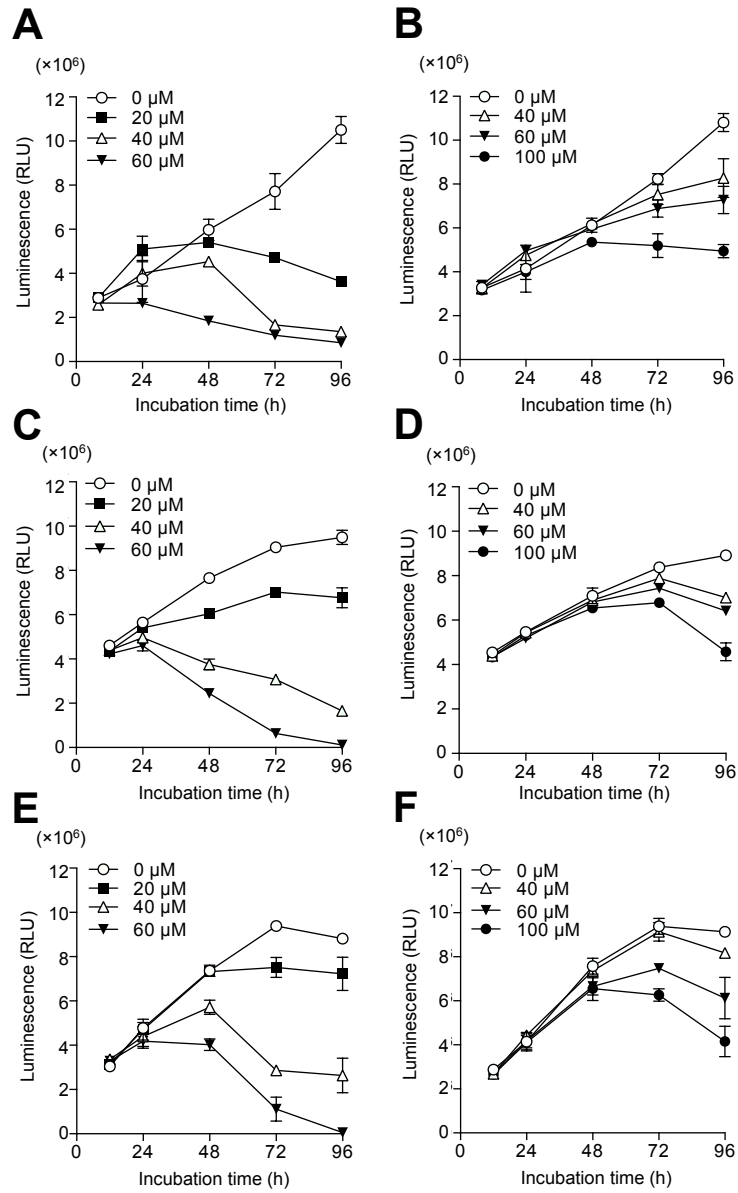


Figure 2-1. Inhibitory effects of MKH-DMG and MK-4 on DCP-positive and DCP-negative HCC cell proliferation. MKH-DMG treatment of PLC/PRF/5 (A), Hep3B (C), and SK-Hep-1 (E) cell lines. MK-4 treatment of PLC/PRF/5 (B), Hep3B (D), and SK-Hep-1 (F) cells. PLC/PRF/5 and Hep3B cells are DCP-positive, and SK-Hep-1 cells are DCP-negative. Symbols: ○, 0  $\mu$ M; ■, 20  $\mu$ M; △, 40  $\mu$ M; ▼, 60  $\mu$ M after MKH-DMG treatment. ○, 0  $\mu$ M; △, 40  $\mu$ M; ▼, 60  $\mu$ M; ●, 100  $\mu$ M after MK-4 treatment. Error bars indicate mean  $\pm$  SD (n = 3).

Table 2-1. Growth inhibition IC<sub>50</sub> values of MK-4 and MKH-DMG against HCC cell lines after treatment with MK-4 or MKH-DMG.

Time (h)	IC <sub>50</sub> value (μM) <sup>a</sup>					
	PLC/PRF/5		Hep3B		SK-Hep-1	
	MK-4	MKH-DMG	MK-4	MKH-DMG	MK-4	MKH-DMG
48	-	52 (48–56)	1203 (587–2465)	39 (35–43)	141 (128–156)	59 (56–63)
72	295 (187–465)	24 (22–27)	667 (225–1974)	37 (36–38)	111 (101–122)	31 (30–33)
96	98 (88–109)	14 (12–16)	140 (101–194)	26 (24–27)	84 (76–92)	31 (29–33)

PLC/PRF/5 and Hep3B, DCP-positive cells; SK-Hep-1, DCP-negative cells.

<sup>a</sup>IC<sub>50</sub> values are presented as mean and 95% confidence interval (in parentheses).

## 小括

本章において DCP 陽性 HCC 細胞株に対して MKH-DMG と MK-4 は時間依存的、用量依存的に増殖抑制効果を示すことが明らかになった。MKH-DMG は MK-4 に比較して速く低濃度で増殖抑制効果を示すことが明らかになった。MKH-DMG の増殖抑制の  $IC_{50}$  は MK-4 の約 1/18-1/4 であり、増殖抑制効果が約 4-18 倍であることが明らかになった。前章において MKH-DMG は MK-4 に比較して HCC 細胞内への MKH の送達性が約 3.5-15 倍高いことが明らかになっており、これらの結果を合わせて考えると MKH-DMG は細胞内への MKH を効率よく送達することで、増殖抑制効果を発揮していることが強く示唆された。

本研究において MKH-DMG は MK-4 と同等の用量において約 10 倍の増殖抑制効果が発揮できることが細胞レベルで明らかになった。MKH-DMG は長期投与における安全性が確立されている MK-4 の臨床用量と等しい用量において高い MKH 送達性と高い効果が期待できることが明らかになった。

### 第三章 MKH-DMG の DCP 陽性 HCC 細胞株に対する増殖抑制作用機構

第二章までに, DCP 陽性 HCC 細胞において MK-4 投与と比較して, MKH-DMG が効率的な MKH 送達と優れた増殖抑制効果を発揮することが明らかとなった. 本章では MKH-DMG による DCP 陽性 HCC 細胞の増殖抑制機構を検討した.

肝細胞癌の増殖抑制において, MK-4 が G<sub>1</sub>/S 期の細胞周期停止を誘導することが *in vivo* や *in vitro* で多く報告されている(13-15, 17, 42, 43). MK-4 は Cyclin D1 や cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) および cyclin-dependent kinase 阻害タンパク (p21, p27 等) などの増殖関連タンパクの発現レベルを変化させる(13, 15, 42, 43). MK-4 によるアポトーシスは Hep3B 株においてのみ報告されている(44). MK-4 が NF- $\kappa$ B 活性抑制によって Cyclin D1 プロモーター活性を抑制することも報告されている(15). MK-4 の NF- $\kappa$ B の抑制は, I $\kappa$ B kinase 活性の阻害を介しておこる. また, MK-4 は TNF- $\alpha$  や IL-1 や tumor-promoter 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) など炎症性サイトカインによる NF- $\kappa$ B の活性化も抑制する. HCC を含む多くの悪性腫瘍における NF- $\kappa$ B の異常発現は, 腫瘍の発生や進展にリンクしており, NF- $\kappa$ B はがん治療の標的となっている(45). NF- $\kappa$ B も Cyclin D1 も細胞遊走を制御することが知られており(46, 47), MK-4 による NF- $\kappa$ B と Cyclin D1 の阻害は, HCC 細胞の浸潤を抑制することになる. Transcription factor steroid and xenobiotic receptor (SXR) は MK-4 のリガンド(48)であり肝臓に多く発現し, NF- $\kappa$ B が制御する遺伝子発現を逆に制御することが報告されている(49). Vitamin K 欠乏はラット肝臓における急性炎症反応に関与する遺伝子の発現レベルを亢進し, 一方で VK の負荷投与は LPS 誘発炎症反応を抑制することを示し VK と炎症をリンクさせている(50). 他に, MK-4 は protein kinase A (PKA) 活性を促進することによって Rho 活性を阻害し, 細胞増殖と転移を抑制することが示されている.

また, 緒言で述べた様に最近の研究では, DCP は HCC の自家 (autologous) 成長因子であり(29), 癌の進展に重要な役割を果たしている. DCP 産生は HCC の癌血管新生に寄与しており(30), これは癌の浸潤や転移に必須のものであり, 少

なくとも HCC の悲観的な予後に関与している．すなわち,DCP 産生を抑制することは HCC 治療における新薬開発の 1 つの標的であると考えられる(31).

このような,背景から本研究では cell cycle およびそれに関連するタンパク質生成に及ぼす MKH-DMG の影響を検討し,さらに DCP の産生に及ぼす MKH-DMG の影響を検討した.

## 第一節 DCP 陽性 HCC 細胞の細胞周期に及ぼす MKH-DMG の影響

細胞周期に及ぼす MKH-DMG の影響を明らかにする目的で, PLC/PRF/5, Hep3B, SK-Hep-1 細胞を用い, MKH-DMG 投与後, 経時的に細胞周期に関連している Cyclin D1, Cyclin D3, CDK4 および NF- $\kappa$ B タンパクの発現をウェスタンブロット法で検出した. また, PLC/PRF/5 細胞を用いて各細胞周期に分布する細胞数をフローサイトメトリー解析した. Figure 3-1-1 は 3 種の HCC 細胞に 60  $\mu$ M の MKH-DMG または MK-4 を投与後の CDK4, Cyclin D1, Cyclin D3 および NF- $\kappa$ B タンパク発現を示している. CDK4, Cyclin D1, Cyclin D3 は MK-4 と MKH-DMG 投与によって経時的に減少した. MK-4 に比較して MKH-DMG は投与後 48 時間または 72 時間後において CDK4, Cyclin D1, および Cyclin D3 の全てを強く抑制した. Cyclin D は CDK4 と複合体を形成することで, G<sub>1</sub> 期から S 期へ細胞周期が進行するため, Cyclin D と CDK4 の両方の発現抑制は G<sub>1</sub> 期から S 期への移行抑制を強く支持している. NF- $\kappa$ B に関しては, PLC/PRF/5 と SK-Hep-1 に対する MK-4 投与で経時的な減少が認められなかったが, MKH-DMG 投与では MK-4 投与よりも強い抑制が観察された.

Figure 3-1-2 は 60  $\mu$ M の MKH-DMG または MK-4 を PLC/PRF/5 細胞に投与し, 12 時間と 48 時間後のフローサイトグラムである. MK-4 投与においてはコントロール (0  $\mu$ M) に比較して G<sub>1</sub> 期, S 期の割合は変化が無く, MKH-DMG 投与 48 時間において, G<sub>1</sub> 期にある細胞の割合が大きく増加し S 期にある細胞の割合が減少した. この結果から, MKH-DMG 投与において明らかな G<sub>1</sub> 期停止 (G<sub>1</sub> arrest) が示されている. MKH-DMG 投与 48 時間における Cyclin D と CDK4 の強い発現抑制と G<sub>1</sub> 期停止 (G<sub>1</sub> arrest) の結果は, MKH-DMG による増殖抑制に G<sub>1</sub> arrest が関与していることは明らかである. MK-4 投与において弱いながらも Cyclin D と CDK4 の発現抑制が遅い時間において観察され, G<sub>1</sub> arrest が増殖抑制に関与していると考えられ, 報告されている結果と矛盾しない. また, G<sub>1</sub> arrest において MKH-DMG は MK-4 よりも速やかで強い効果を発揮したことは, 増殖抑制効果で観られた時間依存性および用量依存性と矛盾しない結果である. すなわち,

MKH-DMG 投与による HCC 細胞内への MKH の速やかで効率的な送達は、G<sub>1</sub> arrest による細胞増殖抑制を発揮することが明らかである。

Cyclin D1 は HCC 細胞の浸潤に大きく関与することが明らかになっており、Figure 3-1-1 から明らかな様に、MKH-DMG 投与によって Cyclin D1 発現が強く抑制されたことから、MKH-DMG 投与による HCC の悪性化も抑制できる可能性が示唆された。

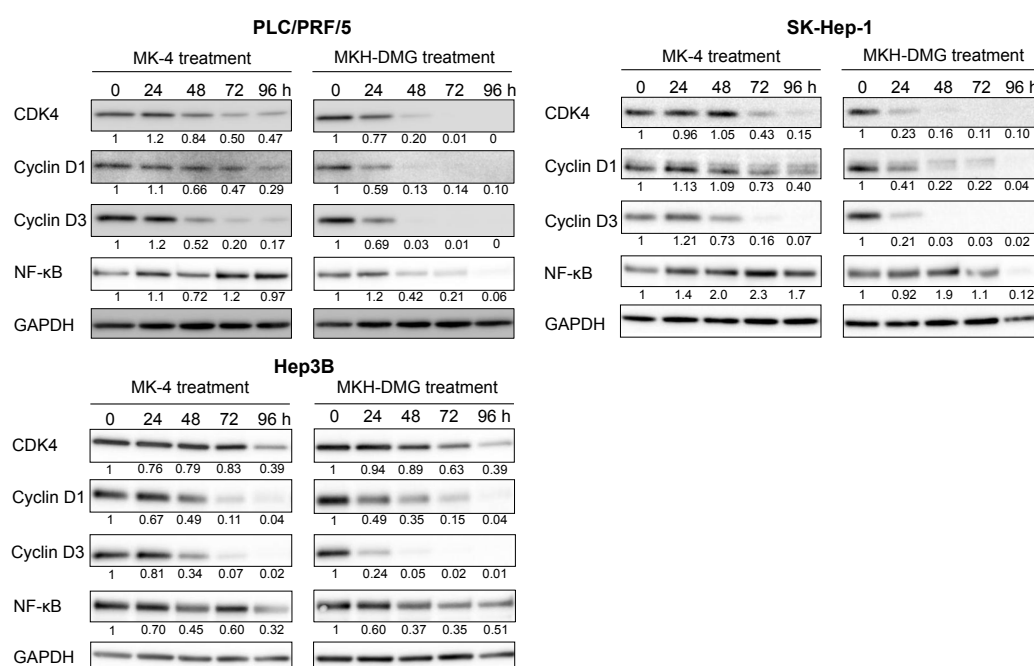


Figure 3-1-1. Effects of MKH prodrug on expression of cell-cycle regulatory proteins and NF-κB in PLC/PRF/5, Hep3B, SK-Hep-1 cells. Cells were seeded in a six-well plate ( $1.5 \times 10^5$  cells per well). HCC cells were treated with 60  $\mu$ M MK-4 or MKH-DMG for up to 96 h. Western blot analysis was performed using specific antibodies against CDK4, cyclin D1, cyclin D3, NF-κB and GAPDH.

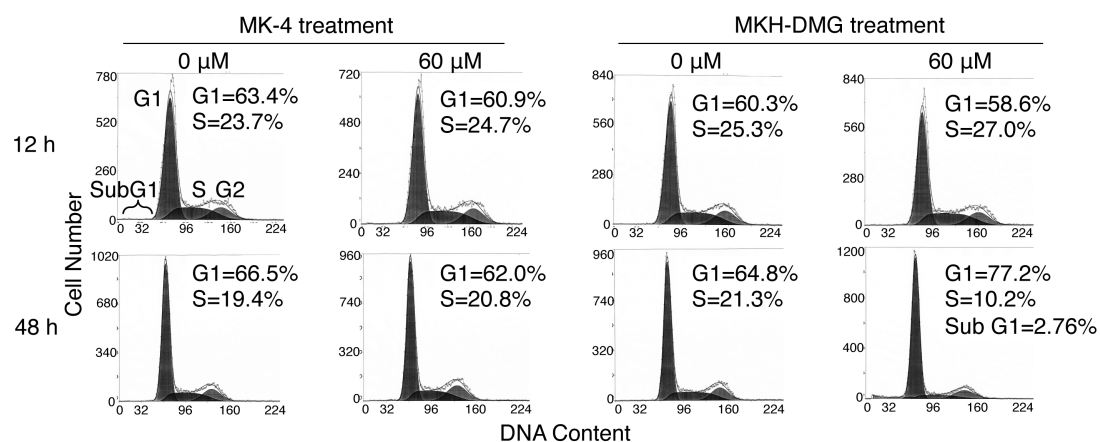


Figure 3-1-2. Flow cytograms of MKH-DMG-treated cell. PLC/PRF/5 cells were seeded in six-well plate ( $1.5 \times 10^5$  cells per well). Cells were treated with 60 μM MK-4 or MKH-DMG for 12 and 48 h. The DNA content (propidium iodide) and cell cycle were analyzed by flow cytometry. Indicated percentage values represent DNA content in G<sub>1</sub>- and S-phase per number of whole DNA.

## 第二節 DCP 陽性 HCC 細胞における MKH-DMG によるアポトーシス誘導

前節のフローサイトメトリー解析により MKH-DMG 投与後の PLC/PRF/5 細胞で SubG<sub>1</sub> 期の増加が観察されたことから MKH-DMG 投与におけるアポトーシス誘導が示唆された。また, Hep3B 細胞において MK-4 によるアポトーシスが報告されている。

本節では, PLC/PRF/5 株における MKH-DMG のアポトーシス誘導をカスパーゼ 3/7 活性で評価し, Hep3B 株において DNA の断裂化を検証した。MKH-DMG 添加群と MK-4 添加群のいずれも用量依存的なカスパーゼ 3/7 活性を示し, MKH-DMG の方が MK-4 に比べて低濃度 (40  $\mu$ M) で顕著な効果が現れた (Fig. 3-2-1)。Hep3B における DNA の断片化を Figure 3-2-2 に示した。MKH-DMG によってカスパーゼは優位に高くなり, DNA の断片化が観察され, MKH-DMG によるアポトーシス誘導が観察された。MKH-DMG による HCC 細胞増殖抑制にはアポトーシス誘導が関与していることが明らかになった。

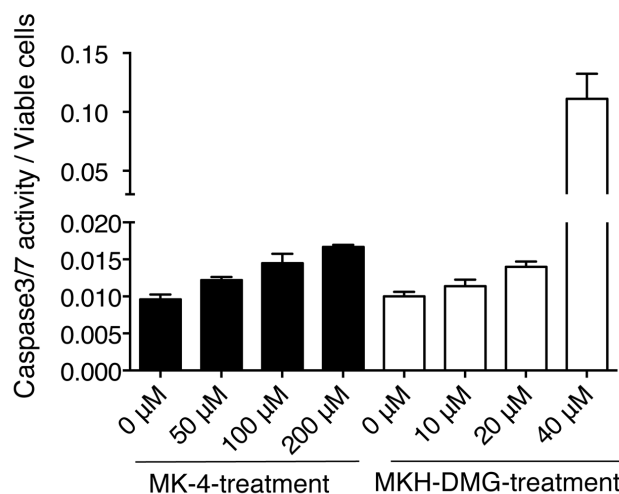


Figure 3-2-1. Effects of MKH prodrug on cell apoptosis of PLC/PRF/5 cells. Cells were treated with various concentrations of MK-4 or MKH-DMG for 72 h. Caspase 3 and 7 were measured by CaspaseGlo 3/7 Assay. Values on the left are ratios of caspase activity (Caspase Glo 3/7 Assay) and viable cells (Cell Titer-Glo assay), as determined by coupled analysis. Error bars indicate mean  $\pm$  SD (n=3).

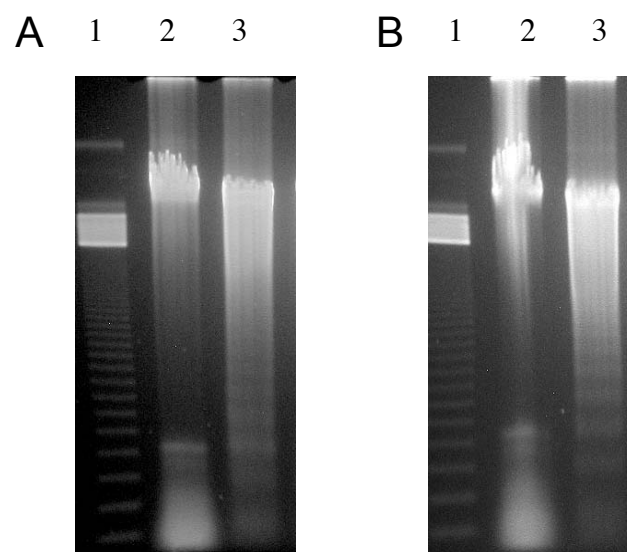


Figure 3-2-2. Induction of DNA fragmentation in Hep3B cells with MKH-DMG. A, The cells were treated with 100  $\mu$ M MKH-DMG for 48 h. B, The cells were treated with 100  $\mu$ M MKH-DMG for 72 h. Lane; 1, marker; 2, control; 3, MKH-DMG.

### 第三節 DCP 陽性 HCC 細胞に対する MKH-DMG の DCP 産生抑制効果

DCP は HCC の autologous な成長因子であり, 浸潤や転移に関わっている. DCP の生成抑制はがん治療において 1 つの戦略と考えられている. 本節では, DCP 陽性 HCC 細胞株 (PLC/PRF/5, HepG2) による DCP 生成に及ぼす MKH-DMG と MK-4 の効果を検討した. DCP (mAU/mL) は培地中濃度をピコルミ PIVKA-II キットを用いて測定した. HCC 細胞による DCP 生成は 10  $\mu$ M の MKH-DMG または MK-4 投与によって DCP 生成は強く抑制された (Table 3-3-1).

一方, 第一章の Figure 1-3-1 から明らかな様に MKH-DMG 投与後の細胞中の MKO 濃度は 10  $\mu$ M 投与以上においても用量依存的に高くなり, vitamin K 依存性タンパク質中の Glu 残基が Gla に変換される反応が更に進行していることが示された. このことは, GGCX は十分に存在しており, DCP 陽性 HCC による DCP 産生が GGCX 活性の低下によるものではなく, HCC 細胞への MKH 送達性の低さに起因することが明らかとなった.

DCP は 10  $\mu$ M で完全に抑制されたが, MKH-DMG の増加に伴って MKO が更に増加したことから, vitamin K 依存性タンパク質中の Glu 残基が Gla に変換される反応が更に進行していることが示された. DCP 以外の protein S など vitamin K 依存性タンパクが肝臓中に存在することが知られており, これらのタンパクの HCC 増殖に対する効果はこれからの課題である.

Table 3-3-1. DCP concentration in HCC cell lines after administration of MKH-DMG or MK-4.

HCC cell	Control	10 $\mu$ M of MK-4	10 $\mu$ M of MKH-DMG
PLC/PRF/5 (mAU/mL)	43 $\pm$ 3.6	1.3 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.0
HepG2 (mAU/mL)	2298 $\pm$ 116	2.3 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 0.6

## 小括

本章において次のことが明らかとなった.

- 1) MKH-DMG は HCC 細胞において細胞周期に関与する CDK4 と Cyclin D タンパクの発現を強く速やかに抑制し,  $G_1$  arrest を誘発することで HCC の増殖抑制することが明らかになった.
- 2) MKH-DMG は Cyclin D1 発現を強く抑制したことから, MKH-DMG 投与によって HCC の悪性化を抑制できる可能性が示唆された.
- 3) MKH-DMG は用量依存的なアポトーシス誘導作用を持つことが明らかとなった.
- 4) DCP 陽性 HCC による DCP を産生が GGCX 活性の低下によるものではなく, HCC 細胞への MKH 送達性の低さに起因することが明らかとなった.
- 5) Vitamin K 依存性タンパク中の Glu 残基が Gla に変換される反応が大きく起こることから, DCP 以外の肝臓中に存在する protein S など vitamin K 依存性タンパクの HCC 増殖抑制への関与が考えられ, これからの課題となった.

#### 第四章 DCP 陽性 HCC 細胞株の脾-肝転移モデルマウスを用いた MKH-DMG の経口投与における抗腫瘍効果 (*in vivo* 評価)

これまでに DCP 陽性 HCC (PLC/PRF/5, Hep3B), DCP 陰性 HCC (SK-Hep-1) 細胞に対して, MKH-DMG が MKH を効率よく送達することで細胞増殖を抑制することを *in vitro* で明らかにした. 本章では, HCC の再発・転移の予防効果評価を想定し, *in vivo* での MKH-DMG の効果を明らかにする目的で, Fidler により考案された, 脾臓に癌細胞を移植し肝臓において癌の転移増殖を起こさせるマウス評価系 (脾-肝転移モデルマウス) を用いて評価を行なった. 本研究では, 癌細胞投与前 6 日から後 50 日まで MKH-DMG を飲水から経口投与し, HCC 細胞の脾臓投与後 50 日後の肝臓における HCC の成長に及ぼす効果を検討した. 効果評価に先立ってマウス経口投与における MKH-DMG の prodrug としての機能を検討した.

##### 第一節 MKH-DMG 強制経口投与後のマウス体内動態

MKH-DMG は, 静脈内投与において MKH の水溶性 prodrug として機能することは明らかにされているが, 経口投与においての機能は明らかにされていない. MKH-DMG の *in vivo* 評価に先立って MKH-DMG が経口投与に適した MKH の prodrug であることを担保する必要がある. 本節では, まず, 正常マウスを用いて MKH-DMG の強制経口投与におけるマウス体内動態を検討し, 経口投与が効果評価に適することを明らかにした. 投与液は MKH-DMG を精製水に溶解し, 雄性 ICR マウスに MKH-DMG 38.6 mg/kg (MK-4 等量 25 mg/kg) を強制経口投与した. 投与後, 経時的な血漿中および肝臓中の MKH-DMG と MK-4 濃度を LC/MS-MS で測定した. 血漿中と肝臓中濃度の経時変化をそれぞれ Figure 4-1-1A と 4-1-1B に示した. 動態パラメーターを Table 4-1-1 に示した. MKH-DMG の血漿中 MKH-DMG と MK-4 はどちらも投与 1 時間で  $C_{\max}$  に達し, MKH-DMG は経口投与後エステル型として吸収された後に体内で加水分解され MKH に再変換

されることが明らかである. HCC 治療の標的臓器である肝臓中の MKH-DMG 濃度は 1 時間で  $C_{\max}$  に達し, MK-4 は 2 時間で  $C_{\max}$  に達した. MKH-DMG は経口投与後肝臓にエステル型で送達され肝臓中において MKH に再変換される結果 MK-4 が高くなったと考えられる. 従って, 標的臓器の MKH 濃度を高くできることが明らかになった.

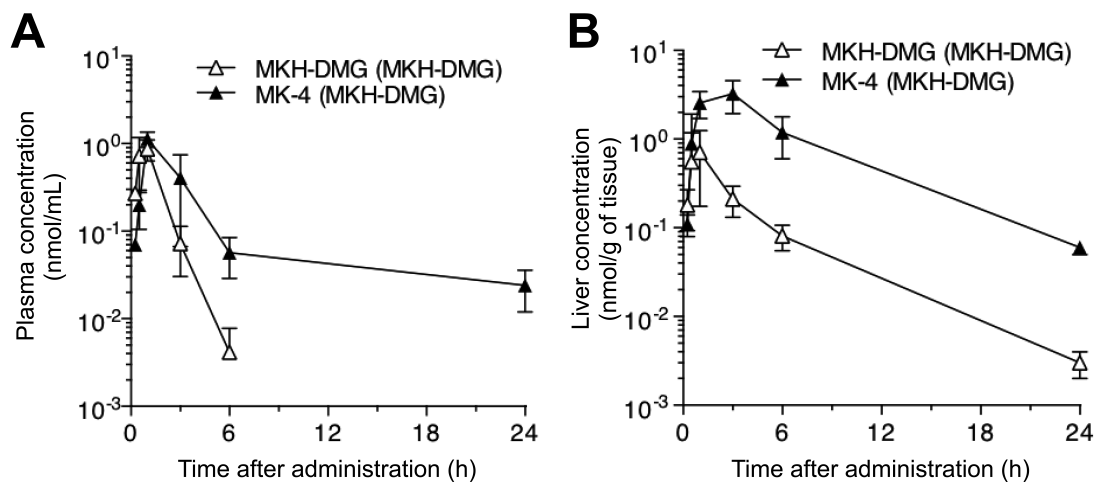


Figure 4-1. Plasma and liver concentration profile of MK-4 and MKH-DMG after oral administration of MKH-DMG in mice. Dose was 38.6 mg/kg body weight. A, Plasma concentration after MKH-DMG administration. Symbols;  $\Delta$  and  $\blacktriangle$  are concentrations of MKH-DMG and MK-4 in plasma after MKH-DMG administration, respectively. B, Liver concentration after MKH-DMG administration. Symbols;  $\Delta$  and  $\blacktriangle$  are concentrations of MKH-DMG and MK-4 in liver tissue after MKH-DMG administration, respectively. Each point represents mean  $\pm$  SD of three mice.

Table 4-1. Pharmacokinetic parameters of MKH-DMG and MK-4 in plasma and liver after p.o. administration of MKH-DMG in mice.

Parameters <sup>a</sup>	Plasma	Liver
<i>Dose</i> of MKH-DMG (mg/kg of mouse weight)		38.6
<b>For intrinsic MKH-DMG</b>		
$C_{\max}$ (nmol·mL <sup>-1</sup> or nmol·g of tissue <sup>-1</sup> )	0.868 ± 0.236	0.711 ± 0.537
$t_{\max}$ (h)	1	1
$AUC_{0-24\text{ h}}$ (nmol·mL <sup>-1</sup> ·h or nmol·g of tissue <sup>-1</sup> ·h)	1.61 ± 0.579	2.55 ± 1.41
$MRT$ (h)	1.13 ± 0.0332	3.24 ± 0.323
<b>For MK-4</b>		
$C_{\max}$ (nmol·mL <sup>-1</sup> or nmol·g of tissue <sup>-1</sup> )	1.13 ± 0.224	3.25 ± 1.31
$t_{\max}$ (h)	1	3
$AUC_{0-24\text{ h}}$ (nmol·mL <sup>-1</sup> ·h or nmol·g of tissue <sup>-1</sup> ·h)	3.33 ± 1.57	24.7 ± 11.0
$MRT$ (h)	3.96 ± 0.217	4.66 ± 0.0235

Values are means ± SD of three ICR mice.

<sup>a</sup> $C_{\max}$ , maximum concentration;  $t_{\max}$ , time for  $C_{\max}$ ;  $AUC_{0-24\text{ h}}$ , area under concentration-time curve up to 24 hours;  $MRT$ , mean residence time.

## 第二節 MKH-DMG 飲水投与による肝転移 (増殖) 抑制効果

Balb/c *nu/nu* 雄性マウスを Vehicle 投与群, MKH-DMG 投与群, Sham 群に群分けした. Vehicle と Sham 群は精製水を飲料水とし, MKH-DMG 群は MKH-DMG を精製水で溶解して飲水で投与した. PLC/PRF/5 細胞投与前 6 日から試験終了時まで, それぞれの投与液を飲水で投与した. Vehicle と MKH-DMG 群は, PLC/PRF/5 細胞の PBS 懸濁液をマウス脾臓に Fidler の方法に従って投与し, Sham 群は PBS 液のみを脾臓に投与した. PLC/PRF/5 細胞投与 50 日に麻酔下, 採血し, 肝臓を摘出した. Sham, Vehicle および MKH-DMG 群の典型的なマウス肝臓外観を Figure 4-2-1 に示した. マウス肝臓の重量を Figure 4-2-2A に示した. マウス肝臓表面積に対する癌化部位の面積の割合を写真画像から ImageJ ソフトウェアで算出した (Fig. 4-2-2B). 血漿中 DCP 濃度を Figure 4-2-2C に示した. 各データの数値を Table 4-2-1 に示した. エンドポイント (HCC 細胞投与後 50 日) において, Sham 群に比較して Vehicle 群の肝重量, 癌化面積率, DCP 濃度全てにおいて有意に高くなり Vehicle 群は肝臓において癌が増殖していることが明らかである. Vehicle 群に対して MKH-DMG 投与群は肝重量, 癌化面積率, DCP 濃度全ての値を有意に低下させた (Fig. 4-2-2A, B, C). この結果, MKH-DMG の経口飲水投与は, 肝臓における HCC 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった.

本実験は, HCC 細胞投与の 6 日前から MKH-DMG 投与を開始していることから, HCC 細胞が肝臓に転移することを防いだ結果によって肝臓の HCC 増殖が低下した可能性は否定できない. MKH-DMG 投与は DCP 生成を強く抑制しており, DCP による HCC の増殖亢進は少なくとも阻害できていることが予想される. また, MKH-DMG は HCC 細胞中の Cyclin D1 を有意に抑制することが明らかになっており, これらは HCC の転移抑制効果を支持している.

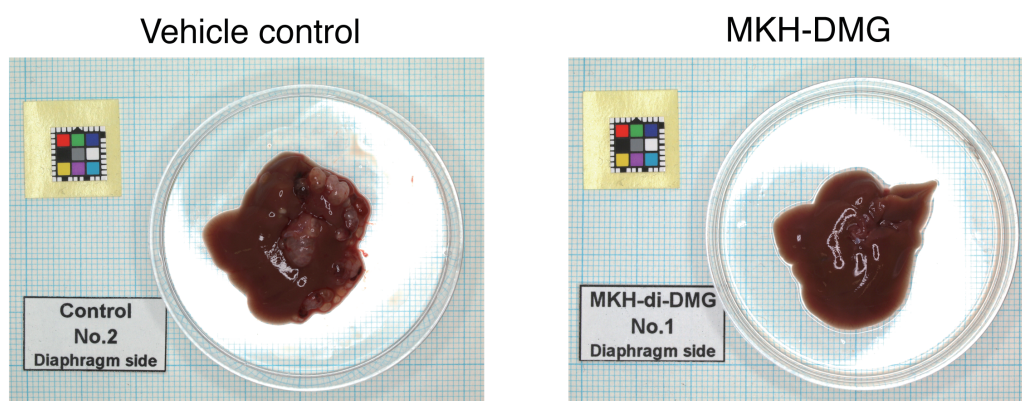


Figure 4-2-1. MKH prodrug-mediated suppression of HCC cell metastasis and growth were assessed in male Balb/c *nu/nu* mice. Nude mice were given sterile water (vehicle group, n=15), 40  $\mu$ M MKH-DMG in water (MKH-DMG group, n=15). Macroscopic appearance of mouse liver.

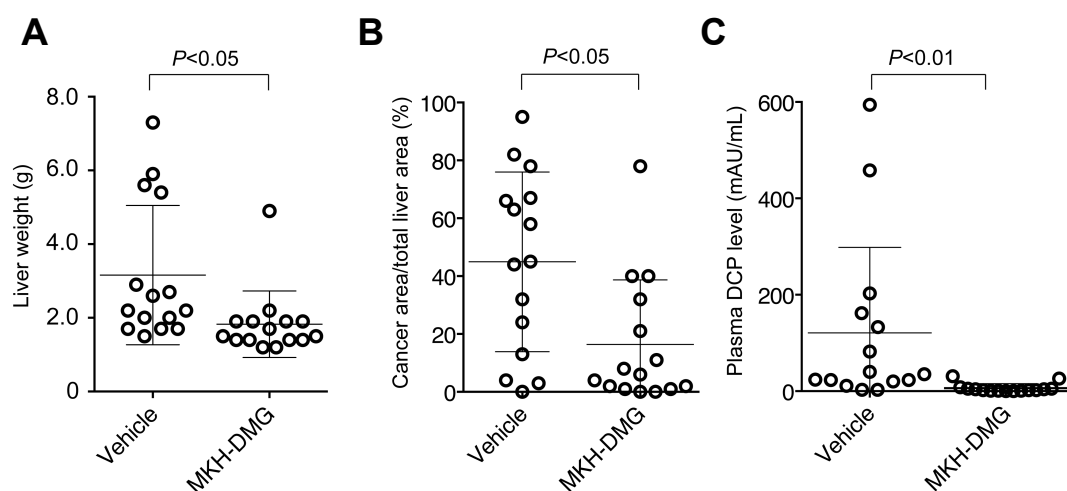


Figure 4-2-2. HCC growth inhibitory effects of MKH-DMG in a splenic-liver metastasis mouse model. (A) Macroscopic appearance of mouse liver. (B) Total liver weight. (C) Percentage of cancer surface area/total liver surface area. (D) DCP levels in plasma. Central horizontal line, mean; error bar, SD. Vehicle group, n = 15; MKH-DMG group, n = 15. Doses are 0.2  $\mu$ mol/head/day for 50 days.

Table 4-2-1. Effects of MKH prodrug on liver incidence and growth after splenic injection of HCC cells

Treatment group	Body weight (g)	Liver weight (g)	Cancer area ratio (%)	DCP in plasma (mAU/mL)
Vehicle (n=15)	23.5 $\pm$ 2.14	3.16 $\pm$ 1.89	44.9 $\pm$ 31.0	127 $\pm$ 183
MKH-DMG (n=15)	24.6 $\pm$ 1.66	1.83 $\pm$ 0.89*	16.4 $\pm$ 22.3*	6.1 $\pm$ 9.4**
Sham (n=9)	25.5 $\pm$ 1.73	1.49 $\pm$ 0.23*	-	1.0 $\pm$ 0.9**

Indicated values are means  $\pm$  SD at endpoint.

DCP: des- $\gamma$ -carboxy prothrombin

\* $P < 0.05$  vs. vehicle group.

\*\* $P < 0.01$  vs. vehicle group.

## 小括

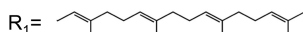
本章において次に示すことが明らかとなった.

1) MKH-DMG は正常マウスへの経口投与において, MKH-DMG 自身が吸収されたのち加水分解を受けて MKH を送達していることが明らかとなり, MKH の prodrug として機能することが明らかとなった.

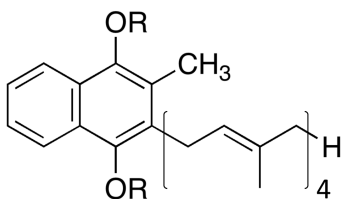
2) PLC/PRF/5 細胞を移植した脾-肝転移モデルマウスにおいて, Vehicle 群に対して MKH-DMG 投与群は肝重量, 癌化面積率, DCP 濃度全ての値を有意に低下させた結果, MKH-DMG の経口飲水投与は, 肝臓における HCC 細胞の増殖を抑制することが明らかとなった. また, 本実験は, HCC 細胞投与の 6 日前から MKH-DMG 投与を開始していることから, HCC 細胞が肝臓に転移することを防いだ結果によって肝臓の HCC 増殖が低下した可能性は否定できない.

MKH-DMG 投与は DCP 生成を強く抑制しており, DCP による HCC の増殖亢進は阻害されていることが予想される. また, MKH-DMG は HCC 細胞中の Cyclin D1 を強く抑制することが *in vitro* で明らかになっており, HCC の転移抑制が発揮された可能性が否定できない.

## MKH ester type prodrug の promoiety の影響



prodrugs.



	<b>R</b>
Menahydroquinone-4 (MKH)	H
MKH-DMG	$-\text{COCH}_2\text{N} \begin{matrix} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{matrix} \cdot \text{HCl}$
MKH-ACT	$-\text{COCH}_3$
MKH-SUC	$-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

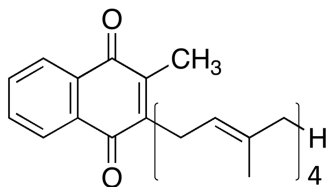


Figure 5-1-2. Chemical structures of MKH ester type prodrugs and MK-4.

本章までに, MKH-DMG は HCC 細胞にエステル体として取込まれ, HCC 細胞内で加水分解されて HCC 細胞内に MKH を送達する ester type prodrug として機能することが明らかになった. すなわち, MKH の ester type prodrug による HCC

細胞への MKH 送達には, 1) prodrug 自身の HCC 細胞への取込み過程と 2) HCC 細胞内での加水分解過程が MKH の細胞内送達性の律速過程であることが考えられる (Fig. 5-1-1). 本章では, MKH 送達における各過程の寄与を明らかにし, 更に優れた MKH 送達性を有する MKH エステル誘導体の探索を行う目的でカチオン性, アニオン性および中性の promoiety を有する MKH のエステル誘導体に関して, その HCC 細胞への取込み, HCC 細胞内での加水分解性を検討した. さらに, これらの MKH エステル誘導体による HCC 細胞への MKH 送達性と細胞増殖抑制効果を比較検討した.

#### 第一節 HCC 細胞への MKH 送達過程に及ぼす MKH ester type prodrug の promoiety の影響

これまで癌組織は酸性の要素を呈することが知られていることから, カチオン性の promoiety を有する MKH-DMG には HCC 細胞への高い親和性が期待できると考え検討を重ねてきた. 本節では MKH ester type prodrug による MKH 送達性の予想される律速過程を 1) prodrug 自身の HCC 細胞への取込み過程と, 2) HCC 細胞内での加水分解による MKH への再変換過程の 2 過程として想定し, 各過程に及ぼす promoiety の影響を明らかにすることを目的とした. promoiety にアニオン性残基を有する MKH 1,4-bis-hemisuccinate (MKH-SUC), イオン性残基を持たない (中性) MKH 1,4-bis-acetate (MKH-ACT) およびカチオン性残基を有する MKH-DMG の 3 種類の MKH エステル誘導体 (Fig. 5-1-2) を用いて, PLC/PRF/5 細胞への取込み, PLC/PRF/5 細胞組成による加水分解性を評価した.

PLC/PRF/5 細胞の培養液に各薬物 (MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG, MKH-SUC) 50  $\mu$ M を投与し, 3 時間後の誘導体自身の細胞内取込み量を LC/MS-MS で測定し, タンパク質量当りの物質質量 (nmol/mg of protein) で表した (Fig. 5-1-3). エステル体の細胞内取込みは promoiety の種類によって大きく異なり MKH-SUC > MKH-DMG > MKH-ACT の順に大きくなった. MKH-DMG は MKH-ACT の約 5 倍, MKH-SUC は MKH-ACT の約 10 倍であり, 中性残基よりもイオン性残基を有

する方が高く、イオン性残基ではアニオン性残基の方がカチオン性残基よりも HCC 細胞内取込みに適していることが明らかになった。理由としてアニオン性が関与するトランスポーターの関与も考えられるが、今後の検討が必要である。

次に HCC 細胞内に取込まれた後の加水分解性を評価する目的で、PLC/PRF/5 細胞ホモジネートを用いて3種の MKH エステル誘導体の加水分解性を一次反応速度論が成立する十分低い濃度において、生成する MKH 量を酸化体である MK-4 量で表した。誘導体添加量から生成 MK-4 量を差し引いた値の対数値を時間に対してプロットし一次反応パラメータ  $k$ ,  $t_{1/2}$  を算出した (Table 5-1-1)。速度定数  $k$  は MKH-SUC > MKH-DMG > MKH-ACT の順に大きくなり、MKH-ACT に比して MKH-DMG は約 1.5 倍、MKH-SUC は約 14 倍であった。

PLC/PRF/5 細胞に薬物 50  $\mu$ M 投与 24 時間後の細胞内 MK-4, MKO 濃度を Figure 5-1-4 に示した。エステル型の細胞内 MKH 送達量を MKO と MK-4 の和 (MKO+MK-4) で表すと MKH-SUC > MKH-DMG > MK-4 > MKH-ACT の順に多くなり、MKH-ACT に比較して MKH-DMG は 10 倍 MKH-SUC は 30 倍の送達性を示した。MKH-SUC による PLC/PRF/5 細胞内への優れた MKH の送達性は、MKH-SUC 自身の高い細胞内への取込みと、細胞内での速やかな MKH への再変換性に起因していることが明らかである。

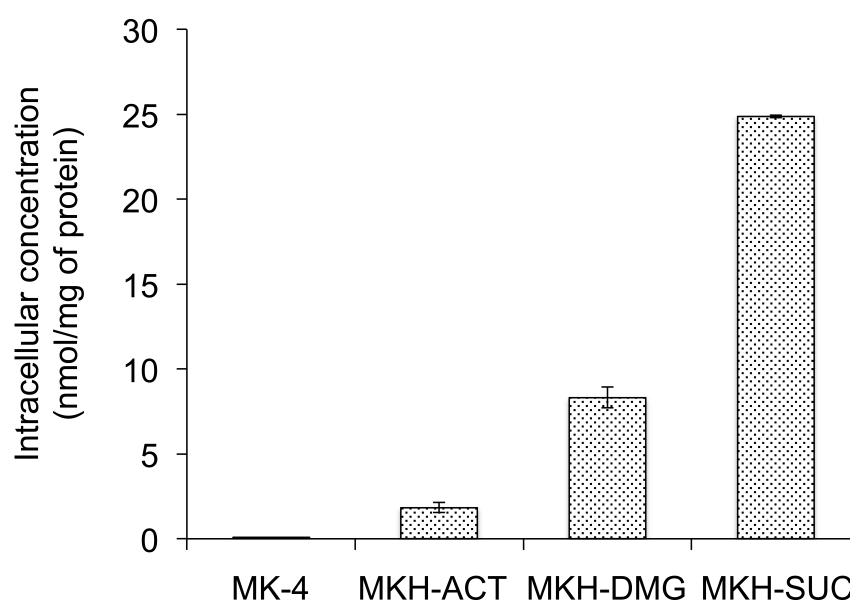


Figure 5-1-3. Uptake of MK-4 and MKH-derivatives into PLC/PRF/5 after 3 h treatment of 50  $\mu$ M MK-4 and MKH-derivatives.

Table 5-1. Hydrolysis of MKH-derivatives in PLC/PRF/5 cell homogenate

MKH-derivatives	$k \times 10^{-3} \text{ (h}^{-1}\text{)}$	Half-lives (h)
MKH-ACT	8.70	115
MKH-DMG	12.8	77.9
MKH-SUC	118	8.45

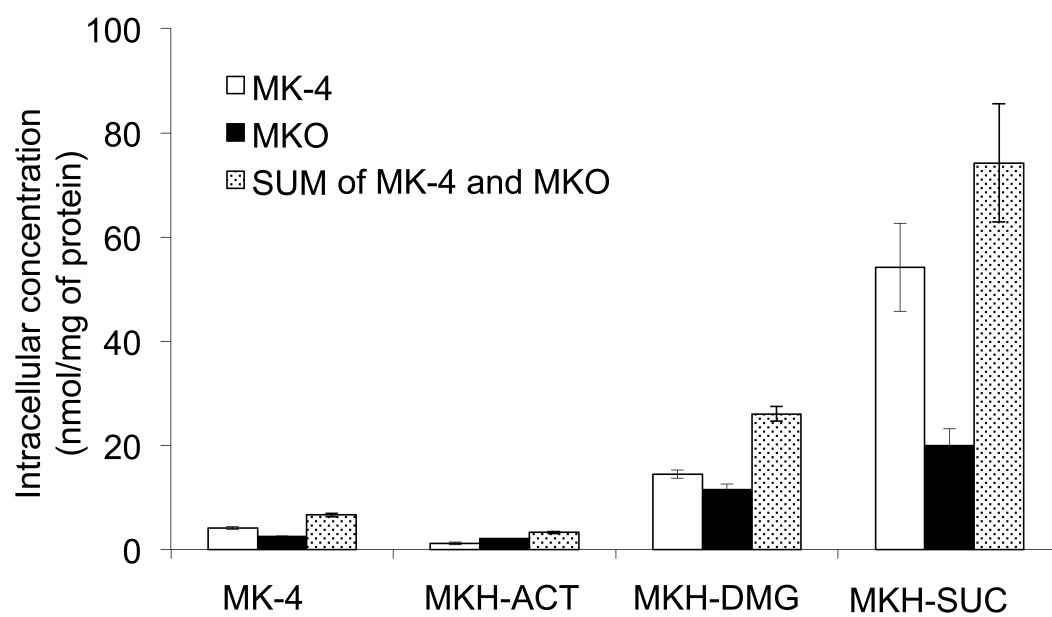


Figure 5-1-4. Intracellular concentrations of MK-4, MKO and the sum of these in PLC/PRF/5 cells treated with 50  $\mu$ M MK-4 and MKH derivatives for 24 h.

## 第二節 HCC 細胞に対する MKH ester type prodrug の増殖抑制効果に及ぼす promoiety の影響

前節において, promoiety が異なる MKH エステル誘導体による PLC/PRF/5 細胞内への MKH の送達性が大きく異なることを明らかにした. 本節では, MKH 送達の増殖抑制効果への影響を明らかにする目的で, PLC/PRF/5 細胞に対する MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG, MKH-SUC の増殖抑制効果を投与 72 時間後の細胞生存率から評価した (Fig. 5-2-1). さらに, MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG, MKH-SUC 投与 24 時間後の細胞周期関連タンパク質 CDK4 と Cyclin D1 の発現を Western blot 法を用いて解析した (Fig. 5-2-2).

Figure 5-2-1 から明らかな様に MKH-DMG と MKH-SUC は, PLC/PRF/5 細胞に対し投与 72 時間後において用量依存的に増殖抑制効果を示し,  $IC_{50}$  値はそれぞれ 32, 16  $\mu\text{M}$  であった. 一方, MK-4 と MKH-ACT 投与群では用いた投与量の濃度範囲において増殖抑制効果は観察されなかった. また CDK4 および Cyclin D1 の発現が MKH-SUC の 25  $\mu\text{M}$  以上の投与において顕著に抑制され (Fig. 5-2-2), MKH-DMG 投与では 50  $\mu\text{M}$  以上で観察されたことから, MKH-SUC は MKH-DMG よりも優れた増殖抑制効果を有することが明らかとなり, MKH-SUC による増殖抑制効果は MKH-DMG と同様に MKH を HCC 細胞内に送達することで増殖抑制効果を発揮したと考えられる. これらの結果は, MKH 送達が増殖抑制効果と対応しており, 速やかで効率的な MKH の送達が優れた増殖抑制効果的を発揮させることが強く示唆された.

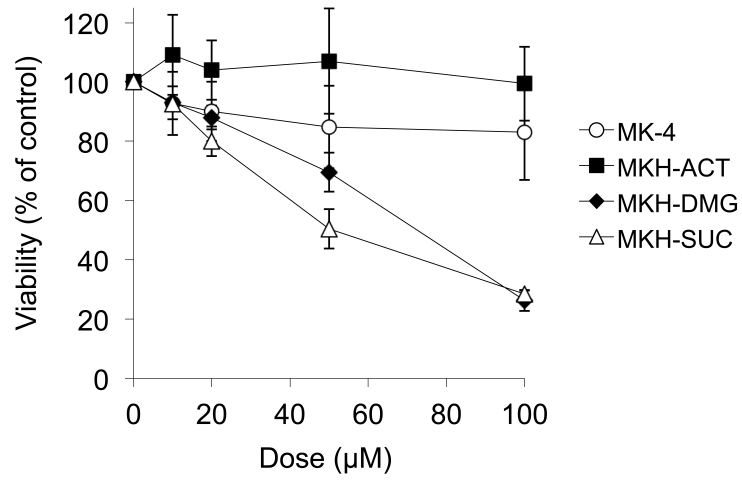
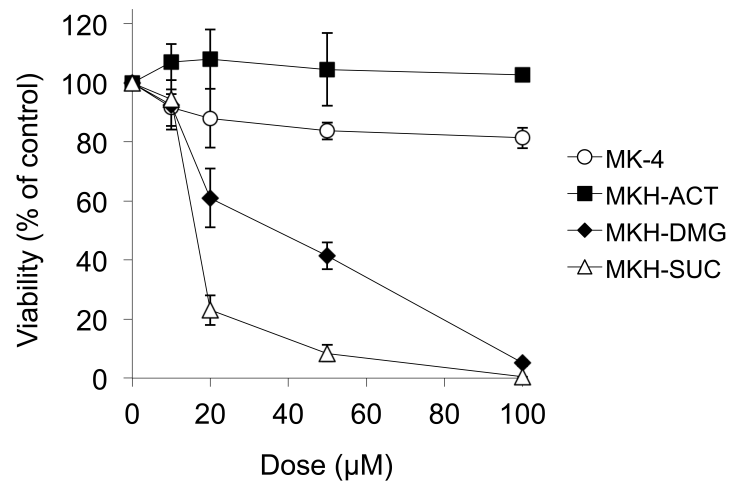
**A****B**

Figure 5-2-1. Growth inhibitory effect of MKH-derivatives against PLC/PRF/5 cells. The cells were treated with various concentrations of MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG or MKH-SUC for 48 h (A) or for 72 h (B).

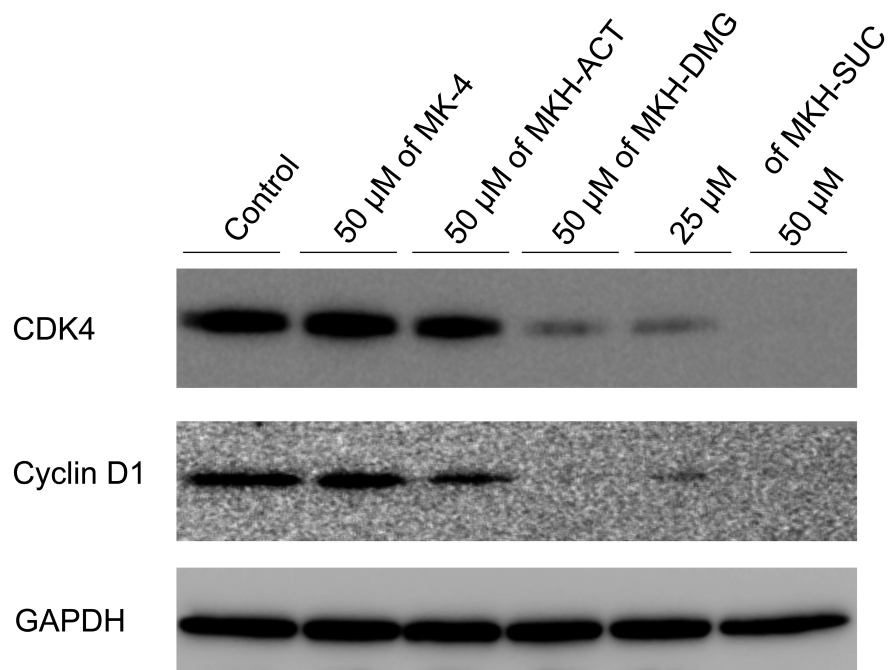


Figure 5-2-2. Effects of MKH-derivatives on expression of cell cycle regulatory proteins in PLC/PRF/5 cells. PLC/PRF/5 cells were treated with 50  $\mu$ M MK-4 or MKH-DMG for 24 h. Western blot analysis was performed using specific antibodies against CDK4, Cyclin D1 and GAPDH.

## 小括

本章において、次に示すことが明らかとなった。

- 1) MKH ester type prodrug による HCC 細胞内への MKH の送達は、初期に仮説したとおりに prodrug 自身の細胞内への取込みと、細胞内での MKH への再変換性に依存していることが明らかになった。
- 2) MKH-DMG よりも MKH-SUC が優れた MKH 送達性を有する MKH エステル誘導体であることを *in vitro* の細胞レベルで明らかにし、大きな期待が持てることが明らかになった。*In vivo* での効果評価は、投与形態における availability および増殖抑制効果の評価が必要であり、これからの課題である。

## 総括

肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) は根治療法後の再発率が非常に高いために長期予後が極めて悪いがんである。再発予防剤として長期投与に耐える安全性の高い menaquinone-4 (MK-4, vitamin K<sub>2</sub>) に, HCC の再発予防薬として期待が寄せられ, 大規模臨床試験が行われたが失敗の結果となった。一方, HCC 組織では正常組織と比較して vitamin K<sub>2</sub> レベルが低いこと, HCC 細胞では MK-4 取込み速度が正常肝細胞に比較して低いことが報告されている。よって, HCC 組織における MK-4 の availability の低さが効果発現を制限している可能性がある。Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP, PIVKA-II) は HCC の腫瘍マーカーであるが, vitamin K 依存性タンパク質プロトロンビンのカルボキシ化が不完全な異常プロトロンビンである。最近, DCP が増殖因子として癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなっており, DCP 産生抑制が HCC 治療における新薬開発の標的として注目されている。このような背景から, HCC 細胞中に MK-4 の活性体である menahydroquinone-4 (MKH) を HCC 細胞に効率よく送達することで, MK-4 の HCC の低い availability と DCP 生成が同時に克服でき, 効率的な HCC の増殖抑制が可能になると仮説を立てた。活性体 MKH は極めて酸化され易い化合物であるため, 直接治療に用いることは不可能である。私は, 本研究において世界で初めて, MKH の prodrug 化によって HCC 細胞内への効率的に MKH 送達し, 優れた HCC 増殖抑制効果を発揮させることを可能にした。

第一章では DCP 陽性 HCC 細胞 (PLC/PRF/5, Hep3B) および DCP 陰性細胞 (SK-Hep-1) への MKH-DMG の MKH 送達性を LC/MS-MS 法を用いた細胞内薬物定量によって評価した。MKH-DMG は 3 種の HCC 細胞において MKH-DMG として速やかに取込まれ 24 時間までに培養培地 MKH-DMG 濃度と平衡に達し, 細胞内において MKH に再変換 (加水分解) されることで, MKH の prodrug として機能することが明らかになった。細胞内への MKH 送達性については, MKH-DMG は MK-4 投与に比較して MKH の  $AUC_{0-72h}$  を約 3.5-15 倍高くでき, 効

率的な送達が示された。MKH-DMG は用いた投与液濃度 $\sim 100\ \mu\text{M}$ の範囲では、MKH-DMG 用量依存的に細胞内の MKH 送達量を高くすることが明らかとなった。DCP 陽性 HCC 株 PLC/PRF/5 細胞では、MKO の取込みは極めて優れており、MKO を MK-4 還元する過程を担う酵素は、細胞内 MKO 濃度が数十 nmol/mg protein 濃度で飽和しており、高濃度では MK-4 の供給は極めて低いことが明らかになった。

第二章では、MKH-DMG の DCP 陽性 HCC 細胞 (PLC/PRF/5, Hep3B) および DCP 陰性細胞 (SK-Hep-1) に対する増殖抑制効果を *in vitro* で評価し、MK-4 に比較して優れた増殖抑制効果を有することを明らかにした。MKH-DMG は DCP 陽性 HCC 細胞に対して  $10\ \mu\text{M}$  で DCP 産生を強く抑制し、この濃度では MKO が十分に産生されることから、DCP 陽性 HCC 細胞において MKH の送達性が低いことによって DCP が産生されていることが明らかとなった。MKH-DMG は MK-4 と比較して、効率的に増殖抑制効果を発揮し、 $\text{IC}_{50}$  をおよそ 1/18-1/4 に低下させた。その効果は用量依存的、時間依存的であり、MKH の高い送達性に起因することが強く示唆された。

第三章では、MKH-DMG の優れた増殖抑制効果が  $G_1$  arrest を介した apoptosis 誘導によるものであることを明らかにした。Western blot による解析では DCP 陽性 HCC 細胞 (PLC/PRF/5, Hep3B) および DCP 陰性細胞 (SK-Hep-1) のいずれの細胞においても、MKH-DMG 投与で細胞周期関連タンパク Cyclin D, CDK4, NF- $\kappa$ B を強く抑制した。フローサイトメトリーを用いた解析においても PLC/PRF/5 細胞に対して時間依存的な MKH-DMG の  $G_1$  arrest 誘導を示した。またカスパーゼ 3/7 活性の評価により、MKH-DMG は MK-4 と比較して低い投与濃度でカスパーゼ 3/7 活性を亢進し、用量依存的な apoptosis 誘導作用を持つことが明らかとなった。MKH-DMG の増殖抑制効果に関する、より上流の作用機構においては今後の詳細な検討が必要である。

第四章では, MKH-DMG の正常マウスへの経口投与において, MKH-DMG 自身が吸収されたのち加水分解を受けて MKH を送達していることを明らかにし, MKH の prodrug として機能することが明らかとなった. PLC/PRF/5 細胞を移植した脾-肝転移モデルマウスにおいて, 移植後 50 日のマウス肝湿重量および肝癌化面積のいずれも, 40  $\mu$ M の MKH-DMG 投与液を自由飲水させた MKH-DMG 群で Vehicle 群と比較し有意な抑制効果が観察されたことから, MKH-DMG の *in vivo* での HCC 抑制効果が明らかとなった. また, マウス血漿中の DCP レベルは Vehicle 群と比較し, MKH-DMG 群でほぼ完全に抑制された. 最近の研究で, DCP は HCC の自家製 (autologous) 成長因子であり, 癌の進展に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている. また DCP 産生が HCC の癌血管新生に寄与しており, DCP が HCC の予後を悪化させる因子として新薬開発の一つの標的と考えられていることから, MKH-DMG が DCP を効率的に抑制できることは HCC 患者の予後改善に少なからず貢献すると期待できる.

第五章では, prodrug の promoiety がカチオン性, 中性, アニオン性の 3 種類の MKH エステル誘導体を用いて, HCC 細胞内への MKH の送達性と増殖抑制効果の比較検討を行った. MKH の ester type prodrug としてカチオン性の MKH-DMG, 中性の MKH-ACT, アニオン性の MKH-SUC, および MK-4 の PLC/PRF/5 への 24 時間後の MKH 送達性は MKH-SUC > MKH-DMG > MKH-ACT  $\approx$  MK-4 の順に高く, MKH の効率的な送達は, 当初の仮説どおり, MKH prodrug 自身の高い細胞取込みと速やかな加水分解によるものであることが明らかとなった. MKH-DMG よりも MKH-SUC が優れた MKH 送達性を有する MKH エステル誘導体であることを *in vitro* の細胞レベルで明らかにし, 大きな期待が持てることが明らかになった. *In vivo* での効果評価は, 投与形態における availability および増殖抑制効果の評価が必要であり, これからの課題である.

これまでに述べてきた MKH prodrug は MK-4 と比べて非常に効率的に HCC 細胞中に MKH 送達と増殖効果を示すことが明らかであり, 優れた MKH 送達シス

テムとして機能することが明らかとなった。したがって、骨粗鬆症に用いられる MK-4 投与量に相当する MKH prodrug の投与量で格段に高い作用を発揮することが期待できる。MKH-DMG の MKH 送達後の最終的体内動態は MK-4 と同じ運命を辿ることから高い安全性を示すと考えられる。得られた結果は MKH 送達性改善が優れた HCC に対する抑制効果発現につながるとする当初の仮説を支持するものである。より詳細な効果評価と機構解明は今後の課題であるが、我々は MKH prodrug が優れた HCC 化学予防剤開発の新たなアプローチであると確信している。

## 実験の部

### 試薬

試薬は特記しない限りそのまま用いた.

acetic acid	和光純薬工業 (株)
acetic anhydride	和光純薬工業 (株)
Agarose S	和光純薬工業 (株)
Albumin, Bovine	和光純薬工業 (株)
ammonium acetate	和光純薬工業 (株)
Apoptosis Ladder Detection Kit	和光純薬工業 (株)
BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce)	Thermo Fisher Scientific Inc.
Blocking One	ナカライテスク (株)
bromophenol blue (BPB)	和光純薬工業 (株)
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega Co.
Cell Cycle Regulation Sample Kit	Cell Signaling Technology
Cell Titer-Glo Assay	Promega Co.
dimethyl sulfoxide (DMSO)	和光純薬工業 (株)
Dulbecco's modified Eagle's medium	Sigma Chemical Co.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Invitrogen Co.
ethanol	和光純薬工業 (株)
ethyl acetate	和光純薬工業 (株)
Fetal Bovine Serum	Invitrogen Co.
Glycerin	岩城製薬 (株)
HEPES	(株) 同仁化学研究所
hydrochloric acid	和光純薬工業 (株)
n-hexane	和光純薬工業 (株)
heparin sodium (ノボ・ヘパリン注 5 千単位/5 mL)	持田製薬 (株)
Immun-Blot™ PVDF Membrane for protein blotting	Bio-Rad Laboratories, Inc.
isoflurane (エスカイン吸入麻酔液)	マイラン製薬 (株)
isopropyl ether (蒸留して用いた)	和光純薬工業 (株)
LDH-Cytotoxic Test <sup>wako</sup>	和光純薬工業 (株)
menaquinone-4	エーザイ (株)

menaquinone-4 epoxide	エーザイ (株)
2-mercaptoethanol	和光純薬工業 (株)
methanol	和光純薬工業 (株)
NP-40 (IGEPAL CA-630)	Sigma-Aldrich Co.
penicillin streptomycin	Invitrogen Co.
Procion Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Propidium iodide, minimum 95% (HPLC)	Sigma-Aldrich Co.
pyridine	Sigma-Aldrich Co.
Ribonuclease A	Sigma-Aldrich Co.
SDS	和光純薬工業 (株)
sodium chloride	和光純薬工業 (株)
sodium dehydrogen phosphate dehydrate	和光純薬工業 (株)
sodium deoxycholate	和光純薬工業 (株)
sodium sulfate (anhydrous)	和光純薬工業 (株)
succinic anhydride	和光純薬工業 (株)
SuperSep ACE 5-20%, 13well	和光純薬工業 (株)
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	和光純薬工業 (株)
10×Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc.
TypLE™ Express	Gibco (Life Technologies)
Tween 20	関東化学 (株)
<u>細胞</u>	
HepG2	理化学研究所
Hep3B	第日本製薬 (株)
PLC/PRF/5	ヒューマンサイエンス振興財団
SK-Hep-1	第日本製薬 (株)
<u>抗体</u>	
CDK4	Cell Signaling Technology
Cyclin D1	Cell Signaling Technology
Cyclin D3	Cell Signaling Technology
GAPDH	Cell Signaling Technology

## 細胞と細胞培養

ヒト肝細胞癌 (HCC) 細胞は PLC/PRF/5, HepG2, Hep3B, SK-Hep-1 の各細胞を用いた。以上の HCC 細胞は 37°C, 5% 加湿大気圧下で継代培養することにより維持した。培地は非働化した 10% Fetal bovine serum (FBS) と 1% penicillin-streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いた。

## 動物実験

実験動物は、プラスチックケージの中に、室温  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 時間の明暗サイクル (7:00AM 点灯) の動物室で飼育した。なお、餌は CE-2 (クレア, 東京) を用い、水は自由に摂取できるようにした。実験動物の取り扱いは、福岡大学動物実験委員会 (Experimental Animal Care and Use Committee) に準じた。

## **第一章の実験**

### MKH-DMG 投与後の細胞中 MKH-DMG, MK-4 および MKO 濃度の測定

MK-4 と MKO は ethanol に溶解し, MKH-DMG は MilliQ 水に溶解した。それぞれの薬物のストック溶液 (50 mM) は培養培地で適宜希釈し, ethanol の最終濃度は 0.2% 以下であった。6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well の密度で HCC 細胞 (PLC/PRF/5, Hep3B, SK-Hep-1) を播種し, 48 時間培養した。培地を除き薬物添加培地に交換し, 一定時間薬物を曝露させた。薬物添加培地を除き, 室温の PBS で 3 回洗浄し, 細胞をスクレーパーで剥離し, 1 mL の PBS 中に回収し, ソニケートした。細胞ホモジネート液に 1 mL の methanol と 3 mL の n-hexane (cell sample: methanol: n-hexane containing internal standard of  $\gamma$ -tocotrienol = 1:1:3) を加え, 2 分間 vortex した後,  $4^{\circ}\text{C}$ , 3000 rpm で 10 分間遠心分離した。n-hexane 層を回収し, 窒素ガスで濃縮乾固した。残渣に methanol を加えて再溶解し, LC/MS-MS 分析に供した。細胞ホモジネート液のタンパク濃度は BCA protein assay kit を用いて測定した。

### LC/MS-MS 分析

LC/MS-MS 装置は 4000QTRAP LC-MS/MS system (AB Sciex, Framingham, MA) と Prominence UFLC system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) を用いた。試料注入量は 10  $\mu\text{L}$  とし, 逆相クロマトグラフィにより分離した。カラムは CAPCELL PACK C18 MG-II (3  $\mu\text{m}$ , 2.0 mm  $\times$  100 mm, Shiseido, Tokyo, Japan) を用いた。移動相は 10 mM ammonium acetate, 0.1% acetic acid 含有メタノール溶液を用いてアイソクラティック分析した。流速は 0.4 mL/min, UV 波長は 240 nm, カラムオーブンは  $40^{\circ}\text{C}$  に設定した。イオン化法は Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) 法を用い, ポジティブイオンモードで測定した。化合物の同定と定量は

MS-MS-multiple reaction monitoring (MRM) モードを用いた。トランジションイオンは以下の通りに設定した: MK-4 adduct  $[M+H]^+$  は  $m/z$  445 $\rightarrow$ 187, MKO adduct  $[M+H]^+$  は  $m/z$  461 $\rightarrow$ 161, MKH-DMG adduct  $[M+H]^+$  は  $m/z$  617 $\rightarrow$ 481, MK-4 adduct  $[M+H]^+$  は  $m/z$  411 $\rightarrow$ 151. 保持時間は以下の通りであった: MK-4, 2.5 min; MKO, 1.9 min; MKH-DMG, 1.4 min; and  $\gamma$ -tocotrienol, 1.7 min.

## 第二章の実験

### 細胞増殖抑制効果試験

生存細胞数は Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay 試薬を用いて測定した。

PLC/PRF/5, Hep3B, SK-Hep-1 の各細胞は不透明な 96-well plate に  $5.0 \times 10^3$  cells/well となるようにそれぞれ 100  $\mu$ L の培地に懸濁させて播種し, 48 時間培養した。培地を除き薬物添加培地と交換し, 投与後 96 時間までの生細胞数を試薬のプロトコールに従って測定した。IC<sub>50</sub> 値は GraphPad Prism (version 6.0) を用いて, log [drug] vs. normalized response-variable slope 解析によって算出した。

## 第三章の実験

### ウェスタンブロッティングによる細胞周期関連タンパク質の解析

HCC 細胞を 6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well となるように播種し, 48 時間培養した。培地を除き 60  $\mu$ M の MK-4 または MKH-DMG 添加培地に交換し, 24, 48, 72 または 96 時間培養した。薬物添加培地を除き, プロテアーゼインヒビターカクテルを含む RIPA buffer を用いて細胞を溶解し, その一部は BCA タンパク測定に供した。細胞ライセートは 12% SDS-PAGE ゲル上で電気泳動し, PVDF 膜に転写した。膜は Blocking One buffer でインキュベートしたのち, 以下の一次抗体を処理した: mouse anti-CDK4 (1:2000), mouse anti-cyclin D1 (1:2000), mouse anti-cyclin D3 (1:2000), rabbit anti-NF- $\kappa$ B (1:10000). 一次抗体処理後, 膜を TBST buffer でリンスし, peroxidase-conjugated goat anti-mouse (or rabbit) IgG ( $\gamma$ -chain specific) (1:20000) で処理した。反応性の抗体タンパク質は ECL Advance Western Blotting Detection kit を用いて発光させた。すべての膜は常法に従ってストリッピングを行い mouse anti-GAPDH (40000) を処理し, GAPDH 発現量を測定した。

### フローサイトメトリーによる細胞周期解析

PLC/PRF/5 細胞を 6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well となるように播種し, 48 時間培養した。培地を除き 60  $\mu$ M の MK-4 または MKH-DMG 添加培地に交換し, 12 または 48 時間培養した。細胞を回収後冷 PBS で洗浄したのち遠心し  $4.0 \times 10^5$  cell のペレットとし, 1 mL の 70%

ethanol を加えて氷冷下 1 時間かけて固定した。Ethanol を除き、細胞を冷 PBS で 2 度洗ったのち、4 mg の RNAase を含有した 1 mL の 5%BSA-PBS 溶液に細胞を懸濁し 37°C で 50 分間インキュベートした。細胞懸濁液は 50  $\mu$ L の propidium iodide (PI) の PBS 溶液 (1 mg/mL) で染色し、20 分間氷冷した。細胞懸濁液を再び 5%BSA-PBS 溶液で 2 度洗い、750  $\mu$ L の冷 5%BSA-PBS 溶液に細胞を懸濁した。細胞サンプルは EPICS flow cytometry (Beckman-Coulter, Brea, CA) を用いてそれぞれの細胞周期の細胞割合を測定した。

#### カスパーゼ 3/7 活性測定

カスパーゼ 3/7 活性は Caspase Glo 3/7 assay (Promega) を用いて測定した。PLC/PRF/5 細胞は不透明な 96-well plate に  $5.0 \times 10^3$  cells/well となるようにそれぞれ 100  $\mu$ L の培地に懸濁させて播種し、48 時間培養した。培地を除き MK-4 と MKH-DMG の薬物添加培地と交換し、72 時間後のカスパーゼ 3/7 活性を試薬のプロトコールに従って測定した。

#### DNA 断片化の検出

Hep3B 細胞を 6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well となるように播種し、48 時間培養した。培地を除き 60  $\mu$ M の MK-4 または MKH-DMG 添加培地に交換し、48 または 72 時間培養した。細胞を回収後冷 PBS で洗浄、遠心して上清を除いたペレットをサンプルとした。DNA 断片化の検出にはアポトーシスラダー検出キット<sub>ラダー</sub>を用いた。方法はキットのプロトコールに従い、キットに含まれる試薬に関しては下線を引いて区別した。細胞ペレットに enzyme reaction solution 180  $\mu$ L, enzyme activator solution 20  $\mu$ L, RNase solution 10  $\mu$ L, protein digestion enzyme solution 10  $\mu$ L を添加し、懸濁した後、50°C で 30 分間インキュベートした。DNA extraction solution を 300  $\mu$ L 添加し転倒混和後、イソプロパノール 500  $\mu$ L 添加し転倒混和、15 分間静置した。10000  $\times$ g で 10 分間遠心、上清を除き、70%エタノールを 1 mL 加えて混合し、10000  $\times$ g で 5 分間遠心、上清を除き再度 70%エタノールを 1 mL 加えて繰り返し、残渣を TE buffer に溶解した。DNA サンプル 10  $\mu$ L に loading buffer 2  $\mu$ L を混合後 2%アガロースゲルにアプライし、また ladder marker 10  $\mu$ L をアプライして泳動バッファーとして TAE buffer を用いて 100V、40 分間電気泳動した。DNA の蛍光染色は、TAE buffer で SYBR Green I を 10000 倍に希釈し、暗所でゲルを 30-40 分間浸漬したのち、UV で照射し撮像した。

#### DCP 測定

PLC/PRF/5 細胞を 6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well となるように播種し、48 時間培養した。培地を除き 60  $\mu$ M の MK-4 または MKH-DMG 添加培地に交換し、72 時間培養した。薬物処理後の PLC/PRF/5 細胞の培地中の DCP 濃度を electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

(Picolumi PIVKA-II, 三光純薬) を用いて測定した。ECLIA は DCP のマウスモノクローナル抗体を固相にコーティングし、ルテニウム標識したラビットポリクローナル抗体を用いている。脾肝転移モデルマウスの血漿中の DCP レベルも ECLIA で同様に測定した。

## 第四章の実験

### MKH-DMG のマウス経口投与における血漿および肝臓中動態

動物は雄性 ICR マウス (7 週齢, 九動) を使用した。マウスはネット敷ケージで一晩絶食させ、水は自由摂取させた。MKH-DMG の経口投与における投与量は 38.6 mg/kg (MK-4 等量で 25 mg/kg) とした。投与容積はマウス体重 10 g あたり 0.1 mL とし、経ロゾンデを用いて強制経口投与した。投与後経時的に、イソフルラン麻酔下でヘパリン処理したツベルクリン注射器で心臓採血し、頸椎脱臼したのち、肝臓を摘出した。肝臓は二倍量の生理食塩水を加えて、氷冷下 POLYTRON ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、-80°C で保存した。血漿と肝臓サンプルは上述の細胞からの抽出法と同様に行なった。血漿および肝臓中濃度の薬物動態パラメータはモーメント解析から求めた。最高濃度 ( $C_{\max}$ ) および  $C_{\max}$  に達する時間 ( $t_{\max}$ ) は観測データを採用した。

### MKH-DMG の脾肝転移モデルマウスを用いた *in vivo* 効果評価

雄性 Balb/c *nu/nu* マウス (5 週齢, 日本 SLC) を用いた。39 匹のマウスを以下の 3 群に分けた: 1) vehicle 群, n=15; 2) MKH-DMG 群, n=15; sham 群, n=9. HCC 細胞の移植は Fidler の方法を用い、イソフルラン麻酔下で、PLC/PRF/5 細胞 ( $1.0 \times 10^6$  cells/0.05 mL of PBS) を vehicle 群と MKH-DMG 群のヌードマウスの脾臓に注入した。sham 群は HCC 移植を行わず、手術のみとした。MKH-DMG は飲水中に溶解し 40  $\mu$ M とし、自由に飲水させた。MKH-DMG の投与量は飲水量から換算するとおよそ 0.2  $\mu$ mol/head/day であった。飲水経口投与はマウス脾臓への HCC 細胞移植の 6 日前に開始した。飲水ボトルはアルミホイルで遮光し、2 日毎に交換した。移植後 50 日にマウスをイソフルランで麻酔し、ヘパリン処理したツベルクリン注射器で心臓採血し、頸椎脱臼した。血液を 3000 rpm, 10 分間遠心し、血漿を得た。肝臓を採取、湿重量を測定し、肝臓の両面 (横隔膜側と腹部側) を色調補正デジタルカメラ撮影した。肝臓の癌化面積率を算出するために ImageJ ソフトウェアによる画像解析を行なった。サンプル処理は決まった手順で行ない、前癌性の小結節や組織における腫瘍性の変化から癌化部位を決定した。

### 統計処理

統計処理は JMP 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC) ソフトウェアを用いて行なった。有意差は、一元配置の分散分析を用いた Tukey-Kramer's test を用いて試験した。  $P < 0.05$  の場合において統計的に有意であるとみなした。

## 第五章の実験

### Menahydroquinone-4 1,4-bis-hemisuccinate (MKH-SUC) の合成

MK-4 2 g (4.55 mmol) を isopropyl ether (IPE) 40 mL に溶解させ、 $\text{NaBH}_4$  を methanol に溶解して添加、溶液の黄色が消失後、ただちにアルゴンガスを飽和させた精製水 100 mL を加え、 $\text{NaCl}$  で飽和後、IPE 60 mL で抽出し、更に水層に IPE 100 mL を加えて可溶画分を抽出、IPE 層を合わせて sodium sulfate (anhydrous) で脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣に *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (8.97 mmol), succinic anhydride (18.0 mmol) を加え、IPE/dioxane (6/4, v/v) 100 mL に溶解して、室温で3時間攪拌後、50-60 °C に加熱しながら2時間反応させ、更に室温で10時間反応させた。反応液に精製水 100 mL を加え、IPE 層を分離し、sodium sulfate (anhydrous) で乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣を IPE に懸濁し、遠心して得た沈殿物に ethylacetate 100 mL と精製水 100 mL を加え ethyl acetate 可溶画分を抽出し、sodium sulfate (anhydrous) で脱水後、溶媒を減圧留去した。残渣を IPE に懸濁し不溶物を ethyl acetate で再結晶して、MKH-SUC を得た。

### Menahydroquinone-4 1,4-bis-acetate (MKH-ACT) の合成

MK-4 1 g (2.25 mmol) を ethyl acetate 40~50 mL に溶解させ、 $\text{NaBH}_4$  を methanol に溶解して添加、溶液の黄色が消失後、ただちにアルゴンガスを飽和させた蒸留水 200 mL を加え、 $\text{NaCl}$  で飽和後、ethyl acetate で抽出し、ethyl acetate 層を sodium sulfate (anhydrous) で乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた MKH を少量の dry pyridine に溶解後、無水酢酸を 1.6 mL (16.9 mmol) 添加し室温で24時間攪拌した。MKH-ACT の合成確認は TLC により行なった (TLC プレート; MERCK Silica gel 60 F254, 展開溶媒; n-hexane/ethyl acetate (9/1,v/v), 検出; 10% $\text{H}_2\text{SO}_4$  及び加熱発色)。反応液に ethyl acetate を少量加えて析出した沈殿を濾別し、pyridine 臭が無くなるまでろ液の溶媒を減圧留去した。残渣は、順相 Flash クロマトグラフィーにより、分離精製した (カラム; FLASH40+M, 40 mm×150 mm (バイオタージ・ジャパン), 溶離溶媒; n-hexane/ethyl acetate (95/5,v/v)。得られた画分を ethanol で再結晶し、MKH-ACT を得た。

### MKH エステル誘導体投与後の細胞中 MKH エステル誘導体および MKO, MK-4 濃度の測定

上述と同様に MK-4 は ethanol, MKH-DMG は MilliQ 水に溶解した。MKH-ACT は ethanol に溶解し、MKH-SUC は DMSO に溶解させた。それぞれの薬物のストック溶液 (50 mM) は培

養培地で適宜希釈し, ethanol および DMSO の最終濃度は 0.1% であった. 6-well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well の密度で PLC/PRF/5 細胞を播種し, コンフルエントまで培養させた. 培地を除き薬物添加培地に交換し, 一定時間薬物を曝露させた. 薬物添加培地を除き, 冷 PBS で 3 回洗浄し, 細胞をスクレーパーで剥離させ, 1 mL の PBS 中に回収し, ソニケートした. 細胞ホモジネート液に 1 mL の methanol と 3 mL の n-hexane (cell sample: methanol: n-hexane containing internal standard of  $\gamma$ -tocotrienol = 1:1:3) を加え, 2 分間 vortex した後, 4°C, 3000 rpm で 10 分間遠心分離した. n-hexane 層を回収し, 窒素ガスで濃縮乾固した. 残渣に methanol を加えて再溶解し, LC/MS-MS および LC/UV 分析に供した. UV 波長は 240 nm に設定した. 細胞ホモジネート液のタンパク濃度は BCA protein assay kit を用いて測定した.

#### HCC 細胞ホモジネートを用いた MKH エステル誘導体の加水分解実験

6-well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well の密度で PLC/PRF/5 細胞を播種し, コンフルエントまで培養した. 細胞を PBS で洗浄し, 細胞を剥離し PBS 中に回収後, 氷冷下でソニケートした. 細胞ホモジネートに薬物ストック溶液をスパイクし, 反応液初濃度を 50  $\mu$ M とした. 褐色マイクロ試験管に分注し, 37°C でインキュベートし反応を開始させ, 経時的に抽出処理して, HPLC で薬物濃度を測定した. 加水分解速度はエステルの消失と MK-4 の生成をモニターして求めた.

#### 細胞増殖抑制効果試験

生存細胞数 (率) は Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay 試薬を用いて測定した. PLC/PRF/5 細胞を不透明な 96-well plate に  $5.0 \times 10^3$  cells/well となるようにそれぞれ 100  $\mu$ L の培地に懸濁させて播種し, 48 時間培養した. 培地を除き  $\sim 100$   $\mu$ M の MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG または MKH-SUC 添加培地と交換し, 24, 48 または 72 時間後の生細胞数を測定した.  $IC_{50}$  値は GraphPad Prism (version 6.0) を用いて, log [drug] vs. normalized response-variable slope 解析によって算出した.

#### ウエスタンブロッティングによる細胞周期関連タンパク質の解析

PLC/PRF/5 細胞を 6-well plate に  $1.5 \times 10^5$  cells/well となるように播種し, 48 時間培養した. 培地を除き 50  $\mu$ M の MK-4, MKH-ACT, MKH-DMG ならびに 25, 50  $\mu$ M の MKH-SUC 添加培地に交換し, 24 時間培養した. 薬物添加培地を除き, 上述の細胞抽出を行ない, 以下の一次抗体で処理した: mouse anti-CDK4 (1:2000), mouse anti-cyclin D1 (1:2000). 常法に従ってストリッピングを行ない, GAPDH (1:40000) を測定した.

## 引用論文

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
2. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2011;365:1118-1127.
3. Bosch FX, Ribes J, Cleries R, Diaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2005;9:191-211, v.
4. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007;132:2557-2576.
5. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:S20-37.
6. Ikeda K, Arase Y, Saitoh S, Kobayashi M, Suzuki Y, Suzuki F, Tsubota A, et al. Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor-A prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 2000;32:228-232.
7. Nishiguchi S, Shiomi S, Nakatani S, Takeda T, Fukuda K, Tamori A, Habu D, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in patients with chronic active hepatitis C and cirrhosis. *Lancet* 2001;357:196-197.
8. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099-7109.
9. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378-390.
10. Eskens FA, Verweij J. The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; a review. *Eur J Cancer* 2006;42:3127-3139.
11. Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer* 2007;7:475-485.
12. Bouzahzah B, Nishikawa Y, Simon D, Carr BI. Growth control and gene expression in a new hepatocellular carcinoma cell line, Hep40: inhibitory actions of vitamin K. *J Cell Physiol*

1995;165:459-467.

13. Wang Z, Wang M, Finn F, Carr BI. The growth inhibitory effects of vitamins K and their actions on gene expression. *Hepatology* 1995;22:876-882.
14. Otsuka M, Kato N, Shao RX, Hoshida Y, Ijichi H, Koike Y, Taniguchi H, et al. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* 2004;40:243-251.
15. Ozaki I, Zhang H, Mizuta T, Ide Y, Eguchi Y, Yasutake T, Sakamaki T, et al. Menatetrenone, a vitamin K2 analogue, inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by suppressing cyclin D1 expression through inhibition of nuclear factor kappaB activation. *Clin Cancer Res* 2007;13:2236-2245.
16. Kaneda M, Zhang D, Bhattacharjee R, Nakahama K, Arai S, Morita I. Vitamin K2 suppresses malignancy of HuH7 hepatoma cells via inhibition of connexin 43. *Cancer Lett* 2008;263:53-60.
17. Hitomi M, Yokoyama F, Kita Y, Nonomura T, Masaki T, Yoshiji H, Inoue H, et al. Antitumor effects of vitamins K1, K2 and K3 on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2005;26:713-720.
18. Orimo H, Shiraki M, A. T, A. M, T. F, Ohata M. Effects of menatetrenone on the bone and calcium metabolism in osteoporosis: a double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Metab* 1998;16:106-112.
19. Shiraki M, Shiraki Y, Aoki C, Miura M. Vitamin K2 (menatetrenone) effectively prevents fractures and sustains lumbar bone mineral density in osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15:515-521.
20. Knapen MH, Schurgers LJ, Vermeer C. Vitamin K2 supplementation improves hip bone geometry and bone strength indices in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007;18:963-972.
21. Inoue T, Fujita T, Kishimoto H, Makino T, Nakamura T, Nakamura T, Sato T, et al. Randomized controlled study on the prevention of osteoporotic fractures (OF study): a phase IV clinical study of 15-mg menatetrenone capsules. *J Bone Miner Metab* 2009;27:66-75.
22. Habu D, Shiomi S, Tamori A, Takeda T, Tanaka T, Kubo S, Nishiguchi S. Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA* 2004;292:358-361.
23. Mizuta T, Ozaki I, Eguchi Y, Yasutake T, Kawazoe S, Fujimoto K, Yamamoto K. The effect of menatetrenone, a vitamin K2 analog, on disease recurrence and survival in patients with hepatocellular carcinoma after curative treatment: a pilot study. *Cancer* 2006;106:867-872.

24. Yoshida H, Shiratori Y, Kudo M, Shiina S, Mizuta T, Kojiro M, Yamamoto K, et al. Effect of vitamin K2 on the recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011;54:532-540.
25. Huisse MG, Leclercq M, Belghiti J, Flejou JF, Suttie JW, Bezeaud A, Stafford DW, et al. Mechanism of the abnormal vitamin K-dependent gamma-carboxylation process in human hepatocellular carcinomas. *Cancer* 1994;74:1533-1541.
26. Li ZQ, He FY, Stehle CJ, Wang Z, Kar S, Finn FM, Carr BI. Vitamin K uptake in hepatocytes and hepatoma cells. *Life Sci* 2002;70:2085-2100.
27. Weitz IC, Liebman HA. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. *Hepatology* 1993;18:990-997.
28. Koike Y, Shiratori Y, Sato S, Obi S, Teratani T, Imamura M, Yoshida H, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients. *Cancer* 2001;91:561-569.
29. Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, et al. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005;280:6409-6415.
30. Matsubara M, Shiraha H, Kataoka J, Iwamuro M, Horiguchi S, Nishina S, Takaoka N, et al. Des-gamma-carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1602-1608.
31. Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des-gamma-carboxyprothrombin. *Liver Int* 2011;31:22-35.
32. Murata K, Suzuki H, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Sakamoto A. Cytoskeletal changes during epithelial-to-fibroblastoid conversion as a crucial mechanism of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2009;35:1005-1014.
33. Okuda H, Obata H, Nakanishi T, Furukawa R, Hashimoto E. Production of abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) by hepatocellular carcinoma. A clinical and experimental study. *J Hepatol* 1987;4:357-363.
34. Furukawa M, Nakanishi T, Okuda H, Ishida S, Obata H. Changes of plasma des-gamma-carboxy prothrombin levels in patients with hepatocellular carcinoma in response to vitamin K. *Cancer* 1992;69:31-38.
35. Binkley NC, Suttie JW. Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J Nutr* 1995;125:1812-1821.

36. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood* 1999;93:1798-1808.
37. Stafford DW. The vitamin K cycle. *J Thromb Haemost* 2005;3:1873-1878.
38. Westhofen P WM, Marinova M, Hass M, Kirfel G, Müller J, Bevans CG, Müller CR, Oldenburg J. Human vitamin K 2,3-epoxide reductase complex subunit 1-like 1 (VKORC1L1) mediates vitamin K-dependent intracellular antioxidant function. *J Biol Chem* 2011;286:15085-15094.
39. Hallgren KW, Qian W, Yakubenko AV, Runge KW, Berkner KL. r-VKORC1 expression in factor IX BHK cells increases the extent of factor IX carboxylation but is limited by saturation of another carboxylation component or by a shift in the rate-limiting step. *Biochemistry* 2006;45:5587-5598.
40. Takata J, Karube Y, Hanada M, Matsunaga K, Matsushima Y, Sendo T, Aoyama T. Vitamin K prodrugs: 1. Synthesis of amino acid esters of menahydroquinone-4 and enzymatic reconversion to an active form. *Pharm Res* 1995;12:18-23.
41. Takata J, Karube Y, Hanada M, Matsunaga K, Matsushima Y, Sendo T, Oishi R. Vitamin K prodrugs: 2. water-soluble prodrugs of menahydroquinone-4 for systemic site-specific delivery. *Pharm Res* 1995;12:1973-1979.
42. Liu W, Nakamura H, Yamamoto T, Ikeda N, Saito M, Ohno M, Hara N, et al. Vitamin K2 inhibits the proliferation of HepG2 cells by up-regulating the transcription of p21 gene. *Hepatol Res* 2007;37:360-365.
43. Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, Namisaki T, et al. Combination of vitamin K2 and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates the liver enzyme-altered preneoplastic lesions in rats via angiogenesis suppression. *J Hepatol* 2005;42:687-693.
44. Matsumoto K, Okano J, Nagahara T, Murawaki Y. Apoptosis of liver cancer cells by vitamin K2 and enhancement by MEK inhibition. *Int J Oncol* 2006;29:1501-1508.
45. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2002;2:301-310.
46. Kim HJ, Hawke N, Baldwin AS. NF-kappaB and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* 2006;13:738-747.
47. Li Z, Wang C, Prendergast GC, Pestell RG. Cyclin D1 functions in cell migration. *Cell Cycle* 2006;5:2440-2442.
48. Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi J, Romero K, Pham H, et al. Vitamin K2

regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-43927.

49. Zhou C, Tabb MM, Nelson EL, Grun F, Verma S, Sadatrafiei A, Lin M, et al. Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF-kappaB signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J Clin Invest* 2006;116:2280-2289.

50. Ohsaki Y, Shirakawa H, Hiwatashi K, Furukawa Y, Mizutani T, Komai M. Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006;70:926-932.

## 掲載論文

本論文の内容は下記の雑誌に掲載されました。

Shuichi Setoguchi, Daisuke Watase, Kazuhisa Matsunaga, Misa Matsubara, Yohei Kubo, Mariko Kusuda, Nami Nagata-Akaho, Munechika Enjoji, Manabu Nakashima, Morishige Takeshita, Yoshiharu Karube, and Jiro Takata.

**Enhanced antitumor effects of novel intracellular delivery of an active form of menaquinone-4, menahydroquinone-4, into hepatocellular carcinoma.**

*Cancer Prevention Research* February 2015 8:129-138

Published OnlineFirst November 21, 2014

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究の機会をいただき，終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました福岡大学薬学部創剤学教室 高田 二郎 教授に衷心より感謝の意を表します．

併せて，本論文を査読して頂き，貴重な御意見，御校閲を賜りました福岡大学薬学部免疫学教室 中島 学 教授ならびに同大学薬学部創剤学教室 加留部 善晴 教授，松永 和久准教授に深謝致します．

本研究に際し多大なる御助言，御協力を賜りました福岡大学医学部病理学教室 竹下 盛重 教授ならびに福岡大学薬学部臨床薬物治療学教室 遠城寺 宗近 教授に厚く御礼申し上げます．

福岡大学薬学部創剤学教室において本研究に従事されてきた方々，種々の形で本研究に御協力頂いた諸氏に深く感謝申し上げます．