

# マクロファージの活性化を制御する大豆成分Soyasapogenolの ガン治療への応用研究

藤原章雄\*<sup>1</sup>・菰原義弘<sup>1</sup>・大西紘二<sup>1</sup>・池田 剛<sup>2</sup>・竹屋元裕<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野

<sup>2</sup>崇城大学薬学部薬学科生薬学

## Research of Soyasapogenol Regulating Macrophage Activation for Cancer Therapy

Yukio FUJIWARA\*<sup>1</sup>, Yoshihiro KOMOHARA<sup>1</sup>, Koji OHNISHI<sup>1</sup>,  
Tsuyoshi IKEDA<sup>2</sup> and Motohiro TAKEYA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical Sciences,  
Kumamoto University, Kumamoto 860-8556

<sup>2</sup>Department of Natural Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Sojo University,  
Kumamoto 860-0082

### ABSTRACT

Tumor-associated macrophages (TAMs) polarized to the M2 phenotype promote tumor cell proliferation and are associated with a poor prognosis in patients. We previously revealed that corosolic acid and oleanolic acid, triterpenoid compounds, inhibit the M2 polarization of human monocyte-derived macrophages (HMDM). In the present study, we found that a crude extract of soybeans and soyasapogenol A and B, triterpenoid compounds, contained in soybeans significantly inhibited the expression of CD163, one of the phenotype markers of M2 macrophages, as well as suppressed the secretion of IL-10, one of the anti-inflammatory cytokines preferentially produced by M2 macrophages, thus suggesting that soyasapogenol A and B suppresses the M2 polarization of macrophages. Soyasapogenol A and B also inhibited the proliferation of U373 human glioblastoma cells and SaOS2 human osteosarcoma cells, and the activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in both human macrophages and tumor cells. These results indicate that soyasapogenol A and B regulates the macrophages activation and suppresses tumor cell proliferation by inhibiting STAT3 activation. Furthermore, oral administration of soyasapogenol B significantly suppressed both subcutaneous tumor development and lung metastasis in a LM8 tumor-bearing mouse model. Therefore, soyasapogenols may represent candidate agents that can be used for

\*〒860-8556 熊本市本荘1-1-1

Key words : macrophage, pSTAT3, soyasapogenol, osteosarcoma, glioma

日本人の2人に1人は「ガン」に罹患すると言われて  
いる。「ガン」は早期発見・早期治療により完治する  
可能性は高いが実際には進行した状態で発見されるこ  
とが多く、運良く手術で切除出来たとしても数年後に  
再発する場合が多い。「ガン」は一度再発・転移する  
と治療抵抗性であり死に至る可能性が高くなる。しか  
し、抗腫瘍免疫が活性化されている場合には再発しに  
くいため、抗腫瘍免疫の賦活化は、ガン治療や再発予  
防にとって重要な課題である。近年、ガン患者におけ  
る免疫抑制の原因としてミエロイド系細胞が注目され  
ており、以前から、ガン組織やガン患者の血液中には  
骨髄由来ミエロイド系細胞（マクロファージ、単球、  
好中球）が増加していることが知られている。近年、  
このミエロイド系細胞であるマクロファージの活性化  
過程には、従来の古典的活性化経路に加えてオルタナ  
ティブ活性化経路が存在することが明らかとなってい  
きた。すなわちTh1タイプのサイトカインで刺激を受  
けた炎症惹起性の古典的活性化マクロファージ（M1）  
に加えて、Th2タイプのサイトカインによって刺激さ  
れ抗炎症性に働くオルタナティブ活性化マクロファ  
ージ（M2）が存在し、マクロファージはその活性化経  
路の違いによって2種類に大別される<sup>1-4)</sup>。また、腫  
瘍組織に浸潤するマクロファージは、従来からTumor  
Associated Macrophage (TAM) として注目されてお  
り、TAMに関しては、M2 マクロファージが腫瘍組  
織での腫瘍血管の形成に関与すると共に、IL-10等の  
免疫抑制分子を産生して抗腫瘍免疫を抑制することで  
腫瘍増殖に関与している<sup>1-4)</sup>。一方、M1 マクロファ  
ージはTh1-typeのサイトカインを産生することで腫瘍増  
殖を抑制することが知られている<sup>1-4)</sup>。また、M2 マ  
クロファージへの分化にはSTAT3が関与しており、  
STAT3欠損マウスでは、腫瘍組織のM1マクロファ  
ージの割合が増加し、結果的に抗腫瘍免疫が活性化す  
ることで癌の発育・転移が抑制されることが知られて  
いる<sup>3,4)</sup>。つまり、腫瘍組織内のM2 マクロファ  
ージをM1 マクロファージに活性化させることで腫瘍の増殖  
を抑制することが可能となる。我々は近年、新たな試  
みとして、マクロファージの活性化を制御する化合物  
を探索しており、これまでの実績として、Corosolic  
acidやOleanolic acidがマクロファージの活性化状態を  
M2からM1にシフトさせることを明らかにし、腫瘍移

植モデルマウスにおいても有効性を示すことを明らか  
にした<sup>5-7)</sup>。

さらに、最近の研究にて、大豆エキス中にマクロ  
ファージの活性化を制御する成分が含まれていること  
を発見し、その活性本体がsoyasapogenolであることを  
発見した。そこで、本研究ではsoyasapogenolの作  
用メカニズムならびに腫瘍移植モデルマウスにおける  
有効性を検討したので報告する

## 方 法

### Cell-ELISA

96 well plateに播種したHMDM ( $5 \times 10^4$  cells/well)  
に、IL-10もしくはU373細胞の培養上清 (TCS) 存在  
下で試験化合物 ( $30 \mu\text{M}$ ) を添加し、24時間培養後、  
4%パラホルムアルデヒド ( $100 \text{ mL/well}$ ) にて固定し  
た。その後、ブロッキングバッファー ( $100 \text{ mL/well}$ )  
にて20分間ブロッキングを行った後、1次抗体として  
anti-human CD163 antibody (AM-3K) を  $100 \text{ mL/}$   
well添加し、90分反応させた。次に、2次抗体である  
HRP-goat anti-mouse IgG antibodyで30分反応させた  
後、ULTRASENSITIVE TMBにて発色させ、micro-  
ELISA plate readerにて450 nmの波長にて測定を行っ  
た。

### サイトカインの測定

96 well plateに播種したHMDM ( $5 \times 10^4$  cells/well)  
に、TCS存在下で試験化合物 ( $30 \mu\text{M}$ ) を添加し、24  
時間培養後、LPS ( $100 \text{ ng/mL}$ ) 含有培地 ( $100 \text{ mL/}$   
well) に置換した。24時間培養後、培養上清を回収し、  
培養上清中のIL-10、IL-12の濃度をELISA kit (Human  
IL-10, IL-12 ELISA Development Kit: PEPROTECH)  
にて測定した。

### ウエスタンブロット法

細胞 (HMDM, U373, SaOS2) に試験化合物を添  
加し、24時間培養後に調製した各サンプルにサン  
プリングバッファーを添加し、 $95^\circ\text{C}$  で5分間加温し  
た後、SDS-PAGEにて分離後、PVDF膜に転写した。転  
写したPVDF膜を1%スキムミルクにてブロッキング  
(60 min) を行った後、1次抗体 (anti-phospho-Stat3

## 結果と考察

antibody (ab30646), anti-Stat3 antibody (sc-8019), anti- $\beta$ -actin antibody (sc-47778)) および, 2次抗体 (HRP-goat anti-rabbit IgG antibody, HRP-goat anti-mouse IgG antibody) で反応させた. 最後に, 化学発光基質であるECL試薬にて発色させLAS-4000 Miniにて検出した.

### WST-8 assay

96 well plateに播種したガン細胞 (U373, SKOV3) に試験化合物を添加し, 24時間後の細胞毒性をWST-8 assay kit (Dojin Chemical, Kumamoto, Japan) を用いて測定した.

### 動物実験

C3Hマウスにマウス骨肉腫細胞株 (LM8) を皮下に移植する. この動物モデルに, Soyasapogenol (100 mg/kg) を週に2回のペースで経口投与し, 腫瘍移植3週間後に投与群と非投与群間で皮下腫瘍重量および, 皮下腫瘍におけるマクロファージやリンパ球, 腫瘍の活性化状態を比較解析した.

### 免疫染色

皮下腫瘍の凍結切片を作成し, 1次抗体としてanti-CD4 (GK1.5, ATCC, Manassas, VA) and anti-CD8 (53-6.72, ATCC) を用い, 2次抗体としてはHRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて, 皮下腫瘍中のリンパ球の数を解析した. 皮下腫瘍のパラフィン切片を作成し, 1次抗体としてanti-pSTAT3 (D3A7) antibody を用い, 2次抗体としてはHRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて, 皮下腫瘍中のpSTAT3陽性細胞数を解析した. 皮下腫瘍のパラフィン切片を作成し, 1次抗体としてanti-Ki67 antibody (DAKO, Glostrup, Denmark) を用い, 2次抗体としてはHRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて腫瘍の活性化を解析した.

### 統計学的解析

グラフに示した数値は, すべて平均値 $\pm$ 誤差で表記した. 有意差検定はMann-Whitney U-testおよびNon-repeated measures ANOVAを行い, 各群のデータが等分散であるとみなした場合, 危険率が5%であるとき, 統計学的に有意差ありと評価した.

前述したように, マクロファージの活性化はガン細胞の細胞増殖にも関わっている. そこで, 本研究では天然物成分によるマクロファージの活性化制御に基づくガン予防・治療効果の可能性を明らかにする目的で, 保有する天然物由来エキスを用いてマクロファージのM2活性化を抑制するエキス (M2からM1へシフトさせるエキス) のスクリーニングを行った. 方法としては, ヒト単球由来マクロファージ (HMDM) をIL-10で刺激することでM2マーカーであるCD163の発現が誘導される条件下に, 天然物由来エキス添加をし, CD163を指標としたM2活性化に対する抑制作用を評価した. その結果, 大豆抽出エキスにCD163発現の抑制作用が認められた (Table 1).

そこで, 次に大豆に含まれる代表的なトリテルペノイド化合物であるsoyasaponin I, soyasaponin A<sub>1</sub>, soyasapogenol A, soyasapogenol B (Fig. 1) ならびにフラボノイド化合物であるgenistin, daizein, genistein (Fig. 1) の作用について検討した. その結果, フラボノイド化合物は, コントロールと比較してCD163の発現に影響を与えなかったが, トリテルペノイド化合物は有意にCD163の発現を抑制した (Fig. 2). その中でも, トリテルペノイド配糖体であるsoyasaponin I, soyasaponin A<sub>1</sub>のアグリコンであるsoyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bに顕著なCD163の発現抑制作用が認められた (Fig. 2). ゆえに, アグリコン骨格が活性発現に重要であることが示唆された.

そこで, アグリコン型であるsoyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bに着目し, これらsoyasapogenol

Table 1. Effect of natural product extract on CD163 expression in macrophages

	CD163 Expression (% of control)	P value
Japanese radish	94 $\pm$ 7	
Cabbage	101 $\pm$ 4	
Celery	97 $\pm$ 6	
Chinese cabbage	95 $\pm$ 4	
Cucumber	102 $\pm$ 8	
Carrot	94 $\pm$ 5	
Soybean	62 $\pm$ 3	$p<0.05$
Pumpkin	92 $\pm$ 4	
Kumquat	93 $\pm$ 5	
Blueberry	97 $\pm$ 4	
Tomato	94 $\pm$ 6	
Orange	97 $\pm$ 3	
Banana	94 $\pm$ 5	

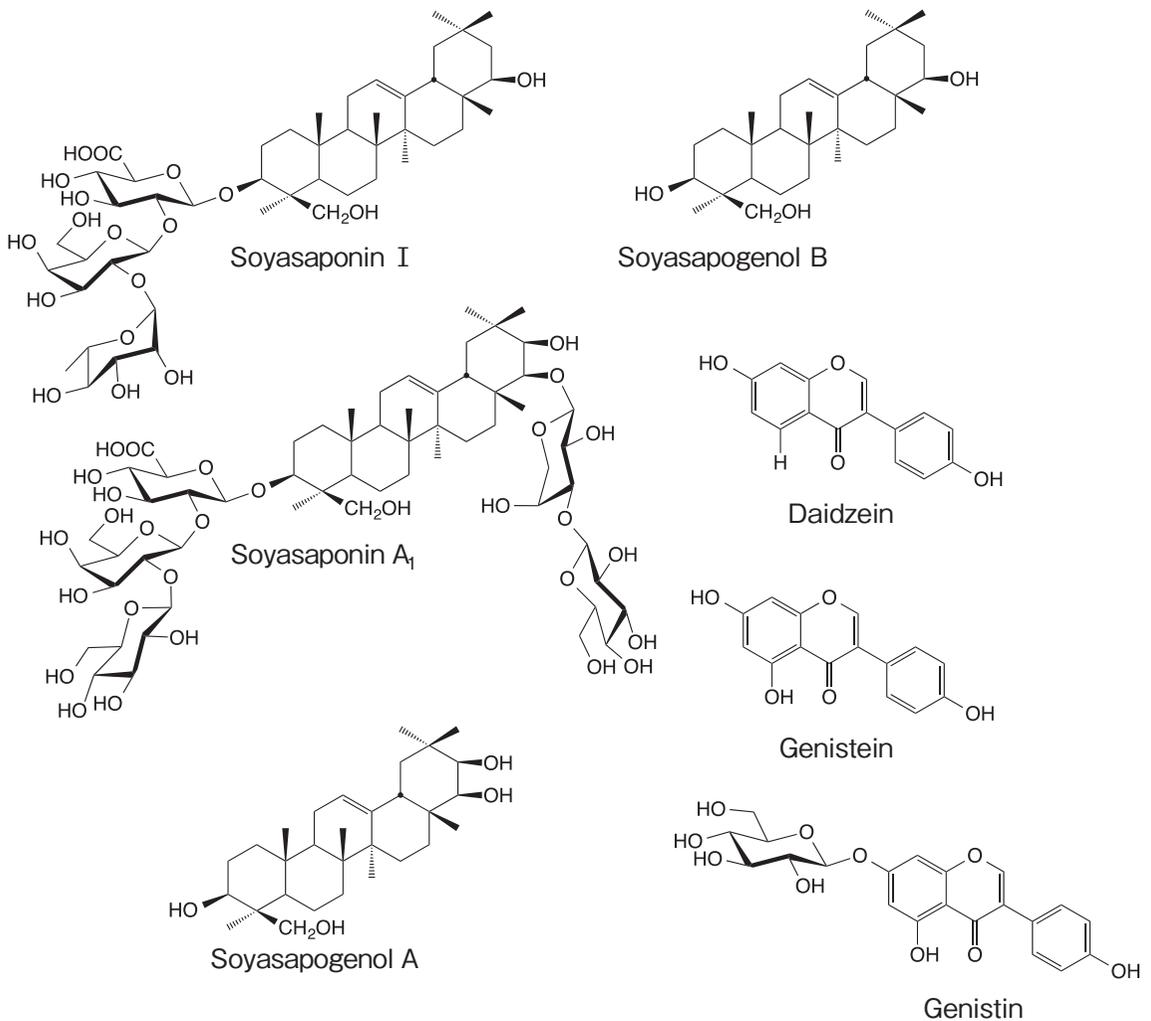


Fig. 1. Chemical structure of major compounds in soybeans.

のIL-10 (M2マーカーサイトカイン), およびIL-12 (M1マーカーサイトカイン) の分泌に対する作用を検討した. その結果, soyasapogenol Aならびに soyasapogenol Bは, M2マーカーであるIL-10の分泌を抑制するとともに, M1マーカーであるIL-12の分泌を促進した (Fig. 3). ゆえに, soyasapogenol Aおよび soyasapogenol Bはマクロファージの活性化をM2からM1にシフトすることが示唆された共に, 大豆に含まれるマクロファージ活性化制御作用を有する活性本体は, これらsoyasapogenolであることが示唆された.

次に, それらsoyasapogenolのマクロファージ活性化制御メカニズムを明らかにする目的で, soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol BのマクロファージのSTAT3の活性化に対する作用を検討し

た. 近年, 転写因子であるSTAT3の活性化は, マクロファージのM2活性化に深く関与していることが知られているため, STAT3の活性化を抑制することでマクロファージの活性化をM2からM1に制御することが可能となる. 結果をFig. 4に示すが, soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは, IL-10ならびにTCSによるマクロファージのSTAT3活性化を顕著に抑制した. ゆえに, soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは, STAT3の活性化を抑制することでマクロファージのM2分化を抑制することが示唆された. さらに, マクロファージのM2活性化に関わるSTAT3は, ガン細胞においては細胞の生存や増殖に関わっており, 近年, STAT3阻害剤が新たな抗ガン剤のターゲット分子としても注目されている. そこで, 本研究では

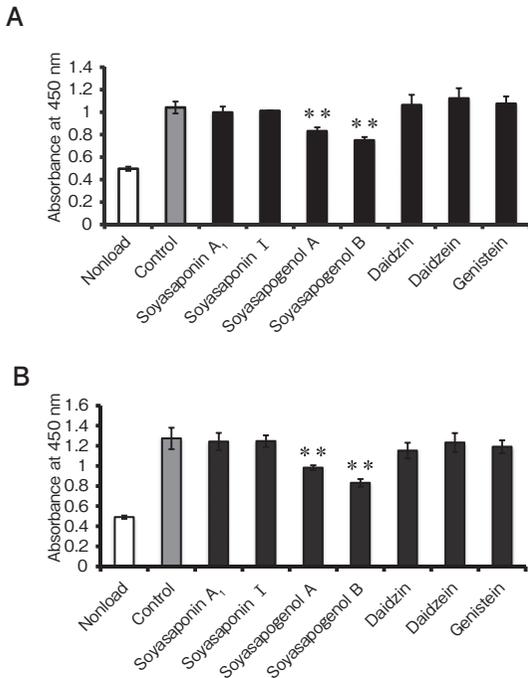


Fig. 2. Effect of major compounds in soybean on CD163 expression in HMDM. HMDM ( $5 \times 10^4$  cells per well of a 96 well plate) were incubated with test compounds ( $30 \mu\text{M}$ ) for 24 h after treatment with 20 nM IL-10 (A) or TCS (B) for 2 days, followed by the determination of CD163 expression by Cell-ELISA, as described in the Materials and Methods. The data are presented as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  vs control.

soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bのガン細胞のSTAT3活性化に対する作用についても検討した。本研究では、STAT3の顕著な活性化が認められているU373ヒトグリオーマ細胞株ならびにSaOS2ヒト骨肉腫細胞株を用いて検討を行ったところ、soyasapogenol Bは、U373およびSaOS2の両方のガン細胞におけるSTAT3の活性化を顕著に抑制し、soyasapogenol AもSaOS2におけるSTAT3の活性化を顕著に抑制した (Fig. 5)。ゆえに、これらsoyasapogenolは、マクロファージだけではなくガン細胞におけるSTAT3の活性化も抑制することが示唆された。前述したように、ガン細胞におけるSTAT3の活性化は細胞の生存や増殖に関わることから、次に、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bのガン細胞の細胞増殖に対する作用をWST-8 assayにて評価した。その結果、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bは、ガン細胞の細胞増殖を濃度依存的に抑制した (Fig. 6)。つ

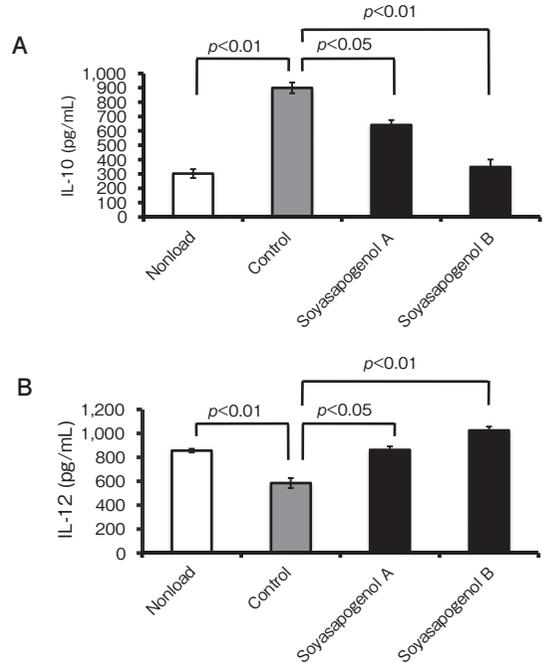


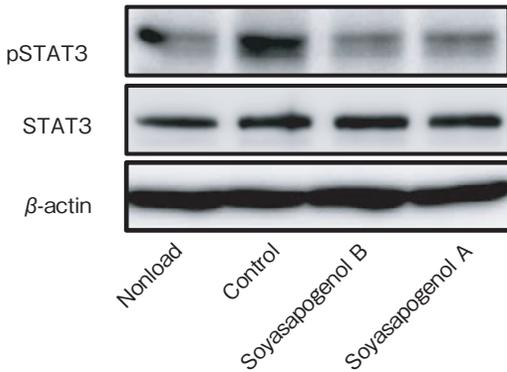
Fig. 3. Effect of soyasapogenol on cytokine secretion in HMDM. The HMDM were stimulated with LPS ( $100 \text{ ng/mL}$ ) for 24 h after incubation with soyasapogenol ( $30 \mu\text{M}$ ) for 24 h in the presence of TCS, followed by the determination of IL-10 (A) and IL-12 (B) secretion by ELISA, as described in the Materials and Methods.

まり、soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは、STAT3の活性化を抑制することで、ガン細胞の生存および増殖を阻害することが示唆された。ゆえに、これらsoyasapogenolは、マクロファージの活性化状態をM2からM1にシフトさせる作用ならびに、ガン細胞の生存・増殖を阻害する作用により効率的に*in vivo*におけるガンの増殖や転移を抑制する可能性が示唆されたため、次に腫瘍移植モデルマウスを用いてsoyasapogenolの有効性を評価することにした。マウス骨肉腫細胞株であるLM-8を移植した腫瘍移植モデルマウスにsoyasapogenol Bを投与したところコントロールと比較して腫瘍重量は有意に減少し、腫瘍の肺転移も有意に抑制された (Fig. 7A and 7B)。ゆえに、soyasapogenol Bは*in vivo*においても有効であることが示唆された。また、soyasapogenol B投与により皮下腫瘍組織におけるpSTAT3陽性細胞が減少し (Fig. 7C)、腫瘍の活性化マーカーであるKi67の発現も低下したことから (Fig. 7C)、soyasapogenol Bは*in vivo*においてもSTAT3の活性化を抑制することが示唆さ

れた。さらに、皮下腫瘍組織中のCD8陽性Tリンパ球ならびにCD4陽性Tリンパ球の数は増加したことから (Fig. 7C), soyasapogenol Bは、マクロファージの活性化制御のみならず、T細胞などの免疫細胞にも作用することで抗腫瘍免疫を高めている可能性が示唆された。これまでに、これらsoyasapogenol類によるガン細胞に対する直接的な抗ガン作用は報告されているが

<sup>8,9)</sup>、マクロファージの活性化制御を介したガン増殖抑制作用に関する報告は本研究が初めてである。つまり、soyasapogenol は、マクロファージならびにT細胞などの免疫関連細胞の活性化を制御することで抗腫瘍免疫を活性化すると共に、ガン細胞への直接的な作用により腫瘍の増殖・進展を抑制する可能性が示唆された。

**A**



**B**

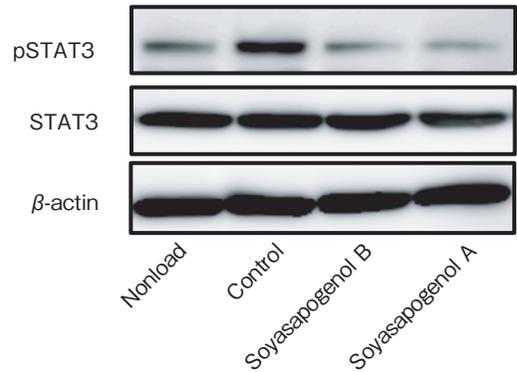


Fig. 4. Effect of soyasapogenol on STAT3 activation in HMDM. The HMDM were incubated with soyasapogenol A (30  $\mu$ M) and soyasapogenol B (30  $\mu$ M) for 12 h after treatment with 20 nM IL-10 (A) or TCS (B) for 24 h, followed by the determination of phosphorylated STAT3, STAT3 and  $\beta$ -actin expression by western blot analysis, as described in the Materials and Methods.

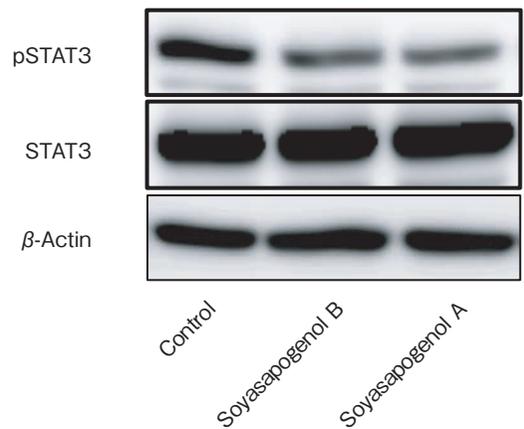
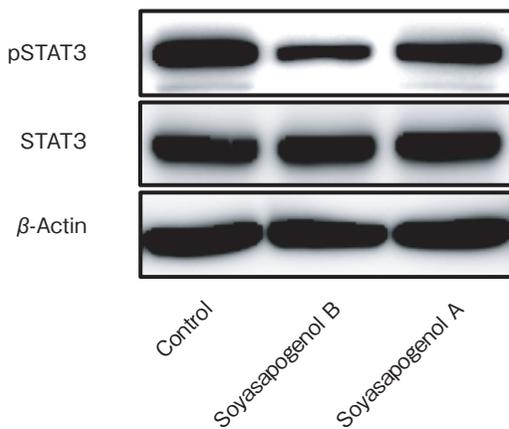
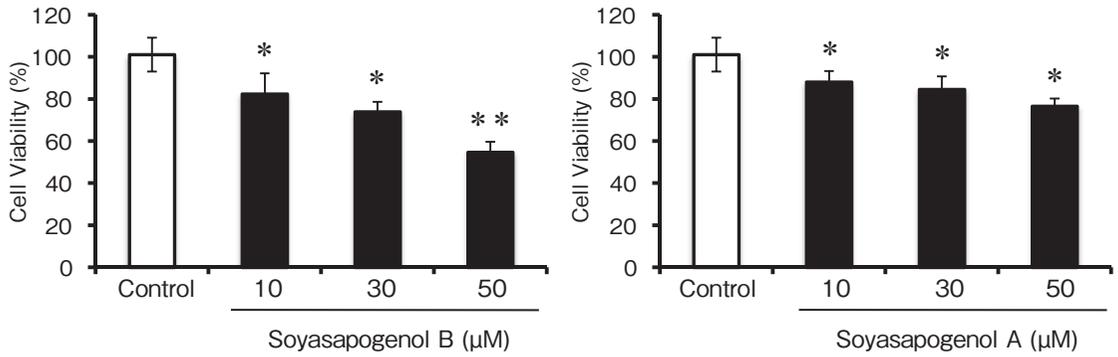


Fig. 5. Effect of soyasapogenol on STAT3 activation in tumor cells. U373 cells (A) and SaOS2 cells (B) were incubated with soyasapogenol A (30  $\mu$ M) and soyasapogenol B (30  $\mu$ M) for 12 h, followed by the determination of phosphorylated STAT3, STAT3 and  $\beta$ -actin expression by western blot analysis, as described in the Materials and Methods.

A



B

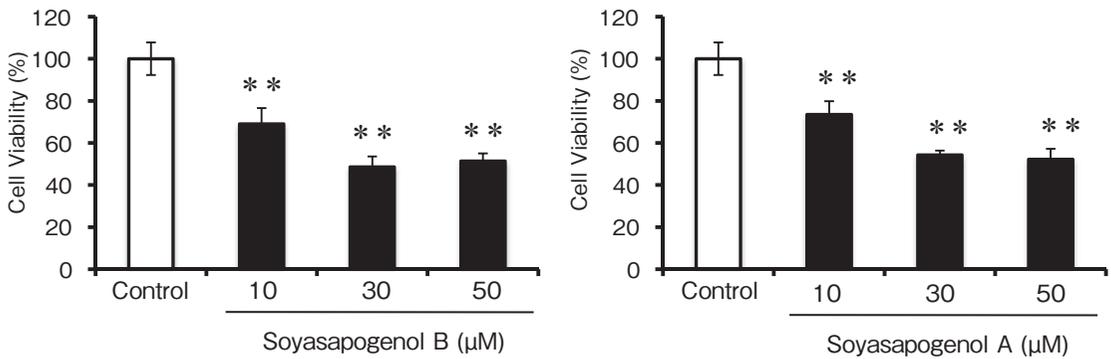


Fig. 6. Effect of soyasapogenol on cell proliferation in U373 glioblastoma cells and SaOS2 osteosarcoma cell. U373 cells (A) and SaOS2 cells (B) were incubated with the indicated concentrations of soyasapogenol for 24 h, followed by the determination of cell proliferation by WST-8 assay, as described in the Materials and Methods. The data are presented as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs control.

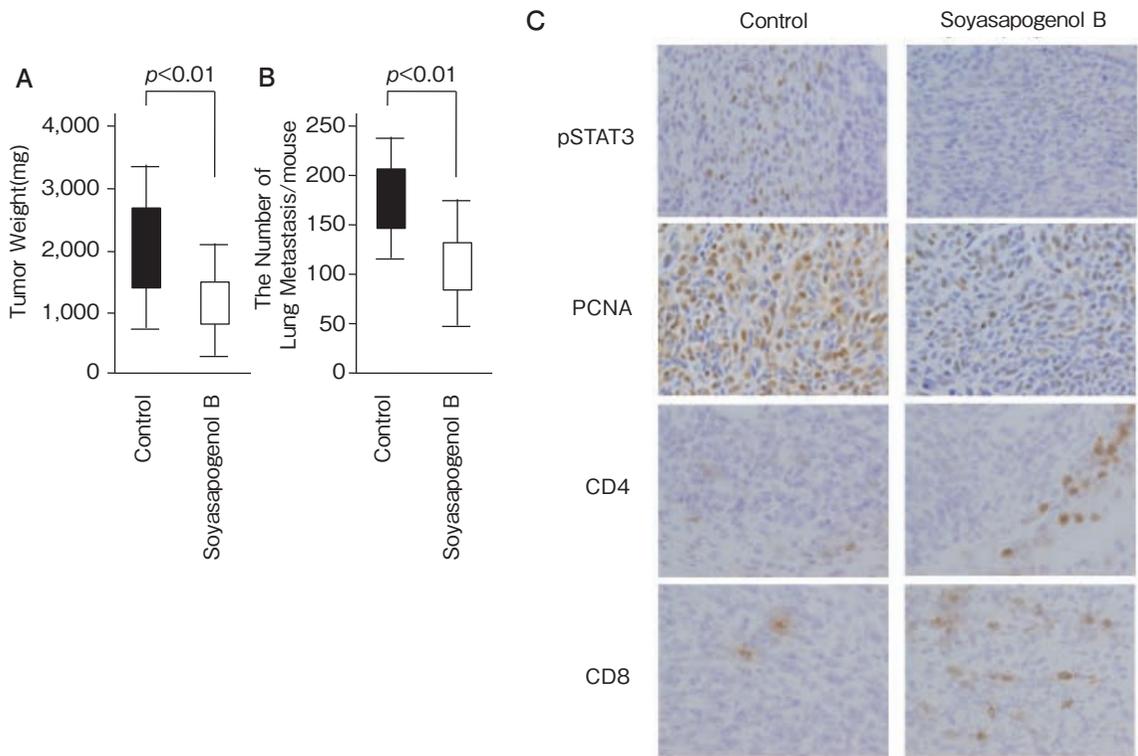


Fig. 7. The effects of soyasapogenol B on the tumor cell proliferation and lung metastasis in LM8 cell-injected mice. Soyasapogenol (50 mg/kg) was administered to LM8 cell-injected mice for four weeks, followed by the determination of the subcutaneous tumor weight (A) and lung metastasis (B) as described in the Materials and Methods. The STAT3 activation, PCNA expression, CD4<sup>+</sup> lymphocytes and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in subcutaneous tumor tissues were evaluated by immunostaining (C).

## 要 約

マクロファージの活性化機構には、古典的活性化 (M1) 経路とオルタナティブ活性化 (M2) 経路が存在し、活性化の違いが病態に大きな影響を与えることが知られている。我々は、このマクロファージの活性化機構を、新たなガン治療のターゲットとして着目し、近年M2マクロファージ (抗腫瘍免疫を抑制するマクロファージ) の活性化を抑制する化合物の探索を行い大豆由来の soyasapogenol が、その活性化を抑制することを明らかにした。本研究では、soyasapogenol のマクロファージにおけるM2活性化抑制メカニズムや骨肉腫移植モデルマウスにおける作用を検討した。その結果、soyasapogenol は、STAT3の活性化を抑制することでヒト単球由来マクロファージのM2活性化を抑制するとともに、ヒト骨肉腫細胞の増殖を抑制することを明らかにした。また、soyasapogenol はマクロファージの活性化制御のみならず、T細胞の活性化も維持することも明らかにした。さらに、マウス骨肉腫LM8移植モデルマウスにおいては、soyasapogenol の投与により皮下腫瘍重量ならびに腫瘍の肺転移数は顕著に減少し、皮下腫瘍の免疫染色にて、soyasapogenol 投与群ではpSTAT3, Ki67陽性細胞が減少し、CD4, CD8陽性細胞は増加したことから、soyasapogenol 投与により抗腫瘍免疫が活性化していることが明らかとなった。以上の結果から、soyasapogenol はマクロファージの活性化制御を介した悪性腫瘍に対する新規治療法への応用が期待できる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) Gordon S (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, **3**, 23-35.
- 2) Mosser DM (2003): The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, **73**, 209-212.
- 3) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A and Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, **25**, 677-286.
- 4) Goerdts S and Orfanos CE (1999): Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, **10**, 137-142.
- 5) Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T and Takeya M (2011): Corosolic acid Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Suppressing the Activation of STAT3 and NF- $\kappa$ B in Tumor Cells and Tumor-associated Macrophages. *Cancer Sci*. **102**, 206-211.
- 6) Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T and Takeya M (2011): Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep*, **26**, 1533-1537.
- 7) Horlad H, Fujiwara Y, Takemura K, Ohnishi K, Ikeda T, Tsukamoto H, Mizuta H, Nishimura Y, Takeya M and Komohara Y. (2013): Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Nutr Food Res*. **57**, 1046-1054.
- 8) Rowlands JC, Berhow MA and Badger TM (2002): Estrogenic and antiproliferative properties of soy saponinols in human breast cancer cells *in vitro*. *Food Chem. Toxicol*, **40**, 1767-1774.
- 9) Yanamandra N, Berhow MA, Konduri S, Dinh DH, Olivero WC, Nicolson GL and Rao JS (2003): Triterpenoids from *Glycine max* decrease invasiveness and induce caspase-mediated cell death in human SNB19 glioma cells. *Clin Exp Metastasis*, **20**, 375-383.