

博士論文

婦人科腫瘍、類腫瘍における食品由来生理活性物質に
よる腫瘍調節機構に関する研究

田口 歩

目次

目次	1
要旨	2
序文	3
婦人科腫瘍性疾患治療戦略と食品由来生理活性物質.....	3
ω3 脂肪酸	3
レスベラトロール (RVT)	6
悪性腫瘍と腫瘍内微小環境.....	8
癌性腹膜炎.....	11
子宮内膜症.....	11
研究目的	15
実験方法	16
結果	29
考察	50
謝辞	62
引用文献	63

要旨

食品成分である $\omega 3$ 脂肪酸とレスベラトロール (RVT) は、抗炎症作用・抗腫瘍作用をもつ。 $\omega 3$ 脂肪酸はマウス子宮頸癌皮下腫瘍モデルに対して腫瘍形成を抑制し、腫瘍内間質による MMP-9 産生を抑制した。RVT はマウス癌性腹膜炎モデルに対して腹水産生を抑制し、腹水中の IL-6 産生を抑制した。また、RVT は培養子宮内膜症間質細胞の TNF- α 誘導性サイトカイン産生を抑制し、アポトーシス感受性を高めた。腫瘍増殖を促進させる腫瘍内微小環境に対して、 $\omega 3$ 脂肪酸や RVT が抑制的に働き抗腫瘍効果を示すことが示唆された。特に子宮内膜症に対して、RVT は抗炎症・抗腫瘍効果を介した治療薬として期待される。

序文

婦人科腫瘍性疾患治療戦略と食品由来生理活性物質

悪性腫瘍の治療方法としては、手術療法・化学療法・放射線療法が、子宮内膜症の治療方法としては、手術療法・ホルモン療法などが挙げられるが、いずれも合併症や副作用が問題となる。このため合併症や副作用の少ない治療方法が望まれている。副作用の少ない治療方法として、近年では生理活性をもつ食品成分が注目されており、その代表的なものとして魚の脂肪に豊富に含まれる ω 3 脂肪酸とブドウの皮などに豊富に含まれるレスベラトロール (RVT) が挙げられる。これらはともに、元々は抗酸化作用を持つことが知られてきたが、近年では、抗炎症効果・抗腫瘍効果が注目されてきている。

ω 3 脂肪酸

ω 3 脂肪酸は ω 6 脂肪酸とともに、多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid; : PUFA) の一種であり、そのもの、またその代謝物がメディエーターとして生体の恒常性維持を行っている。PUFA のなかでメチル端から数えた 2 重結合の位置により ω 3 系列と ω 6 系列に分けられる。これらの PUFA はいずれも体内では合成することのできない必須脂肪酸であると考えられ、その体内濃度は食餌からの摂取に依存するといわれている。

食餌から摂取される ω 3 脂肪酸は、近年では抗酸化作用・抗炎症作用・抗腫瘍作用をもつ物質として期待されている。古くから、魚の摂取量が多い集団では虚血性心疾患の死亡率が低いことが知られていた。Dyerberg らは、イヌイットの食餌調査との臨床研究から、コレステロールの摂取量が多くても、魚由来の ω 3 脂肪酸の摂取量が多く血中 ω 3 脂肪酸濃度が高いと動脈硬化性疾患の発症頻度が低いことを報告し[1]、それ以降、 ω 3 脂肪酸の抗酸化作用はますます注目を集めた。

近年では、抗酸化作用のみならず、数々の炎症性疾患において抗炎症効果をもたらされることが知られてきている[2]。 ω 3 脂肪酸の抗炎症効果は、関節リウマチや子宮内膜症といった慢性炎症性疾患での報告が多い。関節リウマチにおいては、特に古くから検討され、1980 年台に ω 3 脂肪酸の摂取により関節リウマチの症状が改善することが報告され[3, 4]、それ以降その機序について様々な検討がなされている。一方、子宮内膜症においては、人における ω 3 脂肪酸摂取量と子宮内膜症発症の頻度の検討により ω 3 脂肪酸が子宮内膜症を予防することが報告された[5]他、ラットを用いた検討で抗炎症効果と子宮内膜症抑制効果を持つことが示された[6]。当研究室からも ω 3 脂肪酸とその代謝産物がマウスモデルにおいてマクロファージからの IL-6 産生を抑制し、子宮内膜症抑制効果を持つことを報告した[7]。

一方、 ω 3 脂肪酸は種々の癌腫において、抗腫瘍効果をもたらすことも報告されてきている。 ω 3 脂肪酸である EPA や DHA、特に DHA は、癌細胞の増殖抑制[8]、アポトーシス誘導[8, 9]、浸潤阻害[10]、組織での血管新生抑制[11]など様々な効果を有することが報告されている。

fat-1 mouse

2004 年に Kang らにより fat-1 トランスジェニックマウス（以下、fat-1 マウス）が開発された[12]。このマウスは哺乳動物には生来有さない、線虫 *Caenorhabditis elegans* に由来する fat-1 遺伝子を導入し、全身に発現させたマウスである。fat-1 遺伝子は、 ω 6 脂肪酸を ω 3 脂肪酸へ変換する酵素を有しており、この酵素の働きにより、体内で ω 6 脂肪酸は ω 3 脂肪酸へ変換することができる。このため、fat-1 マウスでは、食餌に関わらず、全身の組織で ω 3 脂肪酸が豊富に存在する状態となる。fat-1 マウスの開発により、純粋に ω 6、 ω 3 脂肪酸の影響を比較することが可能となった。この fat-1 マウスを用いて様々な疾患モデルが研究されている。悪性腫瘍においても、 ω 3 脂肪酸の抗腫瘍効果はこの fat-1 マウスを用いても様々な角度から検討されている[13-16]。

RVT

RVT は、植物がカビや細菌から身を守るために生成するフィトキシアレンと呼ばれる植物性抗菌物質であり、ブドウの皮に含まれるポリフェノールの一種である（図 1）。RVT は、適度な赤ワインの摂取は心血管症や脳卒中などのリスクを減らすという、いわゆる“French Paradox”に関与することが 1990 年代後半から報告され始め、当初はその抗酸化作用から、血中の低比重リポ蛋白質（LDL）の酸化を抑えることで動脈硬化を防ぐことが期待されていた[17, 18]。近年では、抗酸化作用の他にも抗炎症作用や抗腫瘍作用を持つことが明らかとなり、注目度が増してきている。RVT は sirtuin1（SIRT1）を活性化することでも知られる[19]。SIRT1 は酵母における長寿遺伝子として有名な silent information regulator-2（Sir2）のホモログであり、NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素として機能する。この遺伝子は当初はカロリー制限により寿命を延長することで注目を集めたが[20, 21]、現在では代謝・炎症・腫瘍形成等において様々な生理活性を持つことが判明している[22, 23]。

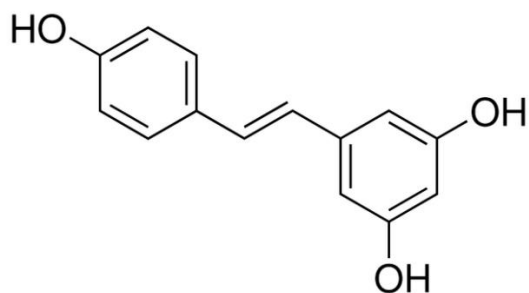


図 1 レスベラトロール

RVT の抗炎症効果は、関節リウマチや慢性炎症性腸疾患といった慢性炎症性疾患での報告が多い。関節炎については、ウサギを用いた関節炎の検討を皮切りに、*in vitro* の実験によりその機序の解明がなされてきている[24]。主には、軟骨細胞の TNF- α 誘導性の炎症を抑制することや[25]、IL-1 β 誘導性の NO や iNOS の産生を抑制すること[26]などが報告されている。慢性炎症性腸疾患では、マウスやラットなどの動物モデルで薬剤誘導性腸疾患を抑制することが報告されている[27-29]。これらの機序の 1 つとして、RVT が NF- κ B を抑制することが注目されている。NF- κ B は炎症において中心的な役割を担う転写因子として有名である。Yeung らは、RVT が SIRT1 を活性化すると、NF- κ B の RelA/p65 Lys³¹⁰ の脱アセチル化が起こり NF- κ B の転写活性を抑制する、という機序を報告している[30]。

一方、RVT の抗腫瘍効果は、卵巣癌、胃癌、乳癌、リンパ腫など様々な癌種で報告されている[31-37]。その機序としては、RVT が細胞周期を G1 で停止させたり、Akt シグナルや ERK シグナルを低下させたりすることで腫瘍の増殖を抑制することが報告されている[35, 37]。また増殖抑制以外にも、抗アポトーシス分子である Bcl2 や survivin の発現を抑制することでアポトーシスを誘導することも判明してきている[38]。

婦人科腫瘍性疾患・炎症性疾患

婦人科疾患で腫瘍性疾患・炎症性疾患の側面を有する疾患や病態として、悪性腫瘍、癌性腹膜炎、子宮内膜症などがあげられる。

悪性腫瘍と腫瘍内微小環境

悪性腫瘍の発症や進展には炎症が密接に関係している[39]。悪性腫瘍の発症に関する炎症性疾患として有名なものとして、慢性炎症性腸疾患より発症する大腸癌や慢性肝炎より発症する肝癌、ピロリ菌の慢性感染により発症する胃癌などがあげられる。これらの機序の1つは、慢性炎症によりDNAダメージが起こることによると考えられている[40, 41]。

近年、炎症は悪性腫瘍に対して、発症のみならず、その進展に寄与していることが注目されている。悪性腫瘍進展に関わる炎症の場は腫瘍内微小環境の相互作用により形成されている。線維芽細胞や血管内皮細胞、骨髄由来細胞、リンパ球などで構成される腫瘍内微小環境は発癌や腫瘍進展、治療への反応において重要な役割を担っている[42-45]。癌細胞は腫瘍内微小環境の中の様々な構成細胞と相互作用を及ぼすことでその性質を獲得し、また維持している。腫瘍細胞から産生されるサイトカインや酵素によって腫瘍内微小環境の構成成分であるマクロファージや線維芽細胞、脂肪細胞は活性化され、それぞれ、腫瘍関

連マクロファージ (tumor associated macrophage; TAM) [46]や癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast ; CAF) [47]、癌関連脂肪細胞 (cancer-associated adipocyte ; CAA) [48]となり炎症性サイトカインやケモカインやマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase; MMP) を産生するようになる。活性化された腫瘍内微小環境から産生されるこれらのメディエーターや酵素によって、腫瘍内ではさらに癌進展にとって好都合な環境や形質が獲得されていく (図 2)。

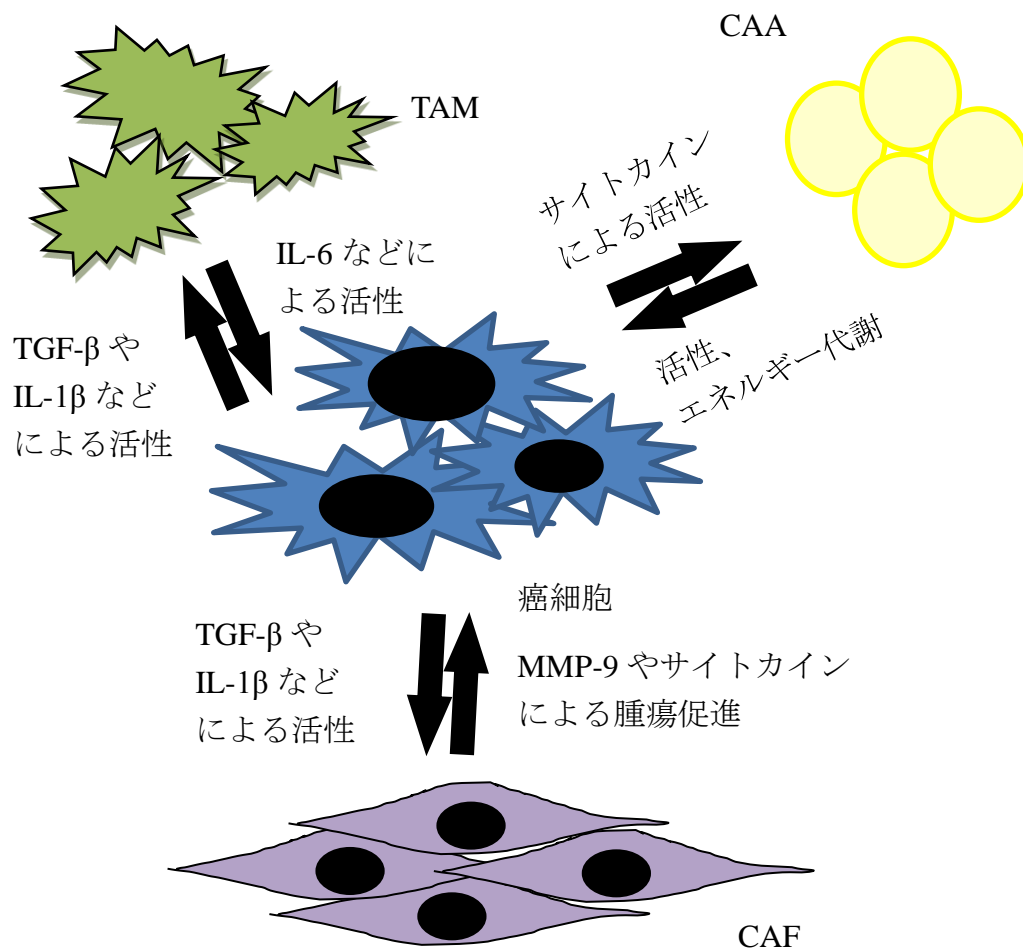


図 2 腫瘍内微小環境における癌細胞と間質細胞との相互作用

腫瘍内微小環境では癌細胞からの炎症性サイトカインにより、間質細胞は活性化され、癌進展を促進する。CAF: cancer associated fibroblast, TAM: tumor associated macrophage, CAA: cancer associated adipocyte

癌性腹膜炎

卵巣癌は腹膜播種進展をすることが特徴である。腹膜播種進展の結果、腫瘍や炎症により透過性の亢進した微小血管から多量の浸出液が漏れだし、また、リンパの閉塞によりその吸収も妨げられる[49, 50]。腹水の貯留は、これらの腫瘍性、炎症性要因が絡み合った結果といえる[51]。また、腹水中には、さまざまなサイトカインやケモカイン、成長因子などが含まれ、腫瘍に好都合な腫瘍内微小環境を構成し、腫瘍形成をさらに促進させる方向に向かわせている[52, 53]。腹水中のサイトカインとしては、IL-6 や IL-8、IL-10 が増加していることが報告されている[52]。癌性腹膜炎を伴う進行がんでは、悪液質を伴い、患者の quality of life (QOL)が低下することがしばしばある[54]。悪液質の病態において、IL-6 や TNF- α などの炎症性サイトカインの産生を伴うことが知られている[55]。このことから、癌性腹膜炎を伴う進行癌の病態に対しては、抗腫瘍的治療と同時に IL-6 産生などの炎症をコントロールすることも重要な治療戦略の1つとなる。

子宮内膜症

子宮内膜症は子宮内膜上皮が子宮内膜間質とともに子宮外に生着する疾患である。その病因としては、逆流月経血中に含まれる子宮内膜細胞の腹膜上への生着が子宮内膜症病巣の進行の初期段階であるという、Sampson によって提唱さ

れた「子宮内膜移植説」 [56]や、「体腔上皮化生説」などが有力視されている。子宮内膜症が初経以降に発症することや、月経の頻度や量が多いと子宮内膜症の発症頻度が増加することなどが、移植説の根拠と考えられている[57]。しかし、およそ9割の女性で月経血の逆流は認められるにも関わらず、子宮内膜症に罹患する女性はその一部にすぎない。このことから、子宮内膜症の発症には、さらに増殖因子や血管新生因子、免疫反応の異常などの他の要因も関与していると考えられているが[58, 59]、いまだその全容は未解明な部分が多い。

子宮内膜症の病態は、腹腔内で炎症を繰り返すことで細胞外マトリックスを分解したり、腹膜などの子宮の外の組織に生着・浸潤したり、さらには生着した場所での増殖を起こしたりすることで進展していくと考えられている。炎症性疾患という観点からは、子宮内膜症患者の腹腔内では、腹腔内マクロファージは活性化され、IL-6・IL-1 β ・TNF- α などの炎症性サイトカインを発現しており[60, 61]、さらにそれらの炎症性サイトカインにより異所性の子宮内膜組織が活性化され、IL-6やIL-8といったサイトカインを発現していること[61]が知られている。このため、内膜症患者の腹腔内貯留液中にはプロスタグランジン (PGs)、IL-8、IL-6、monocyte chemotactic peptide(MCP)-1などが増加し、慢性炎症状態が成立していることが知られている[60, 62]。また、腫瘍性疾患という観点からは、培養子宮内膜間質細胞 (endometriotic stromal cell:

ESC) は種々のアポトーシス刺激に対してアポトーシス耐性を示すことが知られている[63-65]。その機序の一つとして、アポトーシス刺激下で、ESC では抗アポトーシス蛋白である *survivin* 発現が維持されることが挙げられる[66]。つまり、子宮内膜症は慢性炎症を引き起こす炎症性疾患であるとともに、悪性腫瘍ではないものの生着・浸潤・増殖を行いアポトーシスに抵抗性を示す腫瘍性疾患の要素も有しているといえる (図 3)。

現在の子宮内膜症の治療としては、外科的治療の他、排卵抑制やホルモン抑制に基づいた、Low dose Estrogen Progestin (LEP)やディナゲストなどの非外科的治療が一般的である。一方で、子宮内膜症は生殖年齢の女性に生じる疾患であるため、外観へのダメージや副作用が少なく、また生殖能力に影響を与えない新たな治療方法が望まれてきた。近年では子宮内膜症が炎症性疾患であり、また、アポトーシス耐性の腫瘍性疾患であることに注目した、抗炎症効果や抗腫瘍効果を目的とした治療薬の開発が注目されつつある[7, 64, 67]。前述したように、我々の研究室からも、抗炎症効果をもつ $\omega 3$ 脂肪酸が子宮内膜症の治療薬として期待されることを報告している[7]。

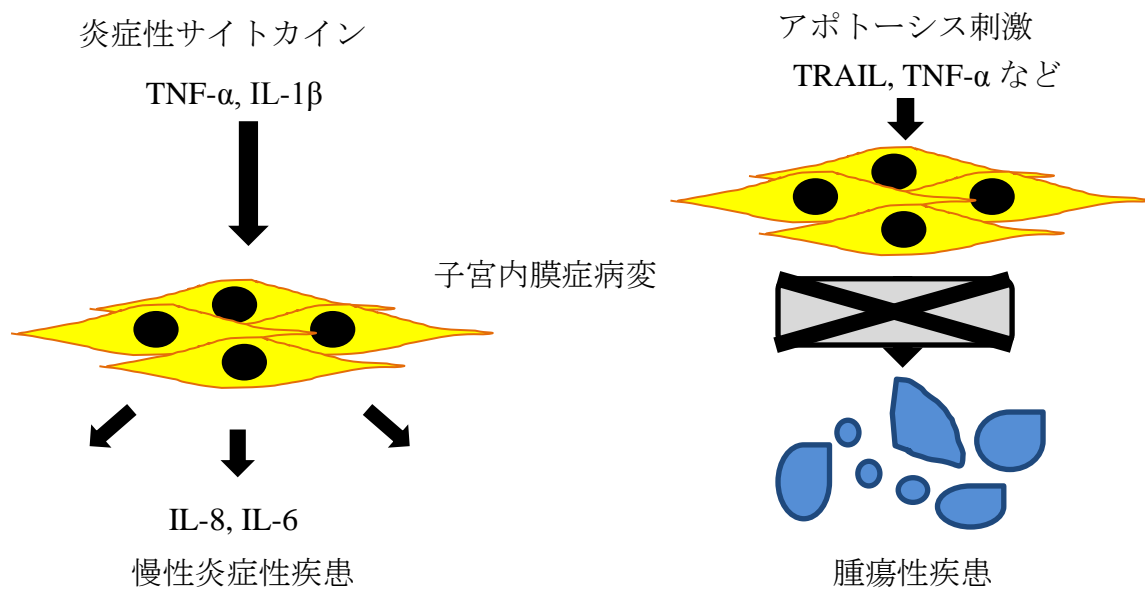


図3 子宮内膜症の病態

炎症性サイトカインにより子宮内膜症病変細胞は活性化され、IL-8, IL-6を放出し、腹腔内は慢性炎症状態となっている。また、内膜症病変細胞は種々のアポトーシス刺激に対してアポトーシス抵抗性を示し、腫瘍性疾患の性質も有している。TRAIL: TNF related apoptosis-inducing ligand

我々は以下の目的を設定し、研究を行った。

研究目的

1、 ω 3 脂肪酸と子宮頸癌モデル

1－1、 ω 3 脂肪酸が体内に豊富にあることにより、子宮頸癌腫瘍形成モデルの腫瘍形成を抑制することができるかを、fat-1 マウスを用いて検討する。

1－2、 ω 3 脂肪酸による腫瘍形成抑制機序を検討する。

2、RVT と癌性腹膜炎

2－1、RVT が癌性腹膜炎に対して抑制効果を持つかを、マウスモデルを用いて検討する。

2－2、RVT による癌性腹膜炎抑制機序を検討する。

3、RVT と子宮内膜症

3－1、RVT が子宮内膜症に対して抗炎症効果を持つかを、ESC を用いて検討する。

3－2、RVT が ESC のアポトーシス感受性に与える影響を検討する。

実験方法

1、 ω 3 脂肪酸と子宮頸癌モデル

実験動物

動物の管理は東京大学が定める施設動物実験規則を順守した。fat-1 マウスは、ハーバード大学の Kang 先生と東京大学薬学部衛生科学教室の有田誠先生のご好意を得て、Material Transfer Agreement を結び、譲り受けた。fat-1 マウスの継代はヘテロで行い、遺伝背景となる C57BL/6J マウス(日本クレア)を wild type (WT) マウスとして交配させることで、同腹仔として得られるヘテロの fat-1 マウスと、fat-1 遺伝子を持たない WT マウスをジェノタイピングにより決定し、以下の実験系に使用した。ジェノタイピングは、マウス耳組織より DNA を抽出し、KOD-FX PCR Kit (TOYOBO LIFE SCIENCE)を用い、fat-1 遺伝子領域に対する PCR 法により行った。マウスの食餌には、既報の論文に従い、「AIN-76A+10% サフラワー油」を日本クレアにより作製依頼し、使用した[7]。この餌は、高 ω 6 低 ω 3 脂肪酸含有食であり、 ω 3 脂肪酸は ω 6 脂肪酸の 273 倍の含有率である。通常の食餌に比べ、fat-1 と WT の差がより顕著に表れ、fat-1 を用いた実験系では標準的な食餌とされている。

子宮頸癌の細胞株としては、TC-1 細胞を用いた。TC-1 細胞は、C57BL/6 マウスの初代肺上皮細胞から樹立された細胞株で、HPV16 E6/E7 と c-Ha-ras により

不死化されており、マウス子宮頸癌モデルで使用されている。

8-10週齢の fat-1 と WT マウスに、 5×10^6 個の TC-1 細胞をそれぞれ皮下投与し、7 日目、14 日目の腫瘍径を測定した。腫瘍体積は以下の式により近似値を求めた。

$$\text{腫瘍体積} = 1/2 \times (\text{短径})^2 \times (\text{長径})$$

14 日目にマウスはエーテル麻酔下に安楽死させ、腫瘍を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドに固定し、保存した。

免疫組織学的検査

4 % パラホルムアルデヒドにて固定された検体をパラフィン包埋した後、5 μm の連続切片を作成した。腫瘍検体の切片は、キシレンにて脱パラフィンし、アルコールにて水和後、ターゲットバッファーにて 5 分間電子レンジ加熱し、抗体賦活化を行った。次に、3 % 過酸化水素水にて 5 分間、プロテインブロッキングバッファーにて室温 10 分間反応させ、MMP-9 免疫染色はラビットポリクローナル抗マウス MMP-9 抗体 (PAB12714, Abnova, 1:100 希釈) で、CD-31 免疫染色はラットモノクローナル抗マウス CD-31 抗体(ab56299, Abcam, Tokyo, Japan)で染色し、それぞれペルオキシダーゼ付二次抗体で染色し発色させた。MMP-9 免疫染色については、対比染色としてヘマトキシリン染色を行い、光学顕微鏡を用い

て観察した。

マイクロアレイ分析

TC-1 腫瘍における遺伝子発現を網羅的に調べるため、マイクロアレイ分析法を用いて検討した。マイクロアレイ分析法は、以前に当研究室で報告した方法を用いた[7]。TC-1 皮下投与から 2 週後の腫瘍を摘出し、RNA later に浸透後、 -80°C で凍結保存した。腫瘍組織は fat-1 マウスと WT マウスごとに 3 個体ずつまとめて、それぞれホモジェナイズし、全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。RNA の quality は分光光度計を用い、260 nm と 280 nm の吸光度比が 1.8-2.0 にあることを確認した。得られた検体を 3D-Gene Mouse Oligo Chip 24k (東レ)を用いて、23522 種の遺伝子発現の網羅的解析を行った。Total RNA は、Cy3 と Cy5 にてラベルし、16 時間 37°C でハブリダイズした。ハイブリダイズシグナルは、Scan Array Express Scanner (PerkinElmer) にて検出し、バックグラウンドの平均+2SD を減算した値が正の値のものを発現ありと定義した。バックグラウンドを減算し、Cy3/Cy5 の変動比の中央値が 1 になるように補正を加えた。

定量的 real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (以下 RT-qPCR)

RT-qPCR は、以前に当研究室で報告した方法を用いた[7, 68]。TC-1 皮下投与から 2 週後の腫瘍を摘出し、RNA later に浸透後、-80 °C で凍結保存した。腫瘍組織は fat-1 マウスと WT マウスごとにまとめて、それぞれホモジェナイズし、全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen) を用いて抽出し、逆転写反応を行い (TOYOBO, Osaka, Japan)、相補的 DNA (以下 cDNA) を生成した。Light Cycler R 480 (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)、Universal Probe Master (Roche Applied Science)、及び下記のプライマー (Sigma-Aldrich Japan) とプローブ (Roche Applied Science) を用いて cDNA を 45 サイクル増幅した。

Mouse β -actin, probe88,

5'- ATTGAAACATCAGCCAAGACC-3',

5'-CCGAATCTCACGGACTAGTGT-3',

Mouse MMP-9, probe19,

5'-ACGACATAGACGGCATCCA-3'

5'-GCTGTGGTTCAGTTGTGGTG-3'

MMP-9 の発現レベルを β -actin を内部基準として $\Delta\Delta$ CT 法により解析した。

2、RVT と癌性腹膜炎

動物

動物の管理は東京大学が定める施設動物実験規則を順守した。8-10 週齢 C57BL/6J マウス（日本クレア）を購入した。専用のエサ・水にて飼育し、明・暗時間をそれぞれ 16/8 時間の状態とした。

卵巣癌の細胞株としては、ID8 細胞を用いた。ID8 細胞は、C57BL/6 マウスの卵巣上皮より作製された卵巣癌の細胞株であり、腹膜播種とともに腹水を形成することから種々の腹膜播種モデルで研究が行われている[69-72]。ID8 細胞に、より早く腹水を形成させるため c-myc を導入した ID8-myc 細胞を国立癌センター研究所の清野徹先生に樹立していただいた。

8-10 週齢のマウスに、 5×10^6 個の ID8-myc 細胞を腹腔内投与した。6 週目より腹水産生を認め、6-7 週でマウスをイソフルランの吸入麻酔で安楽死させ、解剖を行った。腹水を採取し、400 g で 5 分間遠心分離をし、細胞成分を取り除き腹水は-20 °Cで保存した。マウスの体重、腹水量を以下の式により求めた。

$$\text{腹水量 (g)} = (\text{体重}) - (\text{腹水を除いた体重})$$

マウスへの薬剤投与

RVT (purity > 99%, Sigma Chemical) は ID8-myc 腹腔内投与の翌週より溶媒で

あるエタノールに懸濁し、40 mg/kg をコーンオイルで全量を 200 μ L に調整し経口投与した。投与量に関しては、急性腎障害や超粘膜障害の動物モデルや胃癌の皮下腫瘍モデルを用いた報告を参考とした[37, 73, 74]。コントロールとして同量のエタノールをコーンオイルで全量を 200 μ L に調整し経口投与した。

腹水中のサイトカインの測定

腹水中の IL-6、IL-1 β および TNF- α 濃度測定を専用の ELISA キット(Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)にて行った。

細胞増殖アッセイ

1 \times 10³ 個/well の細胞を 96 穴プレート(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)に撒き一晚培養した後、RVT (0, 10, 20, 50, 100 μ M) を添加し、24 時間培養し、テトラゾリウム塩 WST-8 を用いた Cell counting Kit-8 (Dojindo, Tokyo, Japan) を用いてプロトコールに従い、細胞生存率を計測した。490 nm 波長の吸光度計(BioTek, USA)を用いて計測を行い、メディウムのみの well における吸光度を引くことによって生細胞の数を表した。

Annexin V-FITC アポトーシス解析

60 mm プレート(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)に 1×10^5 個の細胞を撒き一晩インキュベートした上で、RVT (0, 25, 50 μ M)を添加し、24 時間インキュベート後にトリプシン処理を行った。PBS で 2 回洗浄後、Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I (Abcam, USA) を用いて、annexin-V FITC と PI で 2 重染色を行い、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス誘導率を算出した。

腹腔内マクロファージの分離回収、培養

腹腔内マクロファージの分離回収・培養については以前に当研究室で報告した方法を用いた[68]。マウスの腹腔内を 7.0 ml の PBS で洗浄後回収し、70 μ m セルストレーナー (Becton Dickinson and Co) を通した後、1500 rpm、10 分間、遠心し、腹腔内細胞を沈殿させた。磁器細胞分離キット (MACS、Miltenyi Biotec) を用いて、マクロファージ (CD11b 陽性細胞) を分離回収した。回収したマクロファージを 0.5×10^6 /ml の細胞密度で、10 % FBS・抗生剤 (ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml, アンフォテリシン B 0.25 g/ml) を含んだ RPMI に懸濁し、24 穴プレート(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)上に撒いた後、5% CO₂・37 °C の状態で一晩培養を行った。

培養マクロファージの刺激

マクロファージは腫瘍細胞により活性化され TAM の性質を獲得することが報告されている。RVT は種々の癌細胞をアポトーシスに向かわせることが知られている[38]。このため、アポトーシス誘導などの癌側の要因に左右されない共培養モデルとして、ID8-myc 培養上清で培養マクロファージを刺激した。ID8-myc 培養上清としては、ID8-myc を、10 % FBS・抗生剤（ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml, アンフォテリシン B 0.25 g/ml)を含んだ DMEM で一晩培養した上清を用いた。

細胞を RVT (0, 25, 50, 100 μ M) (Sigma) で 1 時間前処置を行い、ID8-myc 培養上清を 300 μ l 添加し、mRNA 発現検討では 6 時間、上清のタンパク発現検討では 24 時間それぞれ刺激した。

定量的 real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (以下 RT-qPCR)

RT-qPCR は、以前に当研究室で報告した方法を用いた[7, 68]。培養マクロファージから全 RNA を RNA easy mini kit (Qiagen)を用いて抽出した。分光光度計を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定し、抽出された RNA を定量した。RNA の持ち込み量は、1 μ g 以下とし、逆転写反応を行い (TOYOBO, Osaka, Japan)、相補的 DNA (以下 cDNA) を生成した。Light Cycler R 480 (Roche Applied Science, Tokyo,

Japan)、Universal Probe Master (Roche Applied Science)、及び下記のプライマー (Sigma-Aldrich Japan) とプローブ (Roche Applied Science) を用いて cDNA を 45 サイクル増幅した。

Mouse β -actin, probe88,

5'- ATTGAAACATCAGCCAAGACC-3',

5'-CCGAATCTCACGGACTAGTGT-3',

Mouse IL-6, probe6,

5'- GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3',

5'- CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'

IL-6 の発現レベルを β -actin を内部基準として Δ CT 法により解析した。

3、RVT と子宮内膜症

卵巣子宮内膜症組織、子宮内膜組織のサンプル採取

卵巣子宮内膜症組織および子宮内膜組織は、腹腔鏡下もしくは開腹下に切除された子宮内膜症性卵巣嚢胞および子宮より採取した。術前 3 か月以内に性ステロイドホルモンや GnRH アゴニストを投与されていない患者より組織を得た。関節リウマチや SLE などの免疫学的以上に関連している疾患を合併している患者は除外した。子宮内膜組織は子宮内膜症に罹患していない患者より得た。子

宮内膜症の診断は、病理学的に行った。培養実験には、子宮内膜症性卵巢嚢胞より無菌下に採取した嚢胞壁を卵巢子宮内膜症組織として、子宮より無菌的に採取した子宮内膜を子宮内膜組織として用いた。検体採取に関して東京大学倫理委員会の承認を受けており、卵巢子宮内膜症組織および子宮内膜組織については承認番号 324 である。手術前に患者より書面によりインフォームド・コンセントを得た。

子宮内膜症間質細胞の分離および培養

ESC は、以前に当研究室で報告した方法を用いた[75]。卵巢子宮内膜症組織はカミソリを用いて細切した後、collagenase (0.25 %, WAKO, Osaka, Japan)および deoxyribonuclease I recombinant (250 IU/ml, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を含んだ DMEM/F12 溶液 (Invitrogen, Carlsbad, California) に入れ、37°C で 2 時間攪拌した。攪拌した溶液を、100 μ m のセルストレーナー (Becton Dickinson and Co, Franklin Lakes, New Jersey) で 2 回濾過した後、70 μ m のセルストレーナー (Becton Dickinson and Co) で 1 回濾過した。濾過液を 250 g で 5 分間遠心分離して得られたペレットを ESC とした。ESC は、PBS で 2 回洗浄した後、5 % FBS・抗生剤 (ペニシリン 100 U/ml, ストレプトマイシン 0.1 mg/ml, アンフォテリシン B 0.25 g/ml) を含んだ DMEM/F-12 に懸濁し、10 cm 培養プレー

ト(Iwaki, Asahi technology Co, Tokyo, Japan)上に撒いた後、5% CO₂・37℃の状態
で培養を行った。1~2 日後、トリプシン処理法で細胞の継代を一回行った。この
際、細胞を 2×10^5 個/ml の状態で 6 穴プレートもしくは 12 穴プレートに撒いた。

ESC の刺激

継代して 2-3 日後に、細胞密度がコンフルエントに近づいたときに実験を行っ
た。アポトーシスの検討には 6 穴プレートで、mRNA 発現の検討には 12 穴プレ
ートで、上清のタンパク発現検討には 24 穴プレートで培養した ESC を用いた。
培養は全て、5 % FBS 下で行った。細胞を RVT (0, 10, 20, 40 μM) (Sigma)
で 1 時間前処置を行い、TNF- α (5 ng/ml) で mRNA 発現検討では 4 時間、上清
のタンパク発現検討では 24 時間それぞれ刺激した。

Surviving mRNA の発現検討には ESC を種々の濃度の RVT (0, 20, 40 μM) 存
在下で 24 時間培養した。アポトーシスの検討には、ESC を 24 時間 RVT (0, 40
μM) で前処置を行い、TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) (100 ng/ml)
で 18 時間刺激を行った。

RT-qPCR

培養細胞より Total RNA を Rneasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。RT-PCR kit (TOYOBO)を用い Total RNA を逆転写反応し、cDNA を得た。cDNA を Light Cycler(Roche)を用いて RT-qPCR を行った。PCR primer として、IL-8, survivin および GAPDH を用いた。

IL-8 sense primer, 5'-ACTTCCAAGCTGGCCGTGGCTCTCTTGGCA-3'

IL-8 antisense primer, 5'-TGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'

survivin sense primer, 5'- GGACCACCGCATCTCTACAT-3'

survivin antisense primer, 5' -GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3'

GAPDH sense primer, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC -3',

GAPDH antisense primer, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

IL-8 の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 66 °C, 8 秒、extension 72 °C, 10 秒とし、35 サイクルとした。survivin の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 57 °C, 11 秒、extension 72 °C, 10 秒とし、40 サイクルとした。GAPDH の PCR 条件は denaturing 95 °C, 15 秒、annealing 64 °C, 8 秒、extension 72 °C, 10 秒とし、35 サイクルとした。IL-8、survivin の発現レベルは GAPDH を内部基準として Δ CT 法により解析した。

細胞培養上清中の IL-8 の測定

培養上清中の IL-8 濃度は ELISA kit (Duo Set, R&D)を用いて ELISA 法で行った。

Annexin V-FITC アポトーシス解析

RVT 単独でのアポトーシス誘導効果の検討に関しては、6 穴プレートに 4×10^5 個の ESC を撒き一晩インキュベートした上で、RVT (0, 40 μ M)を添加し、24-48 時間インキュベート後にトリプシン処理を行った。RVT の TRAIL 誘導性アポトーシスへの影響の検討に関しては、6 穴プレートに 4×10^5 個の ESC を撒き一晩インキュベートした上で、RVT (0, 40 μ M)を添加し、24 時間インキュベート後に TRAIL(100 ng/ml)を添加し、18 時間培養した後にトリプシン処理を行った。PBS で 2 回洗浄後、Annexin V-FITC Apoptosis detection kit I (Abcam, USA) を用いて annexin-V FITC と PI で 2 重染色を行い、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス誘導率を算出した。

統計解析

データは、JMP ソフトウェア (Pro Version 9, SAS Institute, Cary, NC) を用いて解析した。2 群間の比較には Wilcoxon 検定、Student's *t* 検定、多群間の比較には Dunnett's 解析を用いた。 $P < 0.05$ で統計学的に有意差を認めるものとした。

結果

1、 ω 3 脂肪酸と子宮頸癌モデル

腫瘍形成の比較：fat-1 マウスでは腫瘍形成が抑制された。

fat-1 マウスは野生型マウスよりメラノーマ皮下腫瘍モデルでは腫瘍抑制効果が報告されている[13]。 ω 3 脂肪酸が体内に豊富にあることにより、子宮頸癌細胞株でも同様の腫瘍形成抑制効果を認めるかを検証した。その結果、TC-1 腫瘍の生着率には両群間で差はなく、WT、fat-1 とともにすべての個体で腫瘍の形成を認めた。TC-1 皮下投与後 7 日目、14 日目の腫瘍体積を測定した結果、fat-1、WT とともに腫瘍径の増大が見られたものの、その増大は fat-1 で有意に抑制された (図 4)。

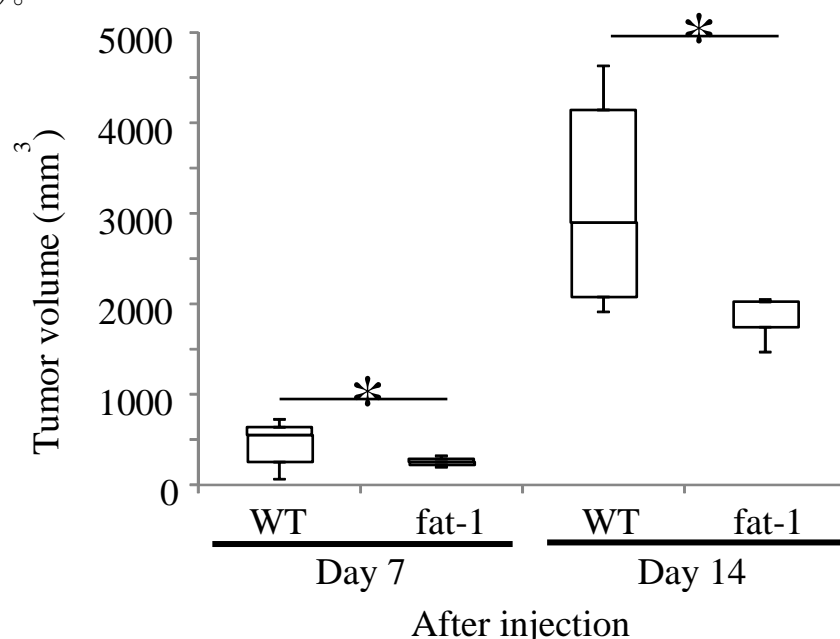


図 4 TC-1 腫瘍形成[76]

皮下投与後 7 日目、14 日目の腫瘍径から腫瘍体積を算出した (各群 n=10)。fat-1 マウスでは有意に腫瘍体積が小さかった (Wilcoxon 検定, $p < 0.05$)。WT: wild type

血管新生の検討：fat-1 マウスでは血管新生が抑制された。

ω 3 脂肪酸は腫瘍の血管新生を抑制することが報告されている[11]。TC-1 腫瘍モデルにおいて血管新生抑制を認められるかを、CD-31 免疫染色を用いて検証した。光学顕微鏡、100 倍下で CD-31 陽性の血管内皮の本数を数え、半定量的解析を行った（図 5）。fat-1、WT 腫瘍検体（n=5）からの平均を比較したところ、fat-1 からの腫瘍組織では WT からの腫瘍組織に比べて血管密度が疎であることがわかった。

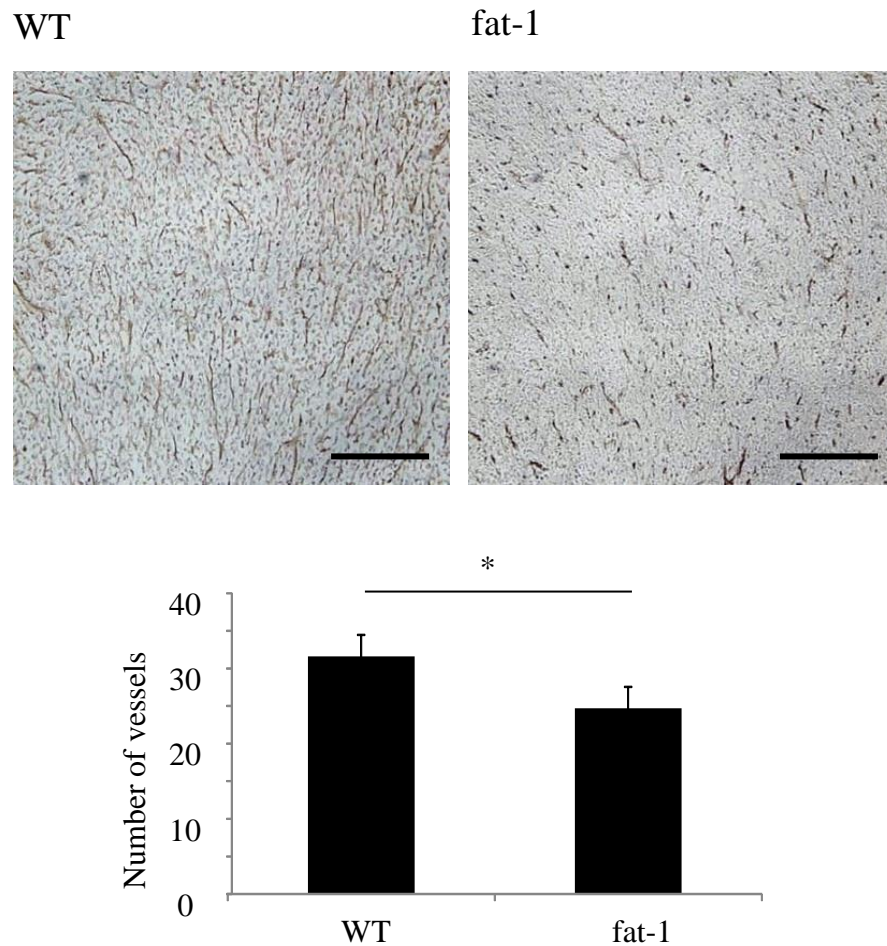


図5 血管新生の評価[76]

14 日目に摘出した腫瘍検体で CD-31 免疫染色を用いて検証した。光学顕微鏡、100 倍下（バーは 200 μm ）で CD-31 陽性の血管内皮の本数を数え、半定量的解析を行った（各群 $n=5$ ）。fat-1 マウスでは有意に血管の本数が少なかった（Student's t 検定, $p<0.05$ ）。WT: wild type

腫瘍組織における遺伝子発現の比較

fat-1 マウスにおいて腫瘍形成を抑制した機序を解明するため、腫瘍組織における腫瘍形成に関わる遺伝子発現についてマイクロアレイ分析を行った。マイクロアレイ解析に関しては同研究室、富尾賢介先生がサンプル回収、RNA 抽出、解析委託を行った。

fat-1 と WT との間で比較検討を行い、主な炎症性サイトカイン、MMP、増殖因子について fat-1/WT の比を表 1 にまとめた。fat-1/WT が 2 より大きい、もしくは 0.5 より小さい場合に有意差を認めることとなる。多くのサイトカインでは fat-1 の方で高い傾向にあったが、腫瘍形成に関わる MMP-9、MMP-2 は fat-1 で低い傾向にあり、特に MMP-9 に関しては、fat-1/WT が 0.4 となり、fat-1 で低い傾向を示した（表 1）。腫瘍組織の MMP-9 mRNA 発現を RT-qPCR を用いて計測した。その結果、fat-1 では MMP-9 発現は約 40 %に抑制されていた（図 6）。

表 1 腫瘍組織の遺伝子発現[76]

Genes	fat-1/WT ratio
EGF	0.4
CXCL-12	1.2
HGF	1.3
TGF- α	1.4
IL-6	2.0
IFN- γ	2.4
TNF- α	3.3
VEGF	3.7
IL-1 β	12.0
MMP-9	0.4
MMP-2	0.6
MMP-7	1.9
MMP-1b	2.9
MMP-3	2.9
MMP-13	2.9
MMP-1a	3.6
MMP-16	4.1
MMP-10	11.6

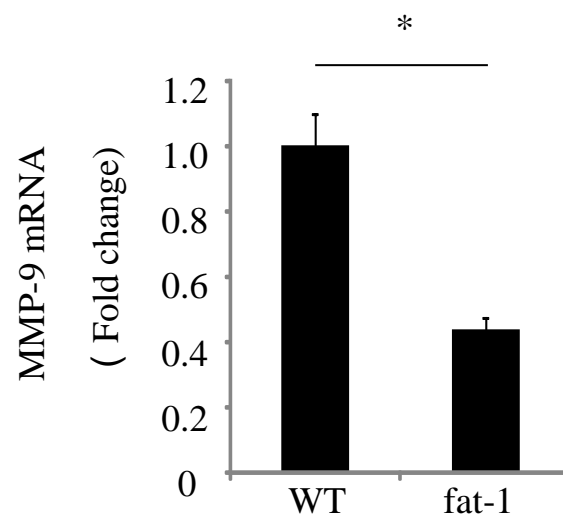


図 6 腫瘍組織の MMP-9 発現の評価[76]

14 日目に摘出した腫瘍検体から RNA を回収し、MMP-9 mRNA を RT-qPCR で測定した。MMP-9 の発現レベルを β -actin を内部基準として $\Delta\Delta$ CT 法により解析した。(各群 $n=4$)。fat-1 マウスでは腫瘍組織の MMP-9 の発現が抑制されていた (Student's t 検定, $p<0.05$)。WT: wild type

MMP-9 は腫瘍間質部分から発現し、それは **fat-1** マウスで抑制されていた。

MMP-9 は癌細胞以外にも CAF や TAM、血管内皮細胞などの腫瘍内微小環境から強く発現していることが知られている。**fat-1** マウスと **WT** マウスでの **MMP-9** 発現の違いが主にどの組織に由来するかを検討するため腫瘍組織の **MMP-9** 免疫染色を用いて検討した。

その結果、**WT** においては、血管内皮細胞や CAF など腫瘍間質部分から **MMP-9** の強い発現が認められた。一方、**fat-1** では組織全体としての **MMP-9** の発現も弱く、また、間質部分や血管内皮でもその発現が弱いことがわかった（図 7）。

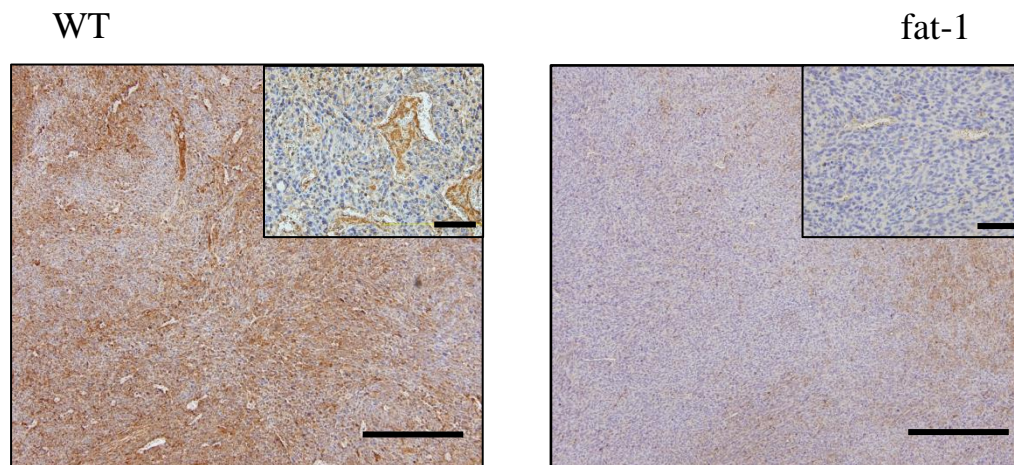


図 7 **MMP-9** 免疫染色[76]

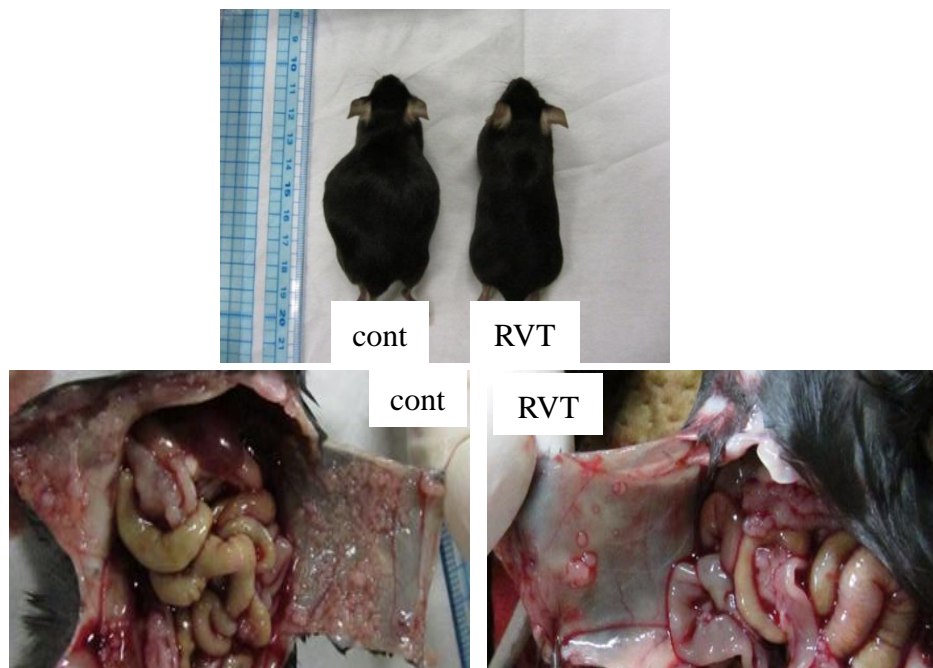
14 日目に摘出した腫瘍検体で **MMP-9** 免疫染色を行った。光学顕微鏡、100 倍下と 400 倍下（バーは低倍率：200 μm 、高倍率：50 μm ）で観察した。WT: wild type

2、RVT と癌性腹膜炎

播種形成と腹水産生の検討

ID8-myc 腹腔内投与後 6-7 週に解剖を行い、播種形成・腹水産生を評価した結果、6-7 週目には RVT 投与群、コントロール群ともに全てのマウスで血性腹水の産生を認めた。また、腹膜や腸間膜に 1-3mm 大の播種病変を認めた。RVT 投与群では播種形成が少ない傾向にあり、腹水産生量はコントロール群に比べ、約 50 % にまで抑制した（図 8-A, B）。

A



B

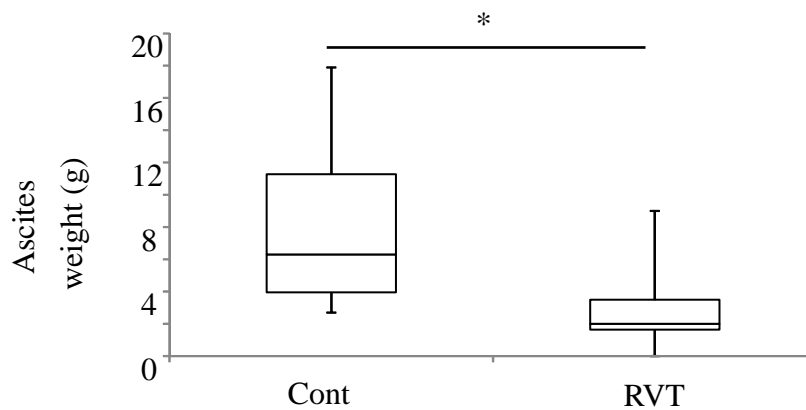


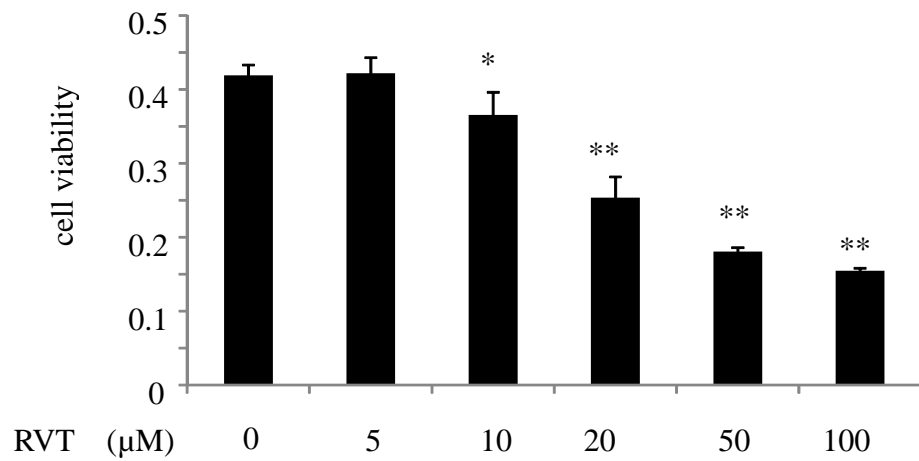
図 8 腹膜癌播種形成と腹水産生

ID8-myc 細胞を腹腔内投与後約 7 週間後の腹膜播種形成 (A) と腹水産生量 (B) を評価した。(Cont 群 : n=8、RVT 群 : n=7)。腹水産生は RVT 群で有意に少なかった (Student's *t* 検定, $p < 0.05$)。Cont: control, RVT: resveratrol

RVT は濃度依存的に ID8-myc のアポトーシスを誘導した。

RVT は多くの癌細胞の増殖を抑制したりアポトーシスを誘導したりすることが報告されている[38]。 *In vivo* の腹水中には間質細胞や免疫細胞が多く存在し、癌細胞の増殖やアポトーシスのみを検討することは困難である。このため、 *In vitro* で RVT の ID8-myc 細胞に与える影響を検討した。ID8-myc を各濃度の RVT 存在下で 24h 培養し、生細胞数とアポトーシス誘導率を検討した。その結果、RVT は濃度依存的に ID8-myc 細胞の増殖を抑え、その機序は、ID8-myc 細胞をアポトーシス誘導することによることがわかった (図 9)。

A



B

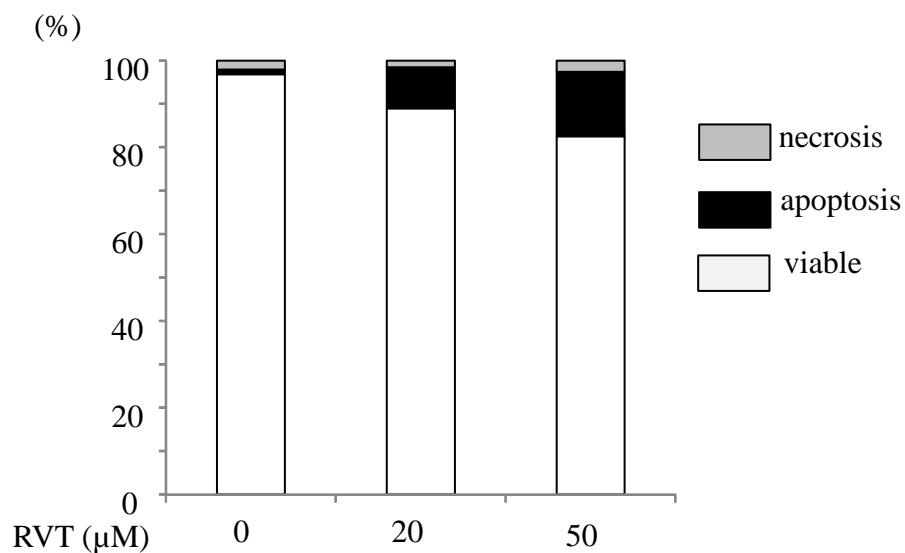


図9 RVTによるID8-mycの増殖とアポトーシスに与える影響

(A) ID8-myc を RVT(0, 5, 10, 20, 50, 100 μM)存在下で 24h 培養し、生細胞数を 490 nm の吸光度計で測定した。2 回の独立した試験を行い、その代表的なデータを示す。Dunnett's 解析を行った (*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$)。

(B) ID8-myc を RVT(0, 20, 50 μM)存在下で 24h 培養し、annexin-V FITC と PI で 2 重染色を行い、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス誘導率を算出した。独立した 2 回の試験を行い、その代表的なデータを示す。RVT: resveratrol

RVT は腹水中の IL-6 の産生を抑制した

RVT は腫瘍に対するアポトーシス誘導効果の他、さまざまな間質細胞の炎症性反応を抑制することが報告されている[77, 78]。また、癌性腹膜炎は癌と間質細胞や免疫担当細胞が相互作用し腹腔内で慢性炎症状態となっている。癌性腹膜炎による炎症に対する RVT の効果を検討するため、腹水中の炎症性サイトカインの濃度を検討した。代表的な炎症性サイトカインである、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 濃度を、ELISA 法を用いて検討したが、TNF- α と IL-1 β は RVT 投与群、コントロール群共に感度以下であった。これらの中で、IL-6 はどちらの群でも測定可能であった。また、その濃度は RVT 投与群で約 60%まで抑制されていたことがわかった（図 10-A）。また、IL-6 の濃度は腹水量とは相関しなかった。このことより、RVT は腹水産生抑制効果を持つ以外にも、独立して IL-6 産生を抑制したことがわかった（図 10-B）。

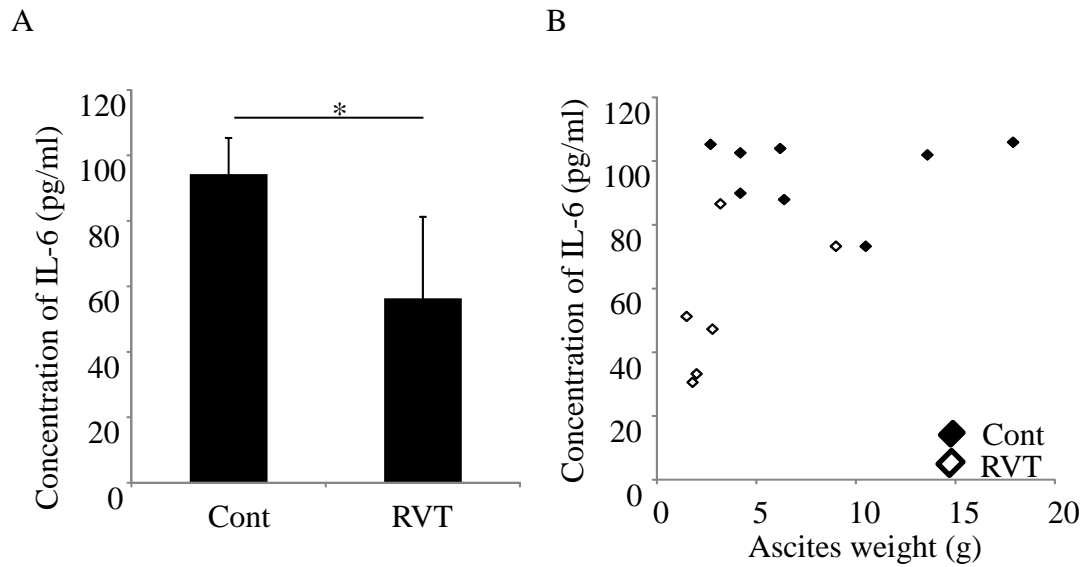


図 10 腹水中の IL-6 濃度と腹水量との相関

(A) ID8-myc 細胞を腹腔内投与後約 7 週間後の腹水中の IL-6 の濃度。IL-6ELISA を用いて測定した (Cont 群 : $n=8$ 、RVT 群 : $n=6$)。腹水中 IL-6 濃度は RVT 群で有意に少なかった (Student's t 検定, $p<0.05$)。 (B) 腹水量との相関 : IL-6 濃度は腹水量とは相関を認めなかった (CORREL=0.452)。Cont: control, RVT: resveratrol

RVT は培養腹腔内マクロファージの癌誘導性 IL-6 の産生を濃度依存的に抑制した。

腹腔内の IL-6 の産生細胞として、CAF や CAA、TAM が考えられた。RVT は種々の間質細胞において炎症抑制効果が報告されている。また、それぞれの間質細胞は腫瘍により活性化され、IL-6 の産生が誘導されることが報告されている。この中で、我々は腹腔内マクロファージに注目し、*in vitro* で癌細胞が産生する因子による腹腔内マクロファージの活性化に RVT がどう影響を与えるかを検討した。

腫瘍内微小環境では癌細胞の産生する液性因子によりマクロファージが活性化することが知られている。また前頁の *in vitro* の検討より、ID8-myc 細胞は RVT により濃度依存的にアポトーシス誘導されることが分かった（図 10）。純粋な RVT のマクロファージに対する影響を検討するため、ID8-myc 上清による腹腔内マクロファージの活性化とそれに及ぼす RVT の効果を検討した。その結果、腹腔内マクロファージは、ID8-myc 培養上清の添加によって、IL-6 産生を 10 倍以上増加させることがわかった。また、その産生は、RVT によって濃度依存的に抑制され、50 μ M 添加下では mRNA レベルで約 50 %にまで、タンパクレベルで約 60 %にまで抑制された（図 11）。

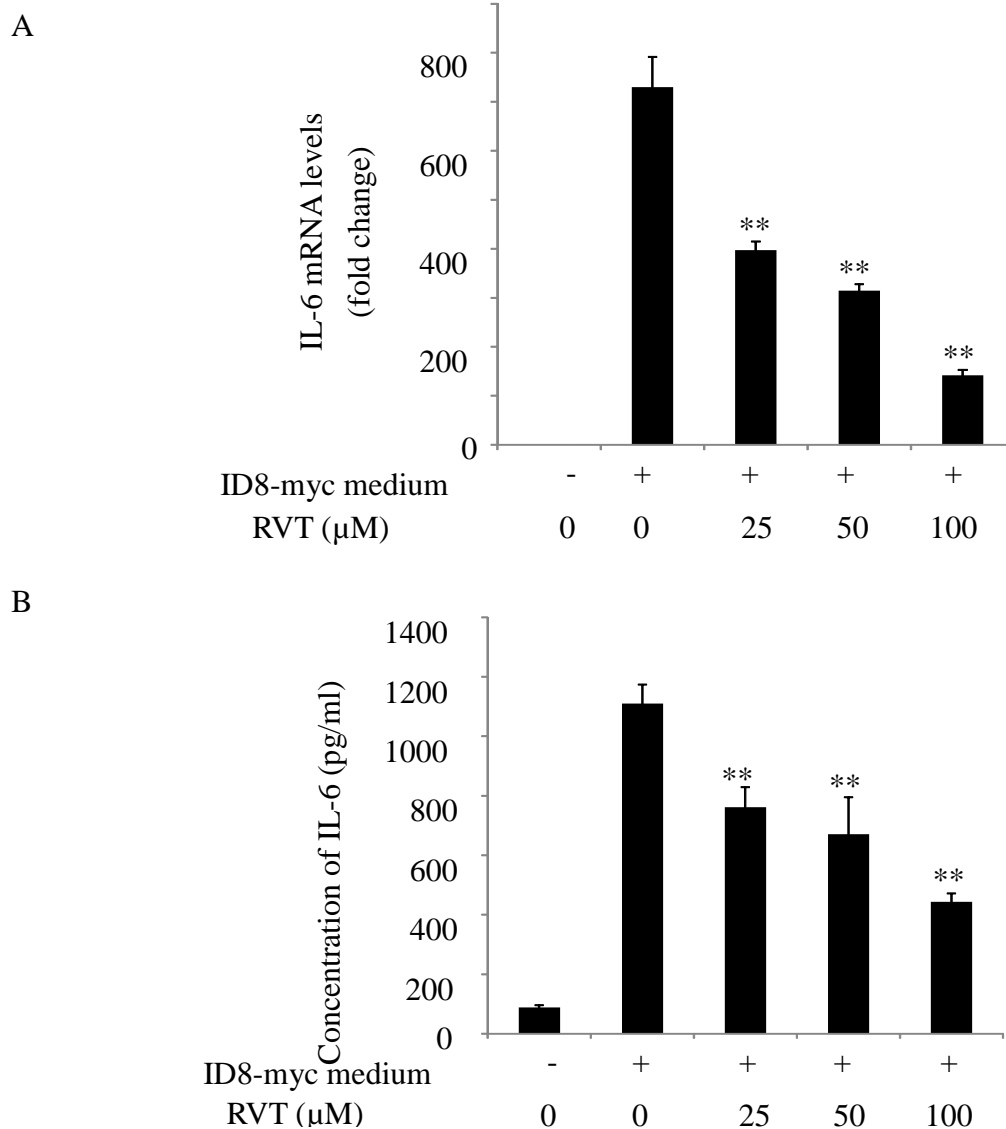


図 11 RVT による腹腔内マクロファージの癌液性因子誘導性 IL-6 産生に対する影響

腹腔内マクロファージを RVT で前処置を行い、ID8-myc 培養上清により刺激をし、マクロファージからの IL-6 産生を評価した。3 回の独立した試験を行いその代表的なデータを示す。Dunnett's 解析を行った (*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$)。

(A) ID8-myc 培養上清により刺激 6 時間後に RNA を回収し、IL-6 mRNA を RT-qPCR で測定した。IL-6 の発現レベルを β -actin を内部基準として $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。(B) ID8-myc 培養上清により刺激 24 時間後に上清を回収し、IL-6 蛋白濃度を ELISA 法で測定した。RVT: resveratrol

3、RVT と子宮内膜症

RVT は TNF- α によって誘導される IL-8 の発現を濃度依存的に抑制した。

RVT は間質細胞や免疫担当細胞などの様々な細胞において炎症抑制効果を持つことが知られている。ESC は腹腔内のマクロファージをはじめとする免疫担当細胞からの炎症性サイトカインにより活性化され IL-8 などのサイトカインを放出することが知られている[79]。RVT が TNF- α により活性化される ESC の炎症性反応に対し抗炎症効果を持つかを検討した。ESC を各濃度の RVT で前処理し、TNF- α で刺激を行い、IL-8 の mRNA、蛋白レベルをそれぞれ検討した。その結果、RVT は TNF- α によって誘導される ESC からの IL-8 発現を濃度依存的に抑制することがわかった (図 12)。

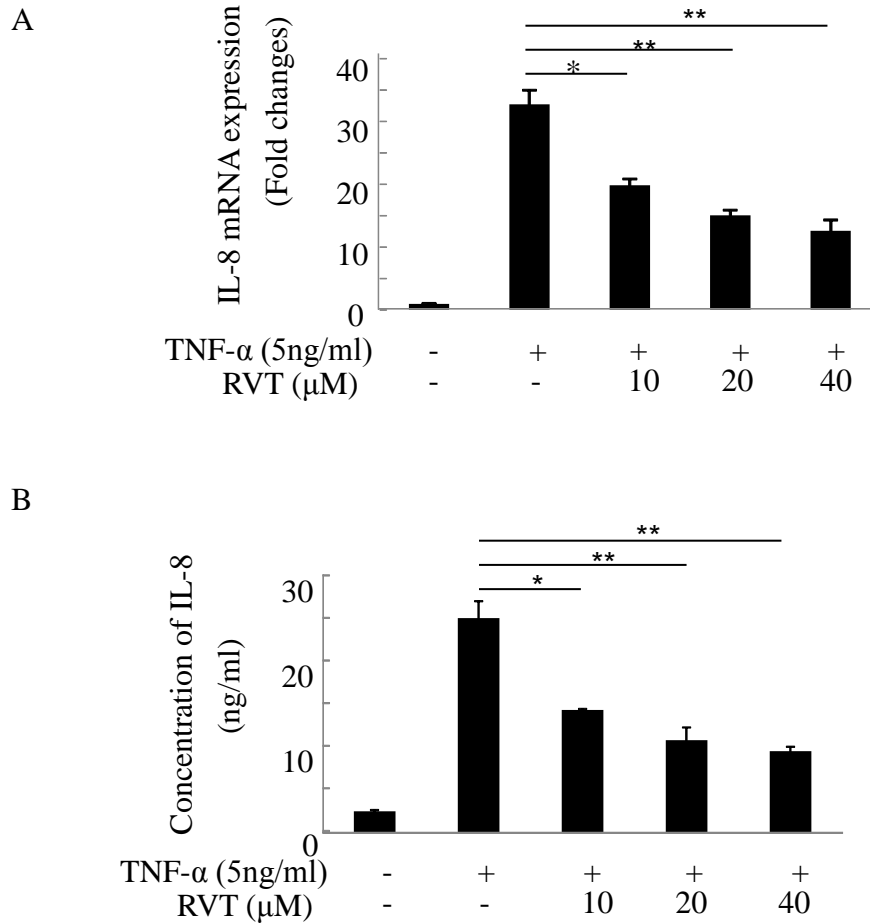


図 12 RVT による ESC の TNF- α 刺激誘導性の IL-8 産生に対する影響[80]

ESC を RVT で前処置を行い、1 時間後に TNF- α で刺激をし、ESC からの IL-8 産生を評価した。2 回の独立した試験を行いその代表的なデータを示す。Dunnett's 解析を行った (*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$)。(A) TNF- α により刺激 4 時間後に RNA を回収し、IL-8 mRNA を RT-qPCR で測定した。IL-8 の発現レベルは GAPDH を内部基準として $\Delta\Delta CT$ 法により解析した。(B) TNF- α により刺激 24 時間後に上清を回収し、IL-8 蛋白濃度を ELISA 法で測定した。RVT: resveratrol

RVT は単独では ESC のアポトーシスを誘導しなかった。

RVT は様々な癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが知られている。ID8-myc でも RVT により濃度依存的にアポトーシス誘導がみられた。

このため、RVT が ESC のアポトーシスを誘導するかを検討した。

RVT で 24-48 時間培養した後、Annexin-V PI 染色での FACS を施行した。その結果、RVT は単独では 40 μ M 下でも ESC のアポトーシスを誘導しないことがわかった (図 13) (Cont: 3.80 ± 0.53 , RVT: 4.47 ± 1.70 (%))。

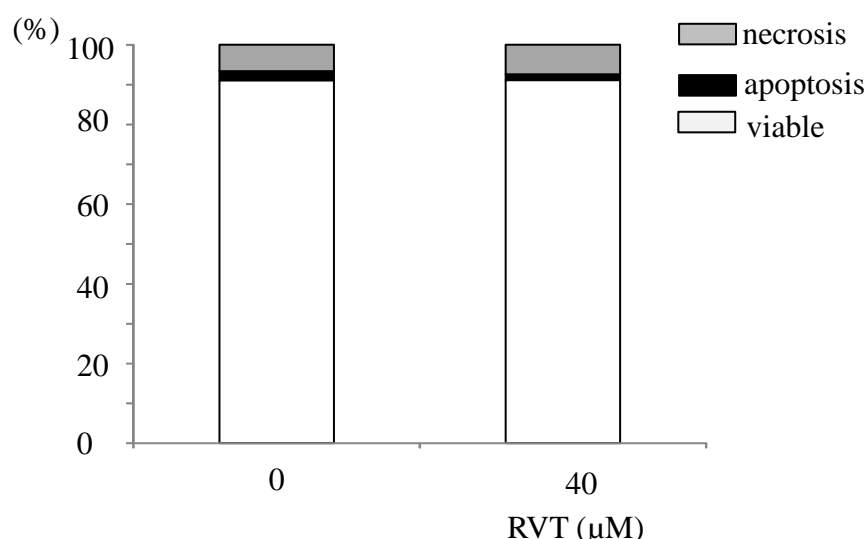


図 13 RVT による ESC のアポトーシス誘導効果

ESC を RVT(0, 40 μ M)存在下で 24h から 48h 培養し、annexin-V FITC と PI で 2 重染色を行い、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス誘導率を算出した。独立した 3 回の試験を行い、その代表的なデータを示した。アポトーシス誘導率は、Cont: 3.80 ± 0.53 , RVT: 4.47 ± 1.70 (%)であった (Student's *t* 検定, 有意差なし)。RVT: resveratrol

RVT は ESC の TRAIL に対するアポトーシス誘導効果を高めた。

RVT は様々な細胞でアポトーシス感受性を高めることが知られている。子宮内膜症の患者の腹腔内では osteoprotegerin (OPG) 濃度が高いことがわかっており、OPG は受容体の競合を介して TRAIL と競合するため、子宮内膜症患者では TRAIL 誘導性アポトーシスが起こりにくくなっていることが知られている[81]。このため、RVT が ESC の TRAIL 感受性に影響を及ぼすかを検討した。RVT (40 μ M) 存在下で 24 時間培養した後、TRAIL (100 ng/ml) で 18 時間刺激をし、Annexin-V PI 染色での FACS を施行した。TRAIL は、単独では ESC のアポトーシスを誘導しなかったが、RVT (40 μ M) で前処置をすることで、ESC のアポトーシスを誘導することがわかった (図 14) (TRAIL: 9.03 ± 1.28 , TRAIL+RVT: $46.16 \pm 5.01(\%)$: $p < 0.05$)。3 回の独立した試験を施行した。

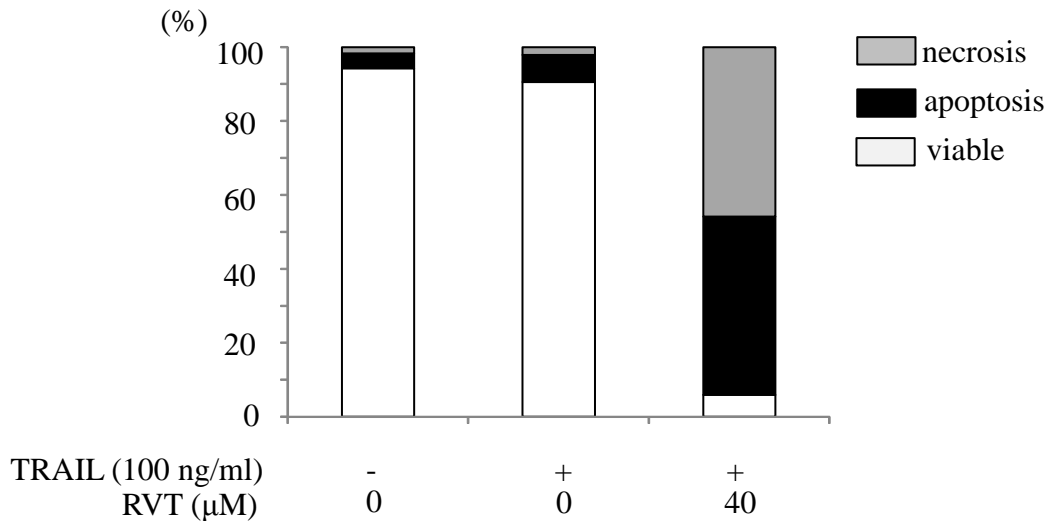


図 14 RVT による ESC の TRAIL 誘導性アポトーシスに及ぼす影響

ESC を RVT(0, 40 μ M)存在下で 24h 培養し、TRAIL(100 ng/ml)を添加し、18h 培養した。annexin-V FITC と PI で 2 重染色を行い、フローサイトメトリーを用いてアポトーシス誘導率を算出した。独立した 3 回の試験を行い、その代表的なデータを示した。アポトーシス誘導率は、TRAIL:9.03 \pm 1.28, TRAIL+RVT:46.16 \pm 5.01(%)であった (Student's *t* 検定, $p < 0.05$)。TRAIL: TNF related apoptosis-inducing ligand, RVT: resveratrol

ESC の survivin mRNA の発現は RVT で抑制された。

ESC はアポトーシス刺激に対して survivin 発現が維持されることによりアポトーシス耐性であることが報告されている[66]。また、RVT は種々の細胞で survivin 発現を低下させることが報告されている[82]。RVT が ESC における survivin mRNA の発現に与える影響を検討した。ESC を RVT 40 μ M で 24 時間培養し、RT-qPCR で survivin の発現を評価した。その結果、RVT は survivin の発現を有意に低下させることがわかった (図 15)。

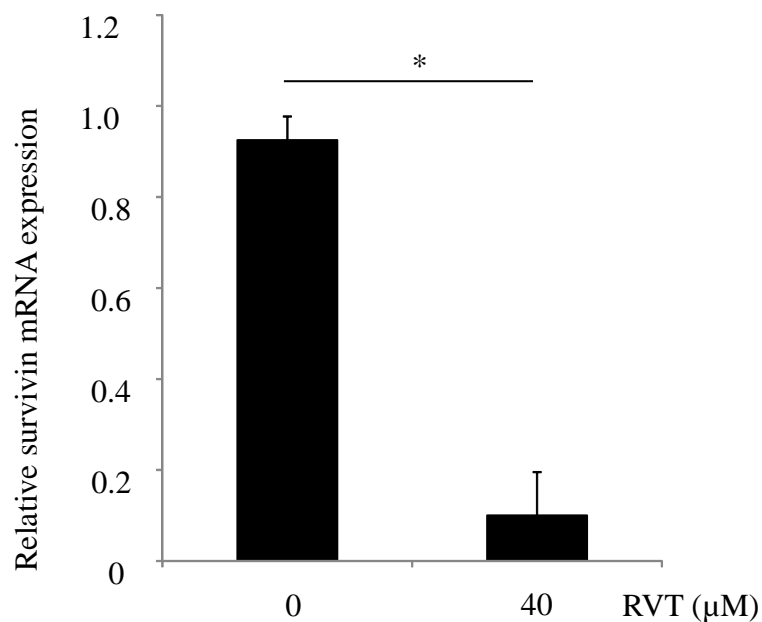


図 15 RVT による ESC の survivin mRNA 発現への影響

ESC を RVT(0, 40 μ M)存在下で 24h 培養し、RNA を回収し、survivin mRNA を RT-qPCR で測定した。survivin の発現レベルは GAPDH を内部基準として Δ CT 法により解析した。独立した 3 回の試験を行いその平均を表した。RVT により ESC の survivin mRNA 発現は有意に抑制された (Student's *t* 検定, $p < 0.05$)。

RVT: resveratrol

考察

ω 3 脂肪酸や RVT の悪性腫瘍への効果

ω 3 脂肪酸や RVT は、悪性腫瘍に対し癌細胞そのものの増殖を抑制したりアポトーシスを誘導したりすることがよく研究されている。本研究により、ω 3 脂肪酸や RVT は、癌細胞以外の腫瘍内微小環境の構成成分である間質細胞から産生される MMP-9 や IL-6 の発現を抑制することで、腫瘍内微小環境にも抗腫瘍的に働く可能性が示唆された。また、子宮内膜症の場合はその病態の本体でもある ESC に対して RVT が抗腫瘍・抗炎症効果を持つことが示唆された。

ω 3 脂肪酸と子宮頸癌モデルの研究からは、ω 3 脂肪酸が CAF をはじめとした腫瘍内微小環境から産生される MMP-9 の産生を抑制していることがわかった。MMP-9 は細胞外基質を分解することで、血管新生や転移、浸潤を促進させ腫瘍進展を促進することが知られている[83, 84]。このため、MMP-9 を抑制する薬は腫瘍形成や転移・浸潤などの腫瘍進展を抑制することが報告されている[85]。本研究でも、因果関係は言及できていないものの、MMP-9 抑制は血管新生を抑制することを介して腫瘍形成抑制に働いた可能性が示唆される。本研究では癌細胞に対する ω 3 脂肪酸の効果は検討できていないものの、子宮頸癌モデルへの腫瘍形成抑制効果には、腫瘍細胞そのものへの増殖抑制・アポトーシス誘導効果に加え、腫瘍内微小環境からの MMP-9 の発現を抑制する

ことで、より効率的に抗腫瘍効果を認めた可能性が示唆された（図 16）。

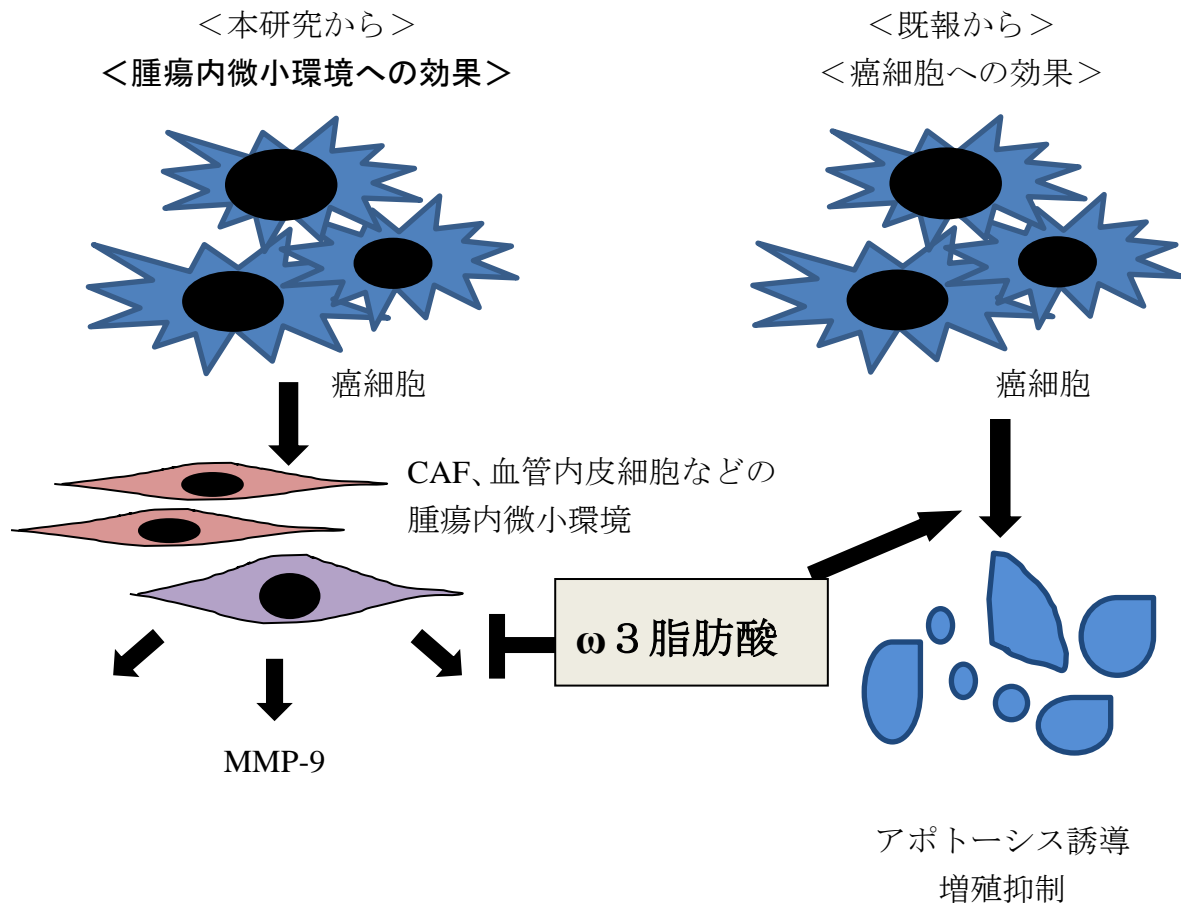


図 16 ω3 脂肪酸の子宮頸癌モデルへの効果

ω3 脂肪酸は癌細胞の増殖抑制・アポトーシス誘導効果（既報より）を有するとともに、CAF や血管内皮細胞などの腫瘍内微小環境の活性化を抑制することで子宮頸癌モデルに効果を持つ可能性がある。CAF: cancer associated fibroblast

RVT と癌性腹膜炎の研究からは、RVT が腹腔内環境の中で IL-6 の産生を抑制することが判明した。IL-6 は卵巣癌の腹腔内環境において炎症を司る中心的なサイトカインである[86]。また、IL-6 は多くの悪性腫瘍において、腫瘍進展に関わり、予後不良との相関も認められている[87]。また、マクロファージ由来の IL-6 は腫瘍の増殖や浸潤を亢進させることもわかってきている[88, 89]。このため、腫瘍進展を抑制するために、IL-6 の産生を抑制することが重要であると考えられている。またその他にも、IL-6 は癌性腹膜炎や進行癌に伴う悪液質の病態において中心的なサイトカインであり、IL-6 産生の抑制は、悪液質の治療においても注目されている[86, 87, 90]。

本研究では癌細胞から分泌される液性因子によるマクロファージの活性化を RVT が濃度依存的に抑制することがわかった。腫瘍内環境で IL-6 を産生するのはマクロファージの他にも CAF や CAA などが考えられる。一方、RVT は様々な間質細胞において種々の刺激に伴う活性化を抑制することが報告されている[77, 78]。今回我々は RVT のマクロファージ活性化抑制効果に注目したが、RVT は腫瘍内微小環境においてマクロファージだけではなく、CAF や CAA の活性も抑えることで腹腔内 IL-6 濃度の抑制に寄与している可能性も考えられる。また、RVT は ω 3 脂肪酸同様に種々の癌細胞の増殖を抑制したりアポトーシスを誘導したりすることが報告されている[31-36]。本研究からも、*in vitro* の検討ではあ

るが、RVTは濃度依存的にID8-mycのアポトーシスを誘導することがわかった。

RVT は癌性腹膜炎に対して、腫瘍細胞そのものへの増殖抑制・アポトーシス誘導効果に加え、腫瘍内微小環境からの IL-6 の産生を抑制することで、抗腫瘍・抗炎症の両側面から癌性腹膜炎に効果的である可能性が示唆された (図 17)。今回の検討で用いた RVT の濃度は 40 mg/kg/day であり、体表面積補正を加えた際、60 kg のヒトに換算すると $40 \text{ mg} \times 60 \text{ kg} \times 0.08 = 192 \text{ mg/day}$ となり、Edwards 等により確認された 450 mg という一日許容量以下の容量である[91]。このことから、*in vivo* での投与の実験においては副作用の少ない許容範囲内の濃度であることが推定される。しかし、*in vitro* の研究においては、我々の知る限りでは、組織中での腹腔内での RVT 濃度に関する文献は認めず、腹腔内で実際に RVT が 25 μM という濃度に達しているかどうかは今後検討の必要があると考える。

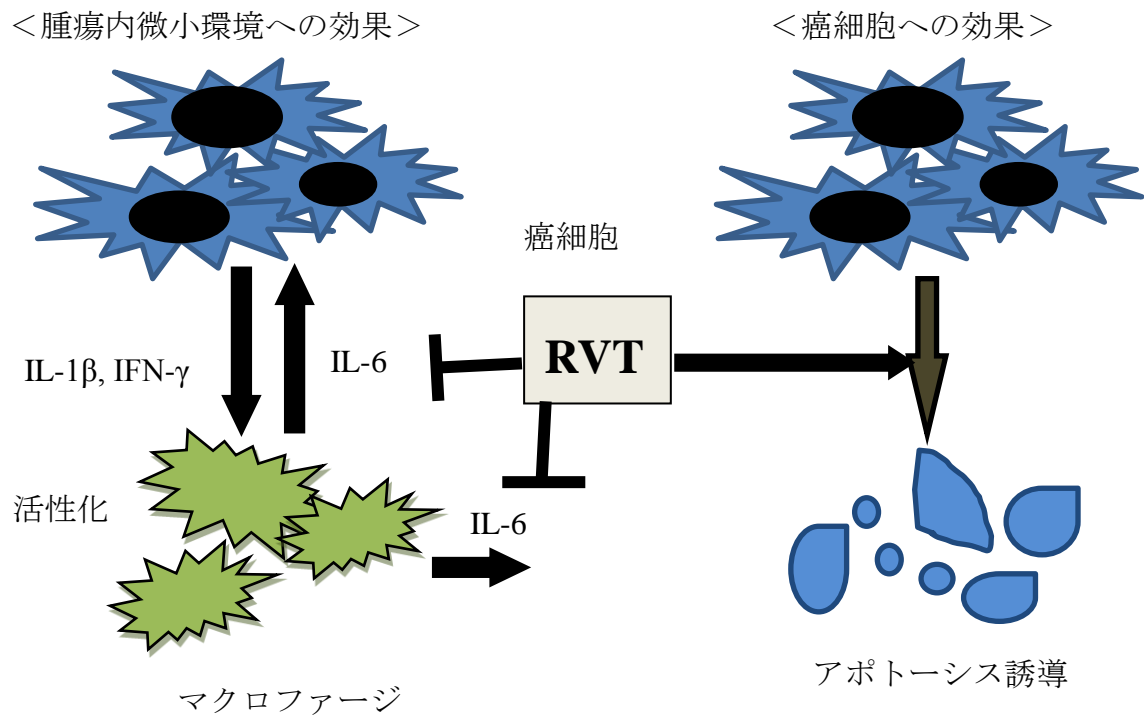


図 17 RVT の癌性腹膜炎への効果

RVT は癌性腹膜炎に対して、腫瘍細胞そのものへの増殖抑制・アポトーシス誘導効果に加え、腫瘍内微小環境からの IL-6 の産生を抑制することで、抗腫瘍・抗炎症の両側面から癌性腹膜炎に効果的である可能性がある。RVT: resveratrol

悪性腫瘍の研究において、従来までは癌細胞そのものをターゲットとした治療戦略が考えられてきた。近年になり、腫瘍内微小環境の構成成分が癌の浸潤・転移・治療抵抗性などにおいて非常に重要な役割をもつことが判明してきている。癌細胞は腫瘍内微小環境を癌進展に都合のよいように活性化もしくは抑制している。例えば、CAF の場合、その起源は上皮細胞の上皮間葉転換や 間葉系幹細胞からなるという説もあり、その起源についてははっきりとはしていないが、主には正常線維芽細胞が癌により活性化されることで CAF に変化すると考えられている[92, 93]。CAF は癌増殖に必要な増殖因子やサイトカインを放出することで癌細胞の増殖、浸潤、転移を促進しているといわれている[92, 93]。腫瘍内微小環境で TAM は、血管新生を促進することで腫瘍形成を促進したり[94]、サイトカインや増殖因子を放出することで癌細胞に直接働きかけ浸潤を促進したり[88, 89, 95]することがわかってきている。また、免疫機構も同様に癌進展をより促進するように制御されていることが多い。癌に浸潤しているリンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TIL) は TGF- β などのサイトカインにより制御性 T 細胞 (T-reg) の割合が多いことや、癌細胞や腫瘍内微小環境で発現される PDL-1 により細胞障害能が抑制されていることが報告されている[96-98]。このように悪性腫瘍における微小環境は癌進展や治療抵抗性に不可欠なものとなっている。

近年では、これらの微小環境を制御することで癌治療につなげようという研究が盛んに行われてきている。CAF をターゲットとした治療戦略としては、活性化される CAF で fibroblast activation protein (FAP)が高発現していることを利用して、FAP によって活性化される Thapsigargin の前駆物質が皮下腫瘍モデルで抗腫瘍効果を示したことが報告されている[99]。また、CAF の活性化に注目した方法としては、CAF の活性化が TGF- β によってもたらされることが注目されていることから、TGF- β シグナルを抑制する方法も試みられており、TGF- β 受容体のデコイである bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI),を発現させることで *in vivo*, *in vitro* で抗腫瘍効果がみられる[100]など CAF をターゲットとした治療戦略が検討されている。TAM をターゲットとした治療戦略としては、活性化された TAM により強く発現している folate receptor β (FR β)をターゲットとした抗FR β 抗体がグリオーマに効果があることが報告されている[101]。また、その他にも、腹膜播種モデルで NF- κ B の活性を阻害することで TAM の M2 への形質転換を抑制し腹膜播種を抑制する[71]ことや、抗炎症作用のある Yondelis (Travectedin) が単球のマクロファージへの分化や活性を抑制する[102]など、TAM を直接的間接的に制御することによる治療戦略が検討されている。

今回用いた、 ω 3 脂肪酸や RVT といった食品成分は、それぞれ子宮頸癌モデ

ル、腹膜癌モデルに対して腫瘍進展を遅らせることができたが、抗癌剤のように癌を制圧するのに十分な威力はなく、子宮頸癌モデル、腹膜播種モデルともに治療薬としては不十分であるといえる。しかし、その機序は非常に興味深く、腫瘍細胞に働きかけるのみならず、腫瘍内微小環境を癌進展抑制方向に調節している可能性が本研究から示唆された。もっとも、今回用いた ω 3脂肪酸や RVT は腫瘍内微小環境に特異的に作用するわけではなく、その効果も十分とは言えない。しかし、これらは食品由来の成分であり、副作用が少ないことが予想される。このことより、QOL の低下している患者における代替療法としての使用も期待することができるだろうし、腫瘍内微小環境を制御できることから、化学療法や放射線療法といった抗腫瘍的治療の補助療法としての可能性を秘めていると思われる。

RVT の子宮内膜症への効果

本研究では、悪性腫瘍のみならず、婦人科の腫瘍性・炎症性側面を持つ疾患として子宮内膜症に対する食品成分の効果を検討した。前述したように、 $\omega 3$ 脂肪酸が子宮内膜症に抑制効果を持つことは、当研究室から既に報告をしている。一方、子宮内膜症と RVT に関する研究は、2011 年にマウスモデルにおいて RVT が子宮内膜症の進展を抑制することが報告されてから[103]急速に進められてきている。その例として、マウスモデルやラットモデルにおいて、RVT が病巣での上皮細胞・間質細胞両者の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告された[103, 104]。またその後、ラットモデルにおいて、RVT が血管新生を抑制し、子宮内膜症の進展を抑制することが報告された[104, 105]。一方、ヒトにおいても、LEP との併用で子宮内膜症に由来する疼痛に効果的だったこと、その機序として COX-2 抑制が示唆されること、が報告されている[106]。これらの研究から、RVT は子宮内膜症の治療薬としても非常に有望であることがうかがわれる。

本研究では ESC を用いた *in vitro* の研究で、RVT の ESC に対する抗炎症効果とアポトーシス誘導効果を検討した。その結果、RVT は濃度依存的に ESC の TNF- α 誘導性の炎症反応を抑制することがわかった。一般に、子宮内膜症では、マクロファージからの TNF- α や IL-1 β といった炎症性サイトカインの放出、炎

症性サイトカインによる ESC の活性化 (IL-6, IL-8 の放出や増殖の促進)、さらに ESC から放出される IL-6 等のサイトカインが再度マクロファージを活性化させるという、炎症の悪循環が成立していると考えられている[107]。一方、RVT は、種々の刺激に対するマクロファージからの炎症性サイトカイン放出を抑制する作用を持つことも報告されている[108, 109]。もっとも本研究では、TNF- α に対する ESC からの IL-8 の産生という「炎症の悪循環」の一部の側面しか評価できていないが、RVT は子宮内膜症の 1 つの病態である「炎症の悪循環」を断ち切ることのできる理想的な治療薬となる可能性があると考えられる。

子宮内膜症患者では子宮内膜症病変の TRAIL 誘導性アポトーシスに対する耐性が知られており[81]、一方で、RVT は種々の細胞において TRAIL 誘導性アポトーシス感受性を高めることが知られている[82, 110]。ESC においても RVT は、単独ではアポトーシスを誘導しないが、TRAIL 誘導性アポトーシスの感受性を高めることでアポトーシス誘導に寄与することがわかった。RVT による、抗アポトーシス蛋白である survivin の発現抑制がその機序の一つとして考えられた。このことより、RVT は、ESC における抗炎症作用のみならず、ESC の TRAIL 誘導性アポトーシスの感受性を高めることによっても子宮内膜症治療薬として期待できることが示唆された (図 18)。以上より、RVT はその抗炎症作用、アポトーシス誘導作用から子宮内膜症の治療薬として期待できると考えられる。

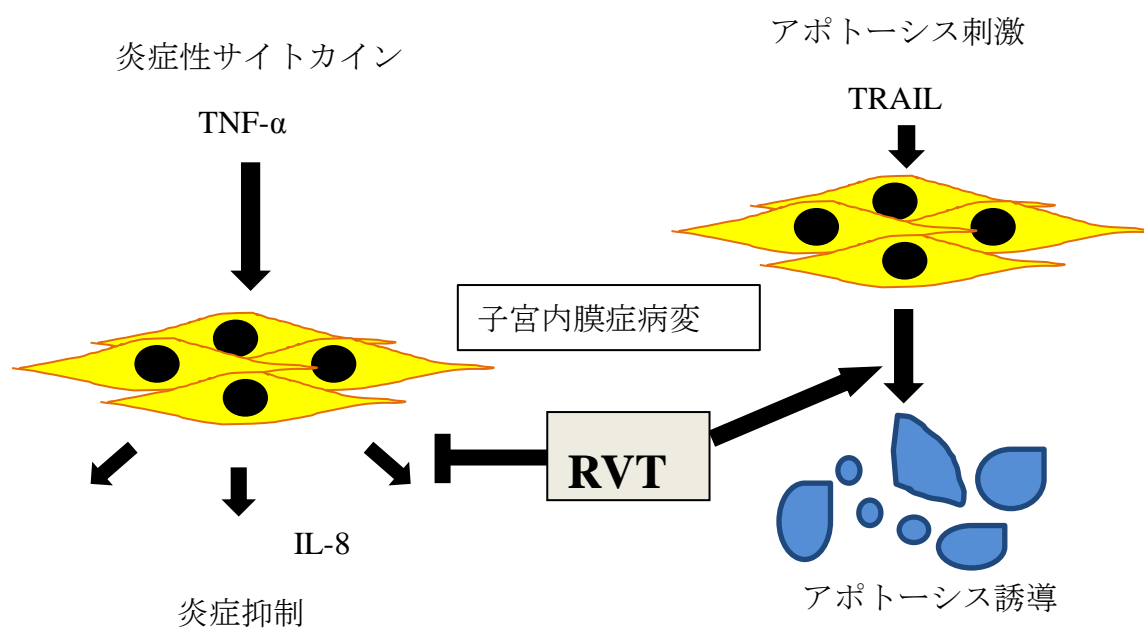


図 18 RVT の子宮内膜症への効果

RVT は $\text{TNF-}\alpha$ による ESC からの炎症性サイトカインの産生を抑制し、また、ESC の TRAIL 誘導性アポトーシス感受性を高めたことより、抗炎症・抗腫瘍の両側面から子宮内膜症抑制効果を持つ可能性がある。TRAIL: TNF related apoptosis-inducing ligand, RVT: resveratrol

本研究では食品由来成分が、抗炎症作用・抗腫瘍作用を有することに注目し、悪性腫瘍や癌性腹膜炎、子宮内膜症に対する ω 3脂肪酸と RVT の効果を検討した。その結果、これらの物質は、悪性腫瘍においては間質細胞を中心とした腫瘍内微小環境を制御し、また子宮内膜症においては ESC に対して炎症を抑制し、アポトーシス感受性を向上させることがわかった。これらの結果から ω 3脂肪酸や RVT などの食品成分が、腫瘍性・炎症性疾患に対して、新たな側面から治療効果を持つ可能性が示唆された。今後、腫瘍内微小環境の調節機構について更なる研究を進め、より特異的に腫瘍内微小環境の間質活性化を抑制できる治療方法の開発を目指していきたい。また、子宮内膜症においても、ESC のみならず、悪性腫瘍同様に、マクロファージをはじめとする間質細胞を含めた子宮内膜症微小環境を制御する治療戦略に注目した検討が必要になってくると思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案から、実験手技、論文執筆まで、様々な面においてご指導、ご鞭撻いただきました東京大学医学部産婦人科の川名敬先生には、深く感謝の意を表します。また、東京大学医学部産婦人科の甲賀かをり先生には、研究に関して様々な面においてご指導、ご鞭撻いただきました。

また東京大学医学部産婦人科の藤井知行先生、大須賀穰先生には、当教室の教授として、研究にご理解、ご支援いただきました。元東京大学薬学部衛生化学教室、現理化学研究所統合生命医科学研究センターの有田誠先生には、研究の立案から、実験手技、論文執筆まで、貴重なご支援、ご指導をいただきました。

元東京大学薬学部衛生化学教室、現理化学研究所統合生命医科学研究センターの磯部洋輔先生には、実際の実験において、様々なご指導をいただきました。

また、独立行政法人国立癌センターウイルス部門の清野透先生には ID8 細胞に c-myc 遺伝子を導入し ID8-myc 細胞を樹立していただきました。研究室でともに仕事をしてまいりました東京大学医学部産婦人科の織田克利先生、平池修先生、松本陽子先生、長阪一憲先生、足立克之先生、富尾賢介先生、江口聡子先生（旧姓：小島）、山下亜紀先生、井上知子先生、西田晴香先生には、カンファランスや実際の実験において様々なアドバイスやご協力をいただきました。あらためて感謝の意を表したいと思います。

引用文献

1. Dyerberg J, Bang HO: **Dietary fat and thrombosis.** *Lancet* **1**(8056):152, 1978.
2. Calder PC: **N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic.** *Lipids* **38**(4):343-352, 2003.
3. Kremer JM, Jubiz W, Michalek A, Rynes RI, Bartholomew LE, Bigaouette J, Timchalk M, Beeler D, Lininger L: **Fish-oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study.** *Ann Intern Med* **106**(4):497-503, 1987.
4. Stammers T, Sibbald B, Freeling P: **Fish oil in osteoarthritis.** *Lancet* **2**(8661):503, 1989.
5. Missmer SA, Chavarro JE, Malspeis S, Bertone-Johnson ER, Hornstein MD, Spiegelman D, Barbieri RL, Willett WC, Hankinson SE: **A prospective study of dietary fat consumption and endometriosis risk.** *Hum Reprod* **25**(6):1528-1535, 2010.
6. Netsu S, Konno R, Odagiri K, Soma M, Fujiwara H, Suzuki M: **Oral eicosapentaenoic acid supplementation as possible therapy for endometriosis.** *Fertil Steril* **90**(4 Suppl):1496-1502, 2008.
7. Tomio K, Kawana K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Yamashita A, Kojima S,

- Mori M, Nagamatsu T, Arimoto T *et al*: **Omega-3 polyunsaturated Fatty acids suppress the cystic lesion formation of peritoneal endometriosis in transgenic mouse models.** *PLoS One* **8**(9):e73085, 2013.
8. Chamras H, Ardashian A, Heber D, Glaspy JA: **Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation.** *J Nutr Biochem* **13**(12):711-716, 2002.
 9. Serini S, Piccioni E, Merendino N, Calviello G: **Dietary polyunsaturated fatty acids as inducers of apoptosis: implications for cancer.** *Apoptosis* **14**(2):135-152, 2009.
 10. D'Eliseo D, Manzi L, Merendino N, Velotti F: **Docosahexaenoic acid inhibits invasion of human RT112 urinary bladder and PT45 pancreatic carcinoma cells via down-modulation of granzyme B expression.** *J Nutr Biochem* **23**(5):452-457, 2012.
 11. Spencer L, Mann C, Metcalfe M, Webb M, Pollard C, Spencer D, Berry D, Steward W, Dennison A: **The effect of omega-3 FAs on tumour angiogenesis and their therapeutic potential.** *Eur J Cancer* **45**(12):2077-2086, 2009.
 12. Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB: **Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids.** *Nature* **427**(6974):504, 2004.

13. Xia S, Lu Y, Wang J, He C, Hong S, Serhan CN, Kang JX: **Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(33):12499-12504, 2006.
14. Nowak J, Weylandt KH, Habbel P, Wang J, Dignass A, Glickman JN, Kang JX: **Colitis-associated colon tumorigenesis is suppressed in transgenic mice rich in endogenous n-3 fatty acids.** *Carcinogenesis* **28**(9):1991-1995, 2007.
15. Jia Q, Lupton JR, Smith R, Weeks BR, Callaway E, Davidson LA, Kim W, Fan YY, Yang P, Newman RA *et al*: **Reduced colitis-associated colon cancer in Fat-1 (n-3 fatty acid desaturase) transgenic mice.** *Cancer Res* **68**(10):3985-3991, 2008.
16. Weylandt KH, Krause LF, Gomolka B, Chiu CY, Bilal S, Nadolny A, Waechter SF, Fischer A, Rothe M, Kang JX: **Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF-alpha.** *Carcinogenesis* **32**(6):897-903, 2011.
17. Ferrieres J: **The French paradox: lessons for other countries.** *Heart* **90**(1):107-111, 2004.
18. Bhat KPL, Kosmeder JW, 2nd, Pezzuto JM: **Biological effects of resveratrol.**

Antioxid Redox Signal **3**(6):1041-1064, 2001.

19. Borra MT, Smith BC, Denu JM: **Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol.** *J Biol Chem* **280**(17):17187-17195, 2005.
20. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL *et al*: **Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan.** *Nature* **425**(6954):191-196, 2003.
21. Guarente L, Picard F: **Calorie restriction--the SIR2 connection.** *Cell* **120**(4):473-482, 2005.
22. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH: **Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(28):9793-9798, 2008.
23. Ford J, Jiang M, Milner J: **Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival.** *Cancer Res* **65**(22):10457-10463, 2005.
24. Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B: **Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits.** *Inflamm Res* **54**(4):158-162, 2005.

25. Moon MH, Jeong JK, Lee YJ, Seol JW, Jackson CJ, Park SY: **SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates TNF-alpha-induced inflammation in human chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* **21**(3):470-480, 2013.
26. Lei M, Wang JG, Xiao DM, Fan M, Wang DP, Xiong JY, Chen Y, Ding Y, Liu SL: **Resveratrol inhibits interleukin 1beta-mediated inducible nitric oxide synthase expression in articular chondrocytes by activating SIRT1 and thereby suppressing nuclear factor-kappaB activity.** *Eur J Pharmacol* **674**(2-3):73-79, 2012.
27. Yao J, Wang JY, Liu L, Li YX, Xun AY, Zeng WS, Jia CH, Wei XX, Feng JL, Zhao L *et al*: **Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis.** *Arch Med Res* **41**(4):288-294, 2010.
28. Abdallah DM, Ismael NR: **Resveratrol abrogates adhesion molecules and protects against TNBS-induced ulcerative colitis in rats.** *Can J Physiol Pharmacol* **89**(11):811-818, 2011.
29. Rahal K, Schmiedlin-Ren P, Adler J, Dhanani M, Sultani V, Rittershaus AC, Reingold L, Zhu J, McKenna BJ, Christman GM *et al*: **Resveratrol has antiinflammatory and antifibrotic effects in the peptidoglycan-polysaccharide rat model of Crohn's disease.** *Inflamm Bowel*

Dis **18**(4):613-623, 2012.

30. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW: **Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase.** *EMBO J* **23**(12):2369-2380, 2004.
31. Chen HJ, Hsu LS, Shia YT, Lin MW, Lin CM: **The beta-catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/beta-catenin signaling pathway.** *Biochem Pharmacol* **84**(9):1143-1153, 2012.
32. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG *et al*: **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.** *Science* **275**(5297):218-220, 1997.
33. Piotrowska H, Myszkowski K, Ziolkowska A, Kulcenty K, Wierzchowski M, Kaczmarek M, Murias M, Kwiatkowska-Borowczyk E, Jodynis-Liebert J: **Resveratrol analogue 3,4,4',5-tetramethoxystilbene inhibits growth, arrests cell cycle and induces apoptosis in ovarian SKOV-3 and A-2780 cancer cells.** *Toxicol Appl Pharmacol* **263**(1):53-60, 2012.
34. Kang NH, Hwang KA, Lee HR, Choi DW, Choi KC: **Resveratrol regulates the cell viability promoted by 17beta-estradiol or bisphenol A via**

- down-regulation of the cross-talk between estrogen receptor alpha and insulin growth factor-1 receptor in BG-1 ovarian cancer cells.** *Food Chem Toxicol* **59**:373-379, 2013.
35. Vergara D, Simeone P, Toraldo D, Del Boccio P, Vergaro V, Leporatti S, Pieragostino D, Tinelli A, De Domenico S, Alberti S *et al*: **Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells.** *Mol Biosyst* **8**(4):1078-1087, 2012.
 36. Frazzi R, Valli R, Tamagnini I, Casali B, Latruffe N, Merli F: **Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation.** *Int J Cancer* **132**(5):1013-1021, 2013.
 37. Yang Q, Wang B, Zang W, Wang X, Liu Z, Li W, Jia J: **Resveratrol inhibits the growth of gastric cancer by inducing G1 phase arrest and senescence in a Sirt1-dependent manner.** *PLoS One* **8**(11):e70627, 2013.
 38. Voellger B, Kirches E, Wilisch-Neumann A, Weise A, Tapia-Perez JH, Rupa R, Mawrin C, Firsching R: **Resveratrol decreases B-cell lymphoma-2 expression and viability in GH3 pituitary adenoma cells of the rat.** *Onco Targets Ther* **9**:1269-1276, 2013.

39. Coussens LM, Werb Z: **Inflammation and cancer.** *Nature* **420**(6917):860-867, 2002.
40. Mariani F, Sena P, Roncucci L: **Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development.** *World J Gastroenterol* **20**(29):9716-9731, 2014.
41. Hardbower DM, Peek RM, Jr., Wilson KT: **At the Bench: Helicobacter pylori, dysregulated host responses, DNA damage, and gastric cancer.** *J Leukoc Biol* **96**(2):201-212, 2014.
42. Lorusso G, Ruegg C: **The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis.** *Histochem Cell Biol* **130**(6):1091-1103, 2008.
43. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* **144**(5):646-674, 2011.
44. Place AE, Jin Huh S, Polyak K: **The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment.** *Breast Cancer Res* **13**(6):227, 2011.
45. da Cunha A, Michelin MA, Murta EF: **Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer.** *World J Clin Oncol*

- 5(3):495-502, 2014.
46. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, Krause M, Schworer AM, Wagner U, Muller-Brusselbach S *et al*: **Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse.** *Int J Cancer* **134**(1):32-42, 2014.
 47. Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I: **Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors.** *Biochem Biophys Res Commun* **437**(3):397-402, 2013.
 48. Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E: **Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis.** *Biochim Biophys Acta* **1831**(10):1533-1541, 2013.
 49. Adam RA, Adam YG: **Malignant ascites: past, present, and future.** *J Am Coll Surg* **198**(6):999-1011, 2004.
 50. Feldman GB, Knapp RC, Order SE, Hellman S: **The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in a murine ovarian carcinoma.** *Cancer Res* **32**(8):1663-1666, 1972.
 51. Tan DS, Agarwal R, Kaye SB: **Mechanisms of transcoelomic metastasis in**

- ovarian cancer.** *Lancet Oncol* **7**(11):925-934, 2006.
52. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piche A: **Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites.** *Am J Cancer Res* **2**(5):566-580, 2012.
 53. Ahmed N, Riley C, Oliva K, Rice G, Quinn M: **Ascites induces modulation of alpha6beta1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma.** *Br J Cancer* **92**(8):1475-1485, 2005.
 54. Balogun N, Forbes A, Widschwendter M, Lanceley A: **Noninvasive nutritional management of ovarian cancer patients: beyond intestinal obstruction.** *Int J Gynecol Cancer* **22**(6):1089-1095, 2012.
 55. Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC: **Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways.** *Cell Metab* **16**(2):153-166, 2012.
 56. Sampson JA: **Metastatic or Embolic Endometriosis, due to the Menstrual Dissemination of Endometrial Tissue into the Venous Circulation.** *Am J Pathol* **3**(2):93-110 143, 1927.
 57. Giudice LC: **Clinical practice. Endometriosis.** *N Engl J Med* **362**(25):2389-2398, 2010.

58. Osuga Y: **Novel therapeutic strategies for endometriosis: a pathophysiological perspective.** *Gynecol Obstet Invest* **66 Suppl 1**:3-9, 2008.
59. Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y: **Lymphocytes in endometriosis.** *Am J Reprod Immunol* **65**(1):1-10, 2011.
60. Buyalos RP, Funari VA, Azziz R, Watson JM, Martinez-Maza O: **Elevated interleukin-6 levels in peritoneal fluid of patients with pelvic pathology.** *Fertil Steril* **58**(2):302-306, 1992.
61. Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N: **Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression.** *J Clin Endocrinol Metab* **85**(2):824-829, 2000.
62. de Ziegler D, Borghese B, Chapron C: **Endometriosis and infertility: pathophysiology and management.** *Lancet* **376**(9742):730-738, 2000.
63. Abe W, Nasu K, Nakada C, Kawano Y, Moriyama M, Narahara H: **miR-196b targets c-myc and Bcl-2 expression, inhibits proliferation and induces apoptosis in endometriotic stromal cells.** *Hum Reprod* **28**(3):750-761, 2013.
64. Tsuno A, Nasu K, Kawano Y, Yuge A, Li H, Abe W, Narahara H: **Fasudil inhibits the proliferation and contractility and induces cell cycle arrest and**

- apoptosis of human endometriotic stromal cells: a promising agent for the treatment of endometriosis.** *J Clin Endocrinol Metab* **96**(12):E1944-1952, 2011.
65. Nasu K, Yuge A, Tsuno A, Nishida M, Narahara H: **Involvement of resistance to apoptosis in the pathogenesis of endometriosis.** *Histol Histopathol* **24**(9):1181-1192, 2009.
 66. Watanabe A, Taniguchi F, Izawa M, Suou K, Uegaki T, Takai E, Terakawa N, Harada T: **The role of survivin in the resistance of endometriotic stromal cells to drug-induced apoptosis.** *Hum Reprod* **24**(12):3172-3179, 2009.
 67. Nasu K, Nishida M, Ueda T, Yuge A, Takai N, Narahara H: **Application of the nuclear factor-kappaB inhibitor BAY 11-7085 for the treatment of endometriosis: an in vitro study.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**(1):E16-23, 2007.
 68. Yamashita A, Kawana K, Tomio K, Taguchi A, Isobe Y, Iwamoto R, Masuda K, Furuya H, Nagamatsu T, Nagasaka K *et al*: **Increased tissue levels of omega-3 polyunsaturated fatty acids prevents pathological preterm birth.** *Sci Rep* **3**:3113, 2013.
 69. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, Persons DL,

- Smith PG, Terranova PF: **Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer.** *Carcinogenesis* **21**(4):585-591, 2000.
70. Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Husseinazadeh N, McFarland-Mancini MM, Drew AF: **Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice.** *Cancer Res* **67**(12):5708-5716, 2007.
 71. Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, Robinson SC, Balkwill FR: **"Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB.** *J Exp Med* **205**(6):1261-1268, 2008.
 72. Wilson AJ, Barham W, Saskowski J, Tikhomirov O, Chen L, Lee HJ, Yull F, Khabele D: **Tracking NF-kappaB activity in tumor cells during ovarian cancer progression in a syngeneic mouse model.** *J Ovarian Res* **6**(1):63, 2013.
 73. Bereswill S, Munoz M, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kuhl AA, Loddenkemper C, Gobel UB, Heimesaat MM: **Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation.** *PLoS One* **5**(12):e15099, 2010.
 74. Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, Gokden N, Mayeux PR: **Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs**

- survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury.** *Kidney Int* **81**(4):370-378, 2012.
75. Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Kodama A, Hirota Y, Koga K, Yoshino O, Harada M, Takemura Y, Yano T *et al*: **Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL 20 secreted from IL-1 beta-, TNF-alpha-, and IL-17A-stimulated endometriotic stromal cells.** *Endocrinology* **151**(11):5468-5476, 2010.
 76. Taguchi A, Kawana K, Tomio K, Yamashita A, Isobe Y, Nagasaka K, Koga K, Inoue T, Nishida H, Kojima S *et al*: **Matrix metalloproteinase (MMP)-9 in cancer-associated fibroblasts (CAFs) is suppressed by omega-3 polyunsaturated fatty acids in vitro and in vivo.** *PLoS One* **9**(2):e89605, 2014.
 77. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, Zou H, Qiu J: **Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts.** *PLoS One* **6**(11):e27081, 2011.
 78. Tian J, Chen JW, Gao JS, Li L, Xie X: **Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced IL-1beta, MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt**

- pathway. *Rheumatol Int* 33(7):1829-1835, 2013.**
79. Sakamoto Y, Harada T, Horie S, Iba Y, Taniguchi F, Yoshida S, Iwabe T, Terakawa N: **Tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 (IL-8) expression in endometriotic stromal cells, probably through nuclear factor-kappa B activation: gonadotropin-releasing hormone agonist treatment reduced IL-8 expression. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2):730-735, 2003.**
 80. Taguchi A, Wada-Hiraike O, Kawana K, Koga K, Yamashita A, Shirane A, Urata Y, Kozuma S, Osuga Y, Fujii T: **Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *J Obstet Gynaecol Res* 40(3):770-778, 2014.**
 81. Harada M, Osuga Y, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Yoshino O, Morimoto C, Fujiwara T, Momoeda M, Yano T *et al*: **Concentration of osteoprotegerin (OPG) in peritoneal fluid is increased in women with endometriosis. *Hum Reprod* 19(10):2188-2191, 2004.**
 82. Tameda M, Sugimoto K, Shiraki K, Inagaki Y, Ogura S, Kasai C, Yoneda M, Okamoto R, Yamamoto N, Takei Y *et al*: **Resveratrol sensitizes HepG2 cells to**

- TRAIL-induced apoptosis.** *Anticancer Drugs* **25**(9):1028-1034, 2014.
83. Lynch CC, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication.** *Differentiation* **70**(9-10):561-573, 2002.
 84. Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA: **Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment.** *Cancer Res* **64**(5):1675-1686, 2004.
 85. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z *et al*: **Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis.** *Nat Cell Biol* **2**(10):737-744, 2000.
 86. Woolery KT, Kruk PA: **Ovarian epithelial-stromal interactions: role of interleukins 1 and 6.** *Obstet Gynecol Int* **2011**:358493, 2011.
 87. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R: **Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics.** *Cancer* **110**(9):1911-1928, 2007.
 88. Dehai C, Bo P, Qiang T, Lihua S, Fang L, Shi J, Jingyan C, Yan Y, Guangbin W, Zhenjun Y: **Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6.** *Immunol Lett* **160**(1):1-10, 2014.

89. Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS: **Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop.** *Cancer Res* **65**(12):5278-5283, 2005.
90. Ando K, Takahashi F, Kato M, Kaneko N, Doi T, Ohe Y, Koizumi F, Nishio K, Takahashi K: **Tocilizumab, a proposed therapy for the cachexia of Interleukin6-expressing lung cancer.** *PLoS One* **9**(7):e102436, 2014.
91. Edwards JA, Beck M, Riegger C, Bausch J: **Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida((R)).** *Ann N Y Acad Sci* **1215**:131-137, 2011.
92. Kalluri R, Zeisberg M: **Fibroblasts in cancer.** *Nat Rev Cancer* **6**(5):392-401, 2006.
93. Madar S, Goldstein I, Rotter V: **'Cancer associated fibroblasts'--more than meets the eye.** *Trends Mol Med* **19**(8):447-453, 2013.
94. Kobayashi N, Miyoshi S, Mikami T, Koyama H, Kitazawa M, Takeoka M, Sano K, Amano J, Isogai Z, Niida S *et al*: **Hyaluronan deficiency in tumor stroma impairs macrophage trafficking and tumor neovascularization.** *Cancer Res* **70**(18):7073-7083, 2010.

95. Erreni M, Mantovani A, Allavena P: **Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer.** *Cancer Microenviron* **4**(2):141-154, 2011.
96. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K *et al*: **Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.** *Nat Med* **8**(8):793-800, 2002.
97. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N: **Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.** *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(19):12293-12297, 2002.
98. Zou W, Chen L: **Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment.** *Nat Rev Immunol* **8**(6):467-477, 2008.
99. Brennen WN, Rosen DM, Wang H, Isaacs JT, Denmeade SR: **Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug.** *J Natl Cancer Inst* **104**(17):1320-1334, 2012.
100. Shangguan L, Ti X, Krause U, Hai B, Zhao Y, Yang Z, Liu F: **Inhibition of**

TGF-beta/Smad signaling by BAMBI blocks differentiation of human mesenchymal stem cells to carcinoma-associated fibroblasts and abolishes their protumor effects. *Stem Cells* **30**(12):2810-2819, 2012.

101. Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Xu B, Michie SA, Hasui K, Hirano H, Arita K, Matsuyama T: **Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor beta.** *Cancer Immunol Immunother* **58**(10):1577-1586, 2009.
102. Allavena P, Signorelli M, Chieppa M, Erba E, Bianchi G, Marchesi F, Olimpico CO, Bonardi C, Garbi A, Lissoni A *et al*: **Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production.** *Cancer Res* **65**(7):2964-2971, 2005.
103. Bruner-Tran KL, Osteen KG, Taylor HS, Sokalska A, Haines K, Duleba AJ: **Resveratrol inhibits development of experimental endometriosis in vivo and reduces endometrial stromal cell invasiveness in vitro.** *Biol Reprod* **84**(1):106-112, 2011.
104. Rudzitis-Auth J, Menger MD, Laschke MW: **Resveratrol is a potent inhibitor of vascularization and cell proliferation in experimental endometriosis.** *Hum Reprod* **28**(5):1339-1347, 2013.

105. Ergenoglu AM, Yeniel AO, Erbas O, Aktug H, Yildirim N, Ulukus M, Taskiran D: **Regression of endometrial implants by resveratrol in an experimentally induced endometriosis model in rats.** *Reprod Sci* 20(10):1230-1236, 2013.
106. Maia H, Jr., Haddad C, Pinheiro N, Casoy J: **Advantages of the association of resveratrol with oral contraceptives for management of endometriosis-related pain.** *Int J Womens Health* 4:543-549, 2012.
107. Gonzalez-Ramos R, Defrere S, Devoto L: **Nuclear factor-kappaB: a main regulator of inflammation and cell survival in endometriosis pathophysiology.** *Fertil Steril* 98(3):520-528, 2012.
108. Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F: **Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes.** *J Leukoc Biol* 75(6):1156-1165, 2004.
109. Zong Y, Sun L, Liu B, Deng YS, Zhan D, Chen YL, He Y, Liu J, Zhang ZJ, Sun J *et al*: **Resveratrol inhibits LPS-induced MAPKs activation via activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in murine RAW 264.7 macrophage cells.** *PLoS One* 7(8):e44107, 2012.
110. Horndasch M, Culig Z: **SOCS-3 antagonizes pro-apoptotic effects of TRAIL**

and resveratrol in prostate cancer cells. *Prostate* 71(12):1357-1366, 2011.