

氏 名（本籍） ひるま わたる
比留間 航 (東京都)

学 位 の 種 類 博士（薬学）

報 告 番 号 甲第 1510 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学 位 論 文 題 目

Rhus verniciflua Stokes 含有フラボノイド、ルテオリンならびにアピゲニン配糖体のヒト白血病細胞に対するアポトーシス誘導による抗腫瘍作用について

論文審査委員（主 査）	福岡大学	教授	小野 信文
（副 査）	福岡大学	教授	金城 順英
	福岡大学	教授	鹿志毛 信広
	福岡大学	教授	大川 雅史

要旨

<研究背景>

近年の日本において、食品やサプリメントを用いたがん予防試験やがん細胞増殖阻害試験について多くの研究が行われている。しかしながら、科学的根拠やデータが未だ十分とはいえず、科学的根拠や裏うちされた新規な素材の開発が急務となっている。漢方薬は複数の生薬の配合によって構成されているため、その有効性に関する作用機序を科学的に検証することが非常に困難な場合が多い。しかしながら、近年の科学的研究手法の進歩により、作用機序が明らかにされた幾つかの生薬を配合し、抗腫瘍作用を示す生薬製剤の開発は可能になってきた。ウルシには、主に抗腫瘍作用のほかに抗炎症、抗酸化、抗バクテリア、細胞保護作用などが報告されている。日本では、アレルゲンであるウルシオールが多く含有していることから生薬、食品としての利用は避けられてきた。しかしながら、近年、ウルシオールを排除したウルシ成分抽出法が確立され、その成分は抗腫瘍作用も示すことが報告されている。

そこでウルシのウルシオール非含有植物抽出混合物（KUN）を調製し、抗がん作用の細胞内機構について検討を行った。また、ウルシ中の抗がん化合物の成分単独ならびに既存医薬品との併用における抗がん作用についても検討した。

<研究内容>

1. KUN の調製および腫瘍細胞増殖に及ぼす効果

KUN の調製および各種腫瘍細胞の細胞増殖へ及ぼす効果について検討した。

(1) KUN の調製

KUN は、ウルシ (*Rhus verniciflua*) 90 g、ニレ (*Ulmus hollandica*) 60 g、カギクルマバナルコユリ (*Polygonatum sibiricum*) 50 g、クコ (*Lycium barbarum*) 10 g、オタネニンジン (*Panax ginseng*) 10 g、マンネンタケ (*Ganoderma lucidum*) 10 g の 6 種類の生薬を混合し、10 倍量 (v/w) の 70% エタノールに懸濁後、室温で 24 時間抽出した。抽出液を濾過後、減圧下でエタノールを溜去し、ウルシオールを析出させた。その後、再度濾過を行い、回収した濾液を凍結乾燥することで、KUN エキス粉末を得た。また、ウルシオール非含有であることは、液体クロマトグラフィーを用いた分析により確認した。原料重量に対する最終産物重量の回収率は、 $32.5 \pm 0.75\%$ (Mean $\pm$ S.D., n=3) であった。

(2) KUN の細胞増殖に及ぼす影響

8 種腫瘍細胞について、KUN の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。中でも急性リンパ芽球性白血病細胞 (MOLT-3) と急性骨髄性白血病細胞 (KG-1) に対して 0.2 mg/mL から有意に増殖抑制を示した。

それぞれの IC₅₀ 値は Table. 1 に示す。

Table 1. KUN の各種腫瘍細胞に対する IC₅₀

Cell lines	MOLT-3	KG-1	Colon-26	HeLa	DLD-1	B16/BL6	MCF-7	K-562
IC ₅₀ (mg/mL)	0.208 (±0.02)	0.293 (±0.01)	0.379 (±0.09)	0.433 (±0.04)	0.510 (±0.03)	0.565 (±0.05)	0.580 (±0.05)	0.610 (±0.14)

(3) KUN が引き起こす細胞死についての検討

細胞増殖抑制を強く示す白血病細胞株を用いて KUN が引き起こす細胞死について検討した。また、アポトーシス細胞を検出するため、核 DNA 断片化試験、annexin V と propidium iodide による二重染色および caspase-3、caspase-9 活性測定を行った。その結果、核 DNA のヌクレオソーム単位での断片化、ホスファチジルセリンの細胞膜表面への転座および caspase-3、caspase-9 の活性上昇を確認した。このことにより、白血病細胞株に対する増殖阻害作用の機序は、ミトコンドリア伝達系を介したアポトーシスにより引き起こされる可能性が示唆された。

2. フラボノイド配糖体が白血病細胞に及ぼす効果

ウルシ中の抗がん化合物であるルテオリングルコシド (luteolin 7-O-β-D-glucoside、MW; 443.38) およびアピゲニングリコシド (apigenin 7-O-β-D-glucoside、MW; 432.38) が白血病細胞に及ぼす効果について検討した。また、アポトーシス細胞を検出するため、核 DNA 断片化試験、annexin V と propidium iodide による二重染色および caspase-3、caspase-9 活性測定を行った。

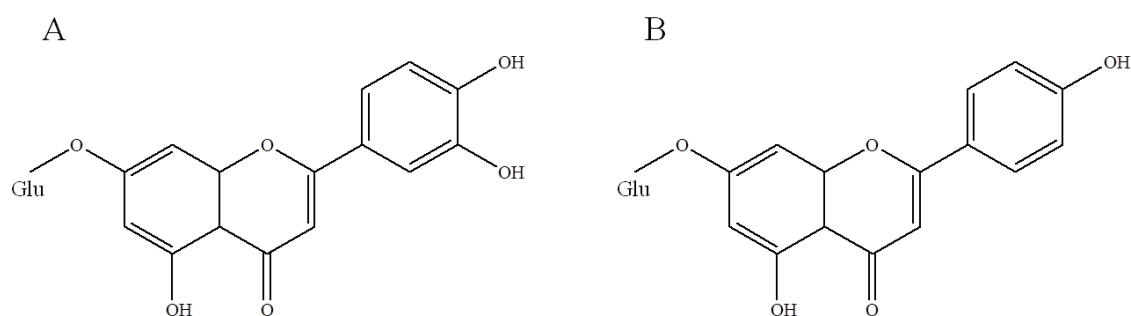


Fig. 1. luteolin 7-O-β-D-glucoside (A) および apigenin 7-O-β-D-glucoside (B) の化学構造

(1) フラボノイドの細胞増殖に及ぼす影響

3 種白血病細胞株 (MOLT-3、KG-1、K-562) について、フラボノイド配糖体の細胞増殖

に及ぼす影響を検討した。白血病細胞株に対してルテオリングルコシドで 15 μM から、アピゲニングルコシドで 30 μM から有意に増殖を抑制した。また、アグリコンであるルテオリンおよびアピゲニンも同様に細胞増殖を抑制した。それぞれの IC_{50} 値は Table 2 に示す。

Table 2. 各フラボノイドの白血病細胞に対する IC_{50}

Substances	IC_{50} (μM)		
	MOLT-3	KG-1	K-562
Luteolin	7.82 ± 0.72	15.43 ± 2.14	17.77 ± 5.98
Apigenin	17.94 ± 1.52	19.43 ± 1.32	38.80 ± 7.53
Luteolin glucoside	15.86 ± 1.33	31.87 ± 2.60	40.74 ± 6.32
Apigenin glucoside	29.53 ± 0.58	32.38 ± 1.67	61.52 ± 13.20

(2) フラボノイドが引き起こす細胞死についての検討

細胞増殖抑制を強く示す白血病細胞株を用いてフラボノイドが引き起こす細胞死について検討した。また、アポトーシス細胞を検出するため、核 DNA 断片化試験、annexin V と propidium iodide による二重染色および caspase-3、caspase-9 活性測定を行った。その結果、核 DNA のヌクレオソーム単位での断片化、ホスファチジルセリンの細胞膜表面への転座および caspase-3、caspase-9 の活性上昇を確認した。前述の KUN の作用機構と同様の結果が得られたことにより、KUN の抗がん効果は、ルテオリングルコシドおよびアピゲニングルコシドに起因していることが示唆された。

(3) フラボノイドが誘導する白血病細胞膜電位の変化

ミトコンドリアの膜電位の変化をフローサイトメトリーで測定を行い、シトクロム c 流亡によるアポトーシス誘導を検討した。4 種フラボノイドに関して白血病細胞株に対して電位の低下を誘導した (Fig. 2)。これは、フラボノイドに誘導されたアポトーシスにより、細胞内ミトコンドリア中のシトクロム c を放出したために電位が低下したと考えられる。

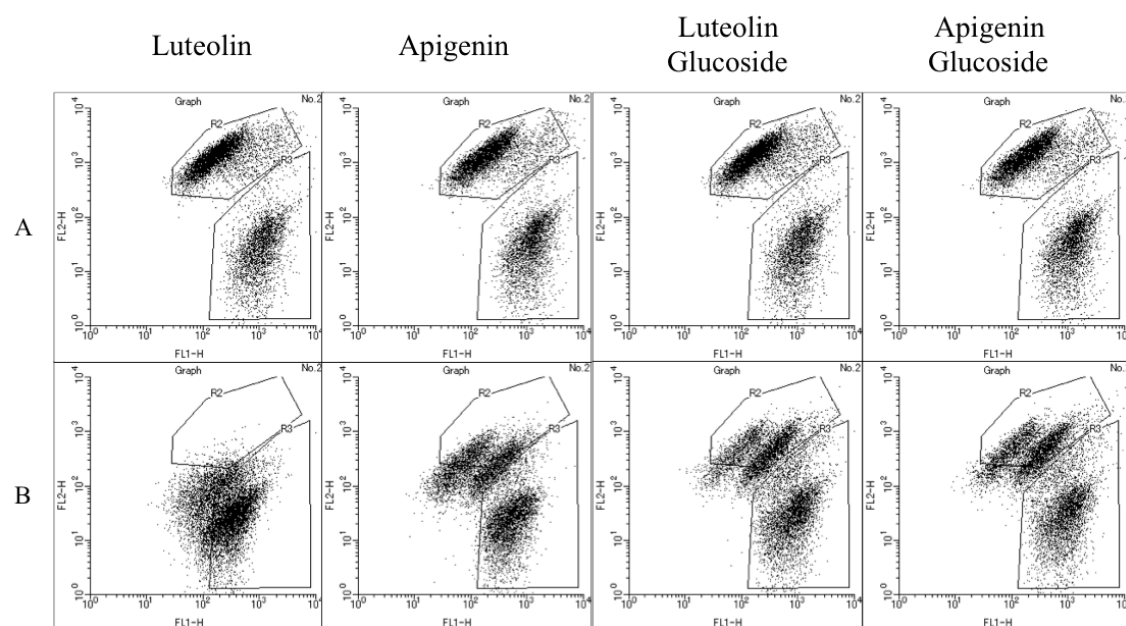


Fig. 2 フラボノイドが誘導する MOLT-3 細胞の膜電位の変化

A:0 μ M (control)、B:100 μ M フラボノイド

(4) 白血病薬ドキソルビシンとの併用効果

MOLT-3 に対して抗がん剤、ルテオリングルコシドの単体投与と比較して、増殖を抑制した。これは、抗がん剤ドキソルビシンとルテオリングルコシドの増殖抑制作用の相加効果によるものであると考えられる。

<総括>

本研究の結果から白血病細胞における、KUN、ルテオリングルコシドおよびアピゲニングルコシドのカスパーゼシグナル伝達を介するアポトーシスによることが明らかとなった。更に既存医薬品との併用作用から白血病の化学治療の補助的使用に道を開くものと考えられる。将来、両フラボノイド配糖体の作用機構を解明することで植物抽出混合物である KUN のがん発生の予防および QOL の観点からのアプローチによるがん治療の治療薬開発への基盤となることが期待される。