

東京電機大学

博士論文

*Ranunculus ternatus* の抗癌機構解明及びその有効成分の解析

Elucidation of the anticancer mechanism of *Ranunculus*  
*ternatus* and analysis of its active ingredients

2020年09月

方明

## 目次

第1章 緒言	
1-1. がん	4
1-2. 細胞周期	4
1-3. アポトーシス	5
1-4. 中薬	12
1-5. <i>Ranunculus ternatus</i>	14
第2章 カスパーゼ-7に依存的な RTE 誘導アポトーシス細胞死	
2-1. 背景	22
2-2. 実験方法	
2-2-1. 細胞培養	22
2-2-2. Jurkat 細胞に対する薬剤の作用方法	23
2-2-3. ヒキノカサの有機層画分回収プロトコル	23
2-2-4. MTT assay	23
2-2-5. フローサイトメトリー	24
2-2-6. アガロースゲル電気泳動	25
2-2-7. 蛍光顕微鏡観察	25
2-2-8. Western blot	25
2-2-9. 統計解析	27
2-3. 結果	
2-3-1. MTT assay による RTE の細胞傷害検出	27
2-3-2. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出	28
2-3-3. フローサイトメトリーによる PS の検出	29
2-3-4. 蛍光顕微鏡による細胞形態変化の観察	32
2-3-5. DNA ladder 法による DNA 断片化の検出	33
2-3-6. TUNEL 法による DNA 断片化の検出	33
2-3-7. Western Blot 法によるカスパーゼ及び PARP-1 開裂の検出	34
2-3-8. Western Blot 法によるカスパーゼ-3、-7 及び PARP-1 開裂の時間依 存変化検出	35
2-3-9. Z-Asp-CH <sub>2</sub> -DCB は RTE によるカスパーゼ開裂を抑制した	36
2-3-10. Z-Asp-CH <sub>2</sub> -DCB は RTE による Sub-G1 期の増加を抑制した	37
2-3-11. Z-Asp-CH <sub>2</sub> -DCB は RTE による PS の露出増加を抑制した	38
2-3-12. MCF-7 細胞に対する RTE の細胞傷害検討	39
2-3-13. MCF-7 細胞に対する RTE のカスパーゼ開裂の検出	40
2-4. 考察	41
第3章 RTE 誘導アポトーシス様細胞死におけるミトコンドリアの関与	

3-1. 背景.....	45
3-2. 方法	
3-2-1. 細胞の培養 .....	45
3-2-2. MTT assay .....	45
3-2-3. フローサイトメトリー .....	46
3-2-4. Western blot.....	46
3-2-5. 統計解析.....	47
3-3. 結果	
3-3-1. Jurkat(Bcl-2)細胞に対する RTE の細胞傷害検討.....	47
3-3-2. RTE が誘導するミトコンドリアの膜電位の変化の検出 .....	48
3-3-3. RTE が誘導するカスパーゼ-7 開裂の検出 .....	49
3-3-4. RTE が誘導するカスパーゼ-8 及び-9 開裂の検出 .....	50
3-3-5. HepG2 細胞にする RTE の細胞傷害検討.....	51
3-3-6. HepG2 細胞に対する RTE のカスパーゼと PARP-1 の開裂の検出.....	51
3-4. 考察 .....	52
第 4 章 RTE 成分の一つ、パルミチン酸の細胞死誘導メカニズム	
4-1. 背景 .....	54
4-2. 方法	
4-2-1. RTE 成分の推定 .....	54
4-2-2. 細胞培養.....	55
4-2-3. MTT assay .....	55
4-2-4. フローサイトメトリー.....	56
4-2-5. アガロースゲル電気泳動.....	56
4-2-6. Western blot .....	57
4-2-7. カラムクロマトグラフィーによる RTE の分離.....	57
4-2-8. Ac-DEVD-pNA によるカスパーゼ-3/-7 活性の測定 .....	57
4-2-9. RTE から分離した各フラクション中の PA 含有量の測定 .....	57
4-2-10. 統計解析.....	58
4-3. 結果	
4-3-1. PA の推定 .....	58
4-3-2. MTT assay による PA の細胞傷害検出 .....	60
4-3-3. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出 .....	61
4-3-4. フローサイトメトリーによる PS の検出.....	62
4-3-5. DNA ladder 法による DNA 断片化の検出 .....	62
4-3-6. Western Blot 法によるカスパーゼ及び PARP-1 開裂の検出 .....	63
4-3-7. Western Blot 法によるカスパーゼ-3、-7、-8、-9 及び PARP-1 の時	

間依存的な開裂の検出.....	64
4-3-8. MCF-7 細胞にする PA の細胞傷害検討.....	65
4-3-9. MCF-7 細胞に対する RTE のカスパーゼ、PARP-1 の開裂の検出	66
4-3-10. カラムクロマトグラフィーによる RTE の分離.....	67
4-3-11. MTT assay による各フラクションの細胞傷害検出 .....	67
4-3-12. Ac-DEVD-pNA によるカスパーゼ-3/-7 活性の検出.....	68
4-3-13. RTE 9' - 12' の Jurkat 細胞に対する PARP-1 開裂の検出.....	69
4-3-14. ESI-MS による PA の質量電荷比のピークの検出と検量線の作成 .	70
4-3-15. RTE から分離した各フラクション中の PA の検出.....	71
4-4. 考察.....	72
第 5 章 総合討論 .....	83
参考文献.....	88
謝辞.....	99

## 第1章 緒言

### 1-1. がん

がんは、世界の多くの地域で主要な疾患として問題になっている (1)。人口の増加と高齢化、喫煙、肥満の発生率増加などが原因で、がんの発生率と死亡率は世界中で急速に増加している。そのため、全世界で、2040年には1,640万人ががんによって死亡すると予測されている (2、3)。

がんとは遺伝子変異による病気である。数十年に渡る遺伝子分析により、ヒトには約1000種類のがん関連遺伝子 (約250種類のがん遺伝子、約700種類のがん抑制因子) が存在することが明らかになった (4)。また、がんの発生には、異常な細胞増殖、アポトーシスの機能不全などの要因が関係している (5)。これらの要因によって、がん細胞は無制限に増殖するようになり、悪性腫瘍を形成して周りの健康な組織に浸潤する (6)。

がん患者に現在利用可能な治療選択肢は、手術、化学療法及び放射線療法である (5)。腫瘍が限局している場合、外科的な手術で切除することにより治癒できるが、転移性腫瘍に対しては手術ができない。その場合、化学療法と放射線療法などが転移性腫瘍に対して行われているが、正常細胞を傷つけることなく、がん細胞を選択的に殺すことは難しく、様々な強い副作用を生じている (7)。従って、副作用を最少にしてがん細胞だけを選択的に死滅させる治療方法が求められている。

### 1-2. 細胞周期

放射線療法やほとんどの化学療法などのがん治療は、がん細胞のDNAに損傷を与えることが明らかになった (8、9)。DNAが損傷すると、細胞は細胞周期チェックポイントで増殖を停止し、DNA修復の時間が提供される (9)。細胞周期とはDNA複製や細胞成長に必要なタンパク質を合成準備する期間(G1期)を経て、DNAの合成(S期)を行い、DNA構造の再構成を行う期間(G2期)を経て、分裂期(M期)に入る一連の過程である (10)。細胞は傷害を受けると細胞周期制御系を活性化させ、さまざまなチェックポイントで細胞周期を止めている。例えば、G1期でのDNA損傷および抗増殖シグナルは、S期に入る前にG1期の停止を引き起こす。S期中のDNA損傷またはDNA複製の不具合は、S期での停止を引き起こす。G2期中のDNA損傷または染色体の完全な構築の失敗は、G2期停止を引き起こす。M期中の有糸分裂紡錘体機能の異常は、M期停止を引き起こす (図1)(8-10)。一方で、DNAへの傷害があまりに大きく、修復が不可能な場合はアポトーシスを引き起こす (11)。

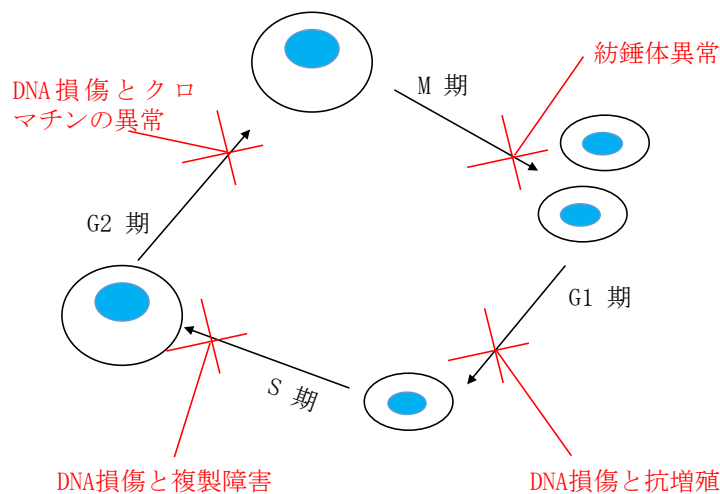


図 1. 細胞周期チェックポイント

細胞周期チェックポイントは、DNA 損傷および抗増殖シグナルにより、G1 期での停止を生じ、DNA 損傷または DNA 複製の不具合により、S 期での停止を生じ、DNA 損傷または染色体の完全な構築の失敗により、G2 期での停止を生じ、有糸分裂紡錘体機能の異常により、M 期での停止を生じる。

### 1-3. アポトーシス

通常生命体では、恒常性を維持するため、必要なくなった細胞（老化した細胞、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞）を自ら消滅させている。このように生命体で毎日のように起きている、個体をよりよい状態に保つために引き起こされるプログラムされた細胞死は、アポトーシスと呼ばれている (12)。

Vogt は 1842 年カエル脊索および隣接軟骨の細胞死を観察し、初めて細胞死を発見した (13)。Flemming は 1885 年にラットの卵胞に、染色体の凝縮、分断した死細胞を観察し、初めてアポトーシスの現象を報告した (14)。「アポトーシス」という言葉は、古代ギリシャ語に由来し、「apo-」（から離れて）、「ptosis」（たれさがる）より、「apoptosis」は秋の花から花びらが落ちる」または「秋の木から葉が落ちる」ことを意味している。1972 年に Kerr によって最初に提唱され、細胞からの「アポトーシス体」形成の形態的特徴を指している (15)。

多くの病気がアポトーシスと密接に関係していることが報告されている。アポトーシスが多く引き起こされた場合、神経変性疾患、パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄性筋萎縮症、エイズなどの疾患を発症する。また、アポトーシスが抑制された場合、ウイルス感染または DNA の突然変異によるがん及び自己免疫疾患（I 型糖尿病、脳脊髄炎）などの疾患を発症する (16)。

アポトーシスの形態学的な特徴としては、細胞が丸くなって収縮し、そして隣接する細胞

との剥離、クロマチンの凝縮、核の変形からの核膜崩壊、DNAの断片化、細胞膜のくびれの形成や、アポトーシス小体と呼ばれる、細胞質ゾルと、凝縮したクロマチンおよびオルガネラを含むコンパクトな膜密閉構造に断片化することなどが確認されている。一方で、細胞死の一つであるネクローシスは、形態学的特徴からアポトーシスとは異なることが明らかになっている。ネクローシスはアポトーシスとは対照的に細胞膜の完全性の喪失、細胞の膨張及び破壊をもたらし、細胞内の炎症性物質などが放出し、周囲の細胞の炎症を誘導する(図2)(15、17)。

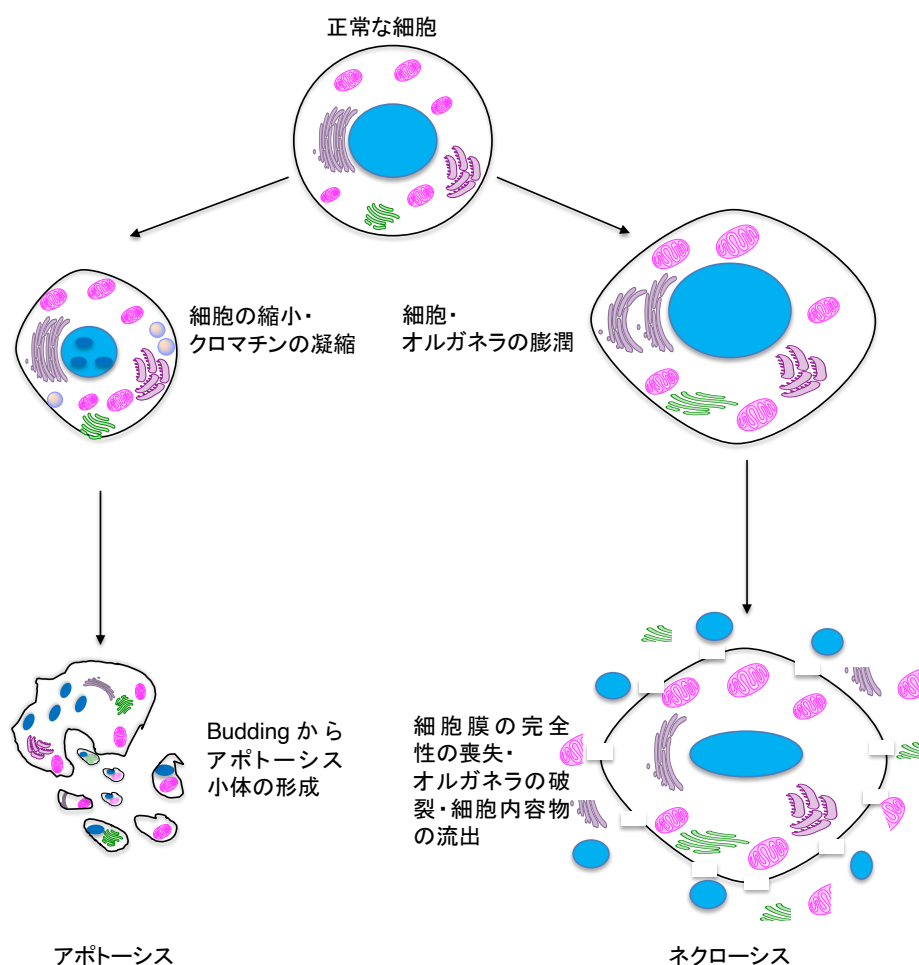


図2. アポトーシスおよびネクローシス細胞死の形態学的特徴

アポトーシスは、細胞収縮及びクロマチン凝縮を行い、オルガネラ、細胞質ゾルおよびクロマチンの断片を含むアポトーシス小体の最終的な形成を伴い、炎症反応を引き起こさずに貪食される。ネクローシス細胞は膨潤し、炎症性物質を含む内容物を周囲に放出し、炎症反応を引き起こす。

カスパーゼ(Cysteine ASPartic acid protASE; caspase)はシステインプロテアーゼのファミリーであり、その機能はアポトーシスのプロセスと密接に関連している。現在は 14 種が同定されており、このうちカスパーゼ-13 はウシでのみ同定されている(18)。また、ヒトで同定されたカスパーゼ-1, -4, -5 及びマウスのみで同定されたカスパーゼ-11 は炎症誘導に関わっている (19)。ヒトで同定されたカスパーゼ-14 は皮膚の防御機構に関わっていることが示された (20)。アポトーシスを誘導するカスパーゼはイニシエーターカスパーゼ (開始カスパーゼ: caspae-2, -8, -9, -10)とエフェクターカスパーゼ (実行カスパーゼ:カスパーゼ-3, -6, -7) に分けられている(19)。

プロカスパーゼは、不活性な前駆体として細胞内に存在している (19)。図 3 で示すように、プロカスパーゼには活性化を抑制している N 末端側のプロドメインがあり、大サブユニット、小サブユニットおよびサブユニットを接続するリンカーで構成されている。カスパーゼが活性化する時、プロドメイン及びリンカーが切断され、大サブユニット 2 つと小サブユニットの 2 つからなるヘテロ四量体を形成する。開裂したカスパーゼは基質を分解しアポトーシスを進行させる (19, 21)。イニシエーターカスパーゼの開裂によってエフェクターカスパーゼを開裂する一連の反応、すなわちカスパーゼカスケードを引き起こし、アポトーシスが進行する (22)。

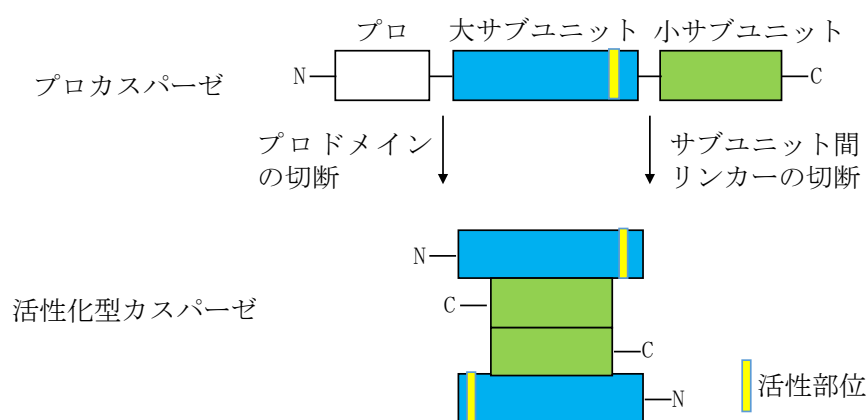


図 3. エフェクターカスパーゼの活性化機構

不活性型プロカスパーゼは刺激により、プロドメイン及び大サブユニットと小サブユニット間のリンカーが切断され、ヘテロ四量体となって活性化型カスパーゼになる。

アポトーシスのシグナル伝達経路には、外因性経路(デスレセプター依存経路)及び内因性経路 (ミトコンドリア経路) がある (23)。アポトーシスの外因性経路には、細胞膜に局在する細胞死受容体の Fas 及び TNFR1 に可溶性または膜結合デスリガンドの FasL 及び TNF- $\alpha$  が結合して活性化され、Fas 結合デスドメインタンパク質 (FADD) および/または TNFR 結合デスドメインタンパク質 (TRADD) を含むデス誘導シグナル伝達複合体 (DISC)



を介して、カスパーゼ-8 を開裂させ、カスパーゼ-3 及び-7 を開裂される(図 4) (24-26)。

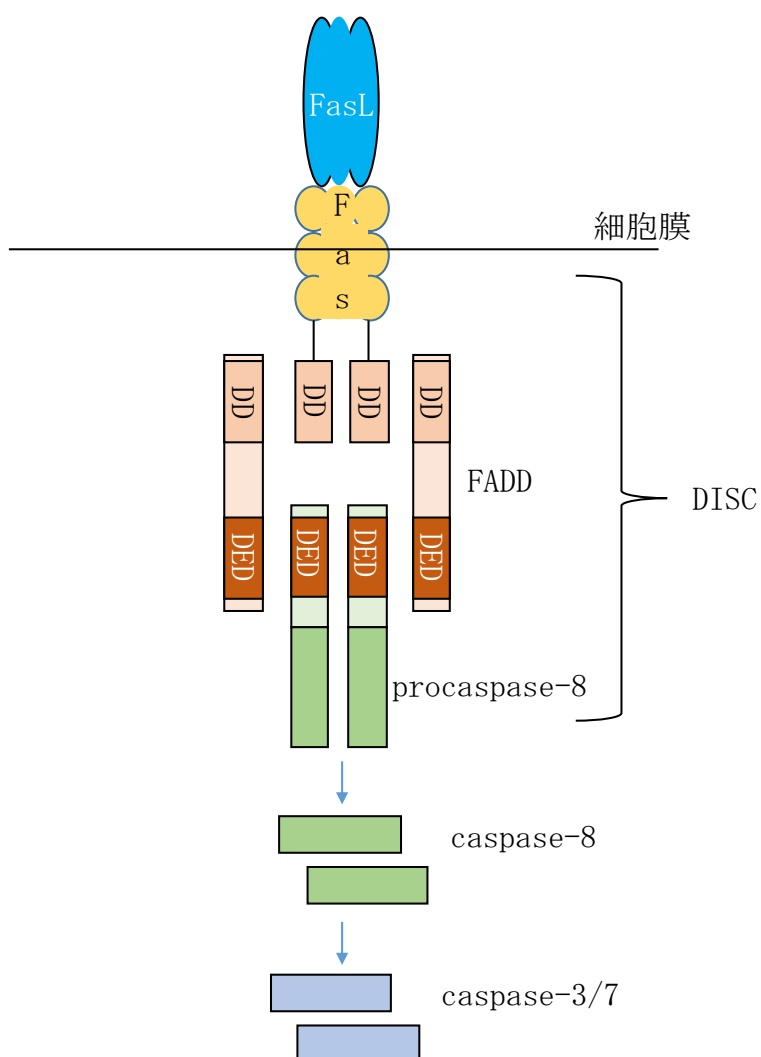


図 4. Fas を介した外因性経路のシグナル伝達機構

Fas は FasL によって刺激され、デスドメイン(DD)間の相互作用を介して Fas に FADD が結合する。そして、デスエフェクタードメイン(DED)の相互作用を介してプロカスパーゼ-8 は FADD に結合する。Fas-FADD-プロカスパーゼ-8 の複合体はデス誘導シグナル伝達複合体(DISC)と呼ばれる。これにより、プロカスパーゼ-8 が切断され、活性化することで、カスパーゼ-3 及び-7 を開裂する。

アポトーシスの内因性経路はミトコンドリア経路とも呼ばれている。細胞の損傷またはストレスなどにより、ミトコンドリア透過性移行(Mitochondrial membrane Permeability Transition, MPT)細孔の開口が起こり、ミトコンドリア膜電位の低下及びアポトーシス促進タンパク質であるシトクロム *c* を放出し、アポトーシスプロテアーゼ活性化因子-1 (apoptotic protease activating factor 1 ; Apaf-1) と結合し、多量体化してアポトソーム

(apoptosome) と呼ばれる複合体を形成する。アポトソームはカスパーゼ-9 を開裂させ、カスパーゼ-3 及び -7 を開裂することで、アポトーシスを進行させる (図 5) (27-30)。Bcl-2 family はミトコンドリアの透過性を調節することによってアポトーシスを制御している (31)。Bcl-2 family にはアポトーシスを誘導するタンパク質(Bax, Bid, Bad, Bak)とアポトーシスを抑制するタンパク質(Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1)がある(32)。抗アポトーシスタンパク質の Bcl-2 はミトコンドリアの外膜に存在し、シトクロム *c* の放出を阻害してアポトーシスを防止する (30)。細胞質に存在する Bid は、カスパーゼ-8 の開裂により、活性型フラグメント となった tBid がミトコンドリアへ移動し、シトクロム *c* の放出を促進する (33)。

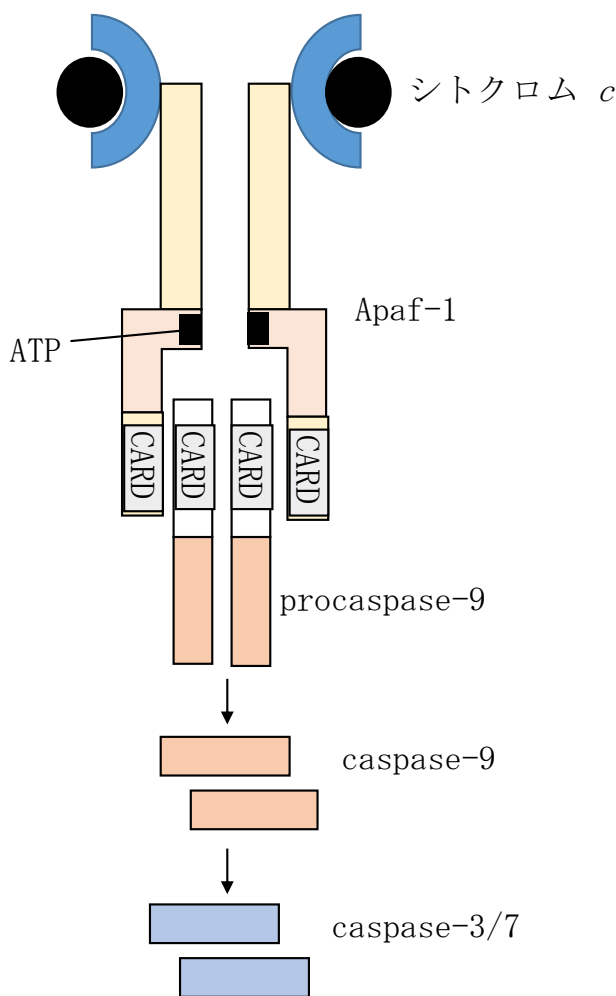


図 5. シトクロム *c* が誘導するカスパーゼ活性化経路

アポトーシス誘導の刺激により、ミトコンドリアから、シトクロム *c* が放出され、通常は不活性型前駆体として存在する Apaf-1 に結合し、ATP 依存的に Apaf-1 の構造を変化させ、Apaf-1-シトクロム *c* 複合体としてアポトソームを形成し、プロカスパーゼ-9 を切断する。プロカスパーゼ-9 とアポトソームの結合は、カスパーゼ-9 の開裂を介してカスパーゼ-3 及び-7 を開裂する。

アポトーシスの実行因子であるエフェクターカスパーゼとして、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は、触媒ドメイン全体で 57%の配列相同性を有している (34)。プロカスパーゼ-3 とプロカスパーゼ-7 は細胞質中に存在している。カスパーゼ-3 は細胞質で活性化するが、カスパーゼ-7 は活性化時ミクロソームに局在している (35、36)。

カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) というアミノ酸配列を特異的に認識して、最後のアスパラギン酸(D)の部分に共に切断する。蛍光基質 Ac-DEVD-Afc に対して、カスパーゼ-7 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $1.1 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-3 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $5.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-3 はカスパーゼ-7 よりも効率的に DEVD を切断する。また、蛍光発生基質 Ac-PEVD-Afc に対して、カスパーゼ-7 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $3.9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-3 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $1.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-3 は PEVD (Ac-PEVD-Afc) に対してカスパーゼ-7 の約 50000 倍効率的に PEVD を切断する (34)。また、活性化される時の切断部分も異なっている (図 6)。ただし、イニシエーターカスパーゼによる、プロカスパーゼ-7 の切断によって、大きなサブユニット (p20) と小さなサブユニット (p10) が生成され、活性化されたヘテロ四量体が形成されるが、カスパーゼ-7 p20p10 にも酵素活性があることが報告された (37、38)。

カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は Rho GDP 解離阻害剤である RhoGDI, スペクトリンの神経型である  $\alpha$ -fodrin 及びタンパク質リン酸化酵素である ROCK1 活性型キナーゼなどの特定の基質を共に切断する。カスパーゼ-7 の N 末端ドメインには、DNA 修復関連タンパク質である Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) 切断を促進する。PARP-1 に対して、カスパーゼ-7 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $6.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-3 の触媒特異性定数 ( $k_{cat}/K_M$ ) は  $0.8 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  であり、カスパーゼ-7 はカスパーゼ-3 より PARP-1 を効率的に切断する (34)。

しかし、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 が機能的に同じプロテアーゼではなく、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は他の多くの基質を切断する種類は関して大きく異なっている。カスパーゼ-3 は Bid、シトクロム *c* の放出を阻害するゲルズリン、がん抑制タンパク質である網膜芽細胞腫タンパク質 (Rb)、細胞骨格タンパク質であるビメンチン、2 本鎖 DNA の一方または両方を切断し再結合する酵素であるトポイソメラーゼ I、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼ (RIP)、シグナル伝達兼転写活性化因子である STAT1、およびアポトーシスタンパク質の X 連鎖阻害タンパク質である (XIAP) のタンパク質を分解にする (39、40)。カスパーゼ-7 はレチキュロンタンパク質 Nogo-B を切断し、アタキシン-7 のタンパク質を切断し、Hsp90 Co-chaperone p23 (P23) を切断する (34、40)。特に、カスパーゼ-3 は、Inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) または DNA fragmentation factor-45 (DFF45) を切断し、caspase-activated DNase (CAD) または DNA fragmentation factor-40 (DFF40) を放出することにより、アポトーシスの特徴であるヌクレオソーム間の DNA

断片化を誘導する (39, 41)。ただし、カスパーゼ-7 は ICAD/DFP45 を切断せず、ヌクレオソーム間の DNA 断片化は誘導しないことが示された (39)。また、カルシウム依存的非リソソームシステインプロテアーゼファミリーに属するタンパク質であるカルパイン及びイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ-1 の活性化はカスパーゼ-7 の開裂を誘導するが、カスパーゼ-3 の開裂を誘導しない (38, 42)。そして、カスパーゼ-7 欠損マウスはエンドトキシン血症に耐性があるが、カスパーゼ-3 ノックアウトマウスは感受性がある (38)。つまり、カスパーゼ-3 は主要なアポトーシス関連エフェクターカスパーゼであり、カスパーゼ-7 もアポトーシスの誘導に係わるエフェクターカスパーゼであるが、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は機能的に異なるプロテアーゼである。

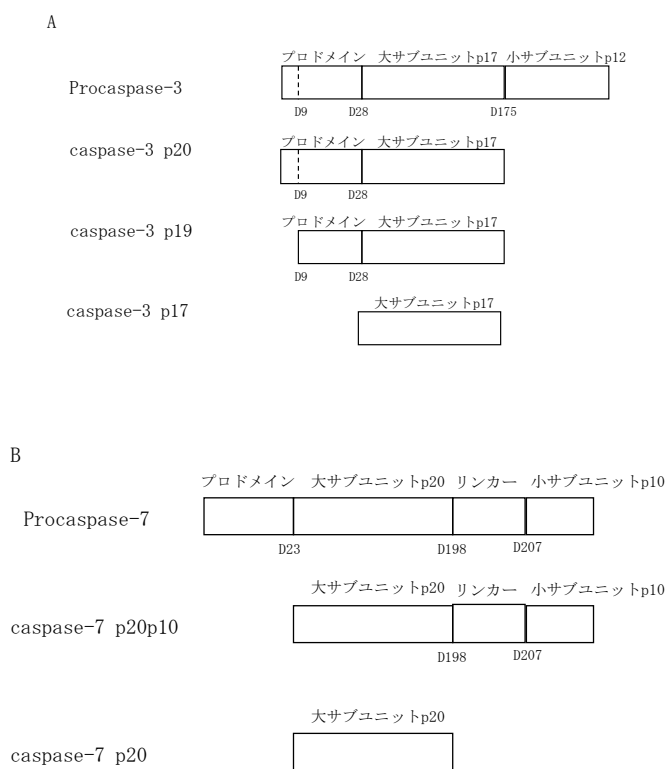


図 6. カスパーゼ-3 及びカスパーゼ-7 の構造及び切断したカスパーゼ-3 及びカスパーゼ-7 の構造  
 A: カスパーゼ-3 はプロドメイン、大サブユニット(p17)、小サブユニット(p12)から構成されている。イニシエーターカスパーゼによって Asp175 の C 末端側がまず切断され、Asp9 または Asp28 の C 末端側を次に切断されることにより、カスパーゼ-3 p20、p19 及び p17 を形成する。B: カスパーゼ-7 はプロドメイン、大サブユニット(p20)、リンカー、小サブユニット(p10)から構成されている。イニシエーターカスパーゼによって Asp23 の C 末端側のプロドメインが切断され、Asp198 と Asp206 の C 末端側のリンカーが切断され、カスパーゼ-7 p20p10 及びカスパーゼ-7 p20 を形成する。

## 1-4. 中薬

古くから中国では、中薬は様々な種類のがんを含む病気の治療に適用されてきた。生薬を組み合わせて作製した中薬では、主に中国で始まり、伝統的な中国医学の理論による病気の予防、診断、治療及び身体機能の調節を持つ薬であり、数千年にわたって改良を行われて開発された。アジア(特に中国)の人々の健康維持に重要な役割を果たしており、近年では欧米諸国でも頻繁に使用されるようになってきている (43)。

「黄帝内経」は、おそらく戦国時代に中薬を記録した最初の本であり、すべての中医者が読む本と見なされる。漢王朝には二冊の重要な本があり、植物、ミネラル及び動物の部分を取った最初の本である神農氏の「本草経」、及び伝染性の病気に対する治療法が中心となっている張仲景の「傷寒論」である。晋時代では、皇甫謐によって編纂された「鍼灸甲乙経」が具体的な鍼灸の臨床について記述されており、王叔和によって編纂された「脈経」が脈の理論と方法の説明について記述されている。唐王朝において「新修本草」が正式に神農氏の「本草経」に取って代わった。明王朝の1578年、李時珍の「本草綱目」は、中国の本草学史上において、植物、ミネラル及び動物の部分を全部記載した薬学著作を完成させた。「太平惠民和劑局方」は宋王朝の政府機関によって世界初の局方品の標準がまとめられた。また、屠呦呦氏は多くの命を救った抗マラリア薬であるアルテミシニン(青蒿素)の発見者として知られ、2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞した。このことから、伝統的な中薬には疾患に対して非常に効果的であることが証明された(図7) (43、44)。

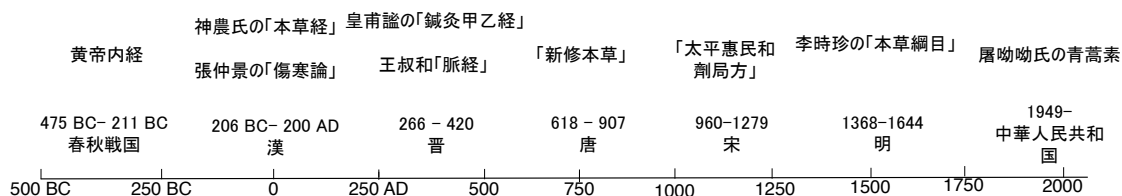


図 7. 中医の歴史と代表的な薬学書

中医では、人体の健康は平衡状態になっていると考えられている。中医治療の最終目標では、複雑な人体システムの気(エネルギー)と陰陽(バランス)状態を回復することである(43)。この理念に基づいて、腫瘍の形成は体内のエネルギーまたは体内の気および血液の欠乏(気血不足)に起因し、外的な悪の侵入、感情的な異常、過食などのいくつかの病原因子と組み合わせられ、気の停滞、うっ血(血瘀)、熱および湿気(熱湿)により引き起こされた体内の毒性ブロッキング、間塊を形成する(45)。このような問題は、中医において四種類の方法で対応する。i) 免疫機能の改善(扶正培本法)は免疫機能を調節し、抗がん機能、マクロファージの食作用機能、リンパ球の活性化及びNK細胞の機能が改善でき、例えば、

人参、黄耆、党参、茯苓など (46、47)。ii) 血液の強化 (活血化癥法) は腫瘍細胞の転移を抑制し、血液レオロジーを改善し、血液粘度を低下させ、抗凝固作用を発揮し、血小板活性を抑制し、線維素溶解を促進し、抗血栓症を引き起こし、例えば、当帰、郁金 (48、49)。iii) 解熱解毒 (清熱解毒法) は抗菌、抗がん、解熱、抗炎症効果があり、例えば、白花蛇舌草、半枝蓮、冬凌草など (48)。iv) 以毒攻毒はがん細胞を直接抑制して死滅させ、またマクロファージを活性化し、例えば、ムカデ、サソリ、砒霜などである (50、51)。

中医のがんの治療には独自の理論体系と用語があるが、自然科学の理論と異なっていて、抗がん作用メカニズムと抗がん有効成分は不明ため、人々が理解し、治療薬として用いることが困難であった (52)。中薬は技術的進歩により、中薬から抽出された粗抽出物または有効成分を用いて、*in vivo* または *in vitro* で抗がん研究を行い、抗がん作用メカニズムとその有効成分が解明されてきた (53)。このことより、中薬は抗がん効果を持つことが科学的な根拠として証明された。例として、オウレンは、キンポウゲ科オウレン属の多年草で、根茎は中薬としても使われている。オウレンは神農氏の「本草経」に始めて記録された (54、55)。オウレンは、「性寒、味苦、入心、脾、胃、肝、胆、大腸経」の性質を持ち、「清熱燥湿、泻火解毒、止瀉、消炎」の効果があり、胸苦しさ、不眠、口内炎、出血、下痢、赤痢、眼病、胃病、急性結膜炎、急性細菌性赤痢、急性胃腸炎、黄疸、歯痛、のどの渇き、湿疹などの治療薬として用いられる (56)。近年の研究より、オウレンは抗菌、免疫増強、抗潰瘍、血糖降下、解毒、抗腫瘍、およびその他の薬理効果を有することが報告されている (56、57)。また、オウレンの水抽出物はヒト表皮がん、ヒト胃がん、ヒト鼻咽頭がん及びヒト乳がんに対して抗がん効果があると報告された (58-60)。オウレンでは *berberine*, *palmatine*, *coptisine*, *jatrorrhizine*, *worenine*, *columbamine*, *cedarone*, *obakunone*, *obakulactone*, *magnoflorine* 及び *ferulic acid* などの有効成分が検出されている。その中で、*berberine* はオウレンの主要な抗がん成分であり、5.20~7.69%の含有量で存在し、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、肝がん、子宮頸がんなどのさまざまながんに対して抗がん効果があることが明らかになった (61)。

現在の研究より、中薬は、複数のシグナル伝達経路とがんに関連する分子に影響を与える能力を持つことが明らかになっている (図 8) (5)。これまでに抗がん作用があると報告されている中薬はおよそ 300 種類以上存在する。その中には、大蒜、牡蠣、海藻、ショウガなど無毒な物やリーチ、サソリ、カンタリジン、砒素など有毒な物も含まれている (62)。また、中薬から抽出された特定の成分はがん細胞に対して細胞周期停止及びアポトーシスを誘導し、正常細胞に対する細胞毒性を持たないことが報告された (63)。以上、中薬はがん細胞に対して新しい治療方法になる可能性が高いと考えられる。

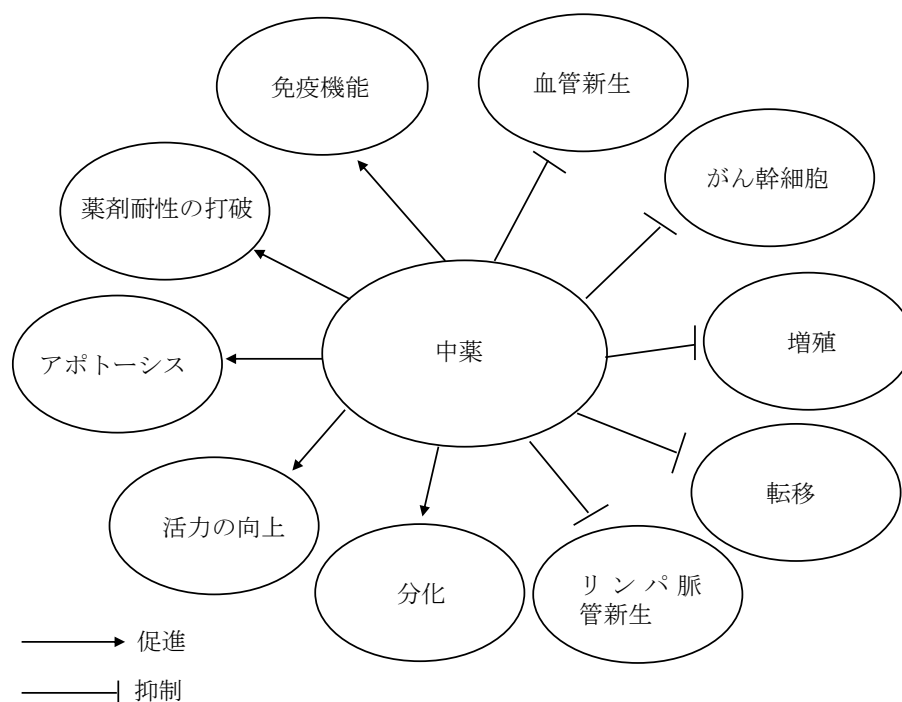


図 8. 中薬の様々な機能

中薬は免疫機能を強化し、薬剤耐性を打破し、アポトーシスを誘導し、活力を高め、分化を進める。また、中薬はがん幹細胞の形成、血管の新生、リンパ血管の新生、増殖及び転移を抑制する

### 1-5. *Ranunculus ternatus*

本研究では中薬の原料として用いられるキンポウゲ科キンポウゲ属の多年草、*Ranunculus ternatus*に着目した (64)。

キンポウゲ科には、約 50 属と 2,000 を超える種類があり、主に北半球の温帯と寒帯に分布している。表 1 に示したように、キンポウゲ科の植物の特徴に対し、分類した (54、55)。キンポウゲ科の植物には、さまざまな化学成分が含まれており、その多くは薬用植物である。中国で 42 属の約 720 種類のキンポウゲ科の中に、30 属の約 220 種類が薬用として利用できる。例えば、有名なキンポウゲ科の中薬として、オウレン、トリカブト、ボタンピ、サラシナショウマなどがある。キンポウゲ科には他の科により、最も多い有毒植物を含有している。例えば、トリカブト属、デルフィニウム属、イチリンソウ属、オウレン属、サラシナショウマ属、オキナグサ属、センニンソウ属、キンポウゲ属、クロタネソウ属、カラマツソウ属などがある (54、55)。また、トリカブト、オダマキ、サラシナショウマ、オウレン、デルフィニウム、オキナグサ、キンポウゲ、クロタネソウなど、土壌農薬としての使用もできる (65)。

キンポウゲ科の植物の特徴的な成分として、magnoflorine (C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>4</sub>)や ranunculin (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>)、または両方が含まれている。magnoflorine は抗炎症作用を持っていて、ranunculin は *in vitro* で抗がん作用を持っている (54, 55, 66, 67)。現在の研究により、図 9 を示したように、\*を付けた属は抗がん効果があると報告されている。これらのキンポウゲ科の植物には、アルカロイド、テルペノイド、サポニン及び多糖類が含まれており、*in vitro* および *in vivo* で抗がん活性を示している。例えば、*Clematis* の saponins、*Pulsatilla koreana* の saponin D、raddeanin A、23-hydroxy-betulinic acid thymoquinone、berberine、lappaconitine などがある (67)。従って、キンポウゲ科の植物は抗がん剤としての有用性が期待される。

表 1. キンポウゲ科の分類

Family	Subfam	Trib	Genus	Reference
Ranunculaceae	Helleboreidae	Cimicifugeae	<i>Actaea</i>	54, 56
			<i>Beesia</i>	
			<i>Cimicifuga*</i>	
		Delphineae	<i>Souliea</i>	54,56
			<i>Aconitum*</i>	
			<i>Consolida</i>	
		Helleboreae	<i>Delphinium</i>	67
			<i>Eranthis</i>	
			<i>Helleborus</i>	
		Trollieae	<i>Nigella*</i>	67
	<i>Caltha</i>			
	<i>Calathodes</i>			
	<i>Trollius</i>			
	Thalictroideae	Isopyreae	<i>Aquilegia</i>	61
<i>Dichocarpum</i>				
<i>Enemion</i>				
<i>Isopyrum</i>				
<i>Leptopyrum</i>				
<i>Paraquilegia</i>				
<i>Semiaquilegia</i>				
Coptideae	<i>Urophysa</i>	54, 56		
	<i>Asteropyrum</i>			
Ranunculoideae	Anemoneae	<i>Coptis*</i>	60	
		<i>Thalictrum*</i>		
		<i>Anemoclema</i>		
		<i>Anemone*</i>		
		<i>Archiclematis</i>		
		<i>Circaeaster</i>		
		<i>Clematis*</i>		
		<i>Hepatica</i>		
		<i>Metanemone</i>		
		<i>Naravelia</i>		
	<i>Pulsatilla*</i>			
	Ranunculeae	<i>Kingdonia</i>	54, 56	
		<i>Adonis</i>		
		<i>Batrachium</i>		
<i>Callianthemum</i>				
Ranunculeae	<i>Ceratocephalus</i>	67		
	<i>Halerpestes</i>			
	<i>Oxygraphis</i>			
	<i>Ranunculus*</i>			
	<i>Ranunculus*</i>			
	<i>Ranunculus*</i>			

\* Indicates anticancer

キンポウゲ属は世界に約 600 種あり、キンポウゲ科中で最大の属である (54, 55)。キンポウゲ属は花、茎、葉、果物が薬として使用されていて、多くの薬用植物があり、毒性も持っている (67)。よく薬用として使用されている田芥子、小狐牡丹及び金鳳花には、マラリア、喘息、慢性関節リウマチ、歯痛、黄疸、リンパ結核などに対して治療効果を示している。



一般的な治療方法として、新鮮な田芥子、小狐牡丹及び金鳳花をすり潰して、患部に塗り、毒性があるため、あまり内服されない。キンポウゲ属の植物の特徴的な成分として、magnoflorine は含まれていない。一方で、抗がん効果がある ranunculin の含量が最も多い (54-56)。ranunculin はキンポウゲ属の植物の茎と葉に存在していて、刺激によって分解され、グルコースと protoanemonin ( $C_5H_4O_2$ ) という有毒物質となる(67)。また、キンポウゲ属の植物から、apigenin, scopolamine, artemisinin 及び luteolin などが同定され、がん細胞の増殖を抑えることが報告した。これらのことから、キンポウゲ属の植物は抗がん効果があることが示された。

*Ranunculus ternatus* は元々無名の野草であり、17 世紀から、民間療法としてリンパ結核と流行性耳下腺炎を治療するために使用されてきた。1954 年に河南省信陽特殊病院の従業員である周樹綿は、治療薬として用いるため、その用量などを定義した。1977 年に出版された《中薬材ハンドブック》と《中華人民共和国薬局方》で初めて記録された。根の形とスクロフラ (鼠瘡) の治療に用いられることから、中国では「猫爪草」と呼ばれている (68)。カエル (蛙) の傘に見立てていることから、日本で「ヒキノカサ」を呼ばれている。ヒキノカサは水辺など湿った所に生育しており、中国 (河南省、浙江省、江蘇省、安徽省、湖北省、湖南省、四川省、雲南省、貴州省、広西チワン族自治区と台湾)・日本 (関東地方以西の本州と四国、九州) に分布している (68-70) (図 9)。



図 9. 中国のヒキノカサの分布

ヒキノカサは主に中国の河南省、浙江省、江蘇省、安徽省、湖北省、湖南省、四川省、雲南省、貴州省、広西チワン族自治区と台湾に分布している (68-70)。

図 10 を示したように、ヒキノカサの根は 3~5 mm の塊茎(地下茎が肥大し、養分を貯え、塊状になるもの)があり、卵形または紡錘状である。茎は 5~18 cm、微軟毛が少ないかまたは無毛で、分岐している。基底葉は 5~10 cm であり、葉柄は 2~6 cm あり、葉身は三つ複

葉、五角形または輪郭が広く卵形、0.6~1.5 × 1.0~2.4 cm、薄い紙のような、背軸に微軟毛がある (54、55)。

ヒキノカサは「性温、味甘、辛、入肝、肺経」の性質を持ち、「清熱解毒、軟堅化痰、散結消腫」の効果がある。頸部リンパ節結核、リンパ節炎、肺結核、マラリア、咽頭炎、癩(せつ)、スネークバイト (Snake bite)、歯痛及び様々な腫瘍の治療に使用されている (56、71)。他のキンポウゲ属の植物の同じのように、癩に対し、新鮮なヒキノカサの茎と葉をすりつぶして患部に塗る。しかし、ヒキノカサは他のキンポウゲ属の植物より、卵形または紡錘状のような塊茎があるという特徴がある (54)。また、他のキンポウゲ属とは違い、薬用部分は茎と葉だけではなく、根の塊茎も最も重要な薬用部分である (56)。本研究では、ヒキノカサ根の塊茎の部分だけを使用しているため、以降より、ヒキノカサ根の塊茎をヒキノカサと省略する。ヒキノカサの使用法として、頸部リンパ節結核に対し、ヒキノカサとウツボグサを黄酒と水で煮て、濾過して、摂取または頸部に塗る。または、ヒキノカサとウツボグサのチンキ剤(生薬やハーブの成分をエタノール、または30%以上のエタノールに浸すことで作られる液状の製剤である)を作成し、濾過して、摂取または頸部に塗る。また、悪性リンパ腫瘍、甲状腺腫瘍及び乳腫瘍に対し、各30gのヒキノカサ、スネークベリー、カキ及びウツボグサを水で煮て得た抽出物は、治療効果を示すことが明らかになった (56)。

古くから中国では、薬膳を食用するという文化があり、薬膳とは中医学理論に基づいて食材と薬材を組み合わせた料理である。現在ヒキノカサは薬膳の材料として使用されていて、「清熱解毒、軟堅化痰、散結消腫」の効果がある。近年臨床応用の拡大及び薬膳の普及に対し、ヒキノカサの使用量は増加しており、ヒキノカサの人工栽培が広く行われている (71)。



图 10. ヒキノカサ (54)

Flora Reipublicae Popularis Sinicae 28: 301, pl. 93. 1980.- Zhang Taili

A



B



図 11. ヒキノカサの根

A: 紡錘形の根、猫の爪のような形、長さ3~10 mm、直径2~3 mm、黄褐色の茎と繊維状の根が残っている。表面は黄褐色で、長期間保存すると色が濃くなる。非常に硬く、切断面は白色または黄色であり、香りがなく、甘い味がある (69)。B: ヒキノカサの粉末。

ヒキノカサの化学組成は非常に複雑であり、フラボノイド、サポニン、グリコシド、アルカロイド、揮発油、有機酸、ステロール、エステル、アミノ酸、多量元素及び微量元素が含まれていることが確認されている (72)。

ヒキノカサの水抽出物からは、11-*O*-β-D-glucopyranosyl rutaecarpine (ternatoside C)、11-*O*-α-L-rhamnosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl (ternatoside D)を同定している(73)。石油

エーテル抽出物から、ethyl palmitate、myristic acid、palmitic acid、 $\beta$ -sitosterol、stigmasterol、campesterol を同定している (73)。クロロホルム抽出物からは、1,2-benzenedicarboxylic acid, dibutyl ester、glycerol  $\beta$ -palmitate、glycerol  $\beta$ -steariate、5-hydroxymethyl furaldehyde、5-hydroxymethyl ferulic acid を同定している (74)。n-ブタノール抽出物からは、4-oxo-5-(*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl) pentanoate n-butyl、4-oxo-5-(*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)valerate methyl、benzyl alcohol-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside を同定している (75)。酢酸エチル抽出物からは、sternbin、methylparaben、3-(4-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)phenyl)-2-propenoic acid、linocaffein、 $\beta$ -D-glucose、robustaflavone-4'-methylether、kayaflavone、podocarpusflavone A、bilobetin、isoginkgetin、amentoflavone、4-carbonyl-(*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)petanoate 1-*O*-butyl、(R)-3-[3-hydroxy-4-(*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl)phenyl] 2-hydroxypropanoate butyl、4-*O*-D-glucopyranosyl-*p*-coumaric acid を同定している (75-77)。

Zhang は揮発性油成分に対して GC-MS 分析を行い、37 種類の成分を同定している。エステルとして、diisobutyl succinate、di(*sec*-butyl) 2-methylsuccinate、(*Z*)-7-hexadecenal、methyl stearate など同定している。酸として、hexanoic acid、hexadecanoic acid、palmitic acid など同定している。アルカンとして、hexadecane、heptadecane、nonadecane、heneicosane、tetracosane、tetracontane など同定している。芳香族として、*p*-xylene、naphthalene など同定した。アルデヒドとして、benzaldehyde など同定した。また、glycerin、benzothiazole など同定している(78)。

Xiong は脂肪酸として、(R)-3-hydroxy-11-methoxy-11-oxoundecanoic acid、palmitic acid、linoleic acid、oleic acid、ethyl palmitate、adipic acid、stearic acid を同定している (79、80)。また、Zhou もヒキノカサのエタノール抽出物から palmitic acid を同定している (81)。

ヒキノカサの薬理的活性は、免疫調節機能、抗酸性作用、抗菌作用、がんの転移抑制作用、抗腫瘍作用があり、また人体に対して毒性と副作用がないとされる (70)。

ヒキノカサに含まれる多糖類とサポニンには免疫調節効果がある。ヒキノカサ根の塊茎の多糖類とサポニンが実験動物の免疫機能に及ぼす影響により、マクロファージの食作用能が大幅に増加した (82)。また、Hu はシクロホスファミドによって誘導される免疫抑制により、多糖類がマウスの免疫機能を改善できることを確認している (83)。サポニンと多糖類が正常なマウスの免疫機能を改善し、NK 細胞の活性を増加し、サポニンは多糖類よりも大きな効果があることを示した (84)。また、Han はヒキノカサの多糖類は抗肝損傷効果を有し、そのメカニズムは抗酸化に関連している可能性が示された (85)。

ヒキノカサの石油エーテル抽出物は、多剤耐性結核株の細胞外及び細胞内の増殖を著しく阻害し、感染したマクロファージ細胞の TNF- $\alpha$  の発現レベルを増加させることができる (86)。

ヒキノカサは、中枢神経系、心臓、呼吸器系、腸壁の機能を調整することで、血圧を下げることができるが、血管に明らかな拡張効果がないことから、体力の改善及び疾患の抵抗力

を高めると推測された (87)。

ヒキノカサに含まれる多糖類とサポニンにはマウス肉腫瘍 S-180 細胞、エールリッヒ腹水腫瘍 EAC 細胞、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 及びヒト胃がん BGC-823 細胞に対して、細胞の増殖を阻害した (83、88、89)。また、ヒキノカサ根の塊茎に含まれるサポニンは、ヒト非小細胞肺癌 A549 細胞、NCI-H460 細胞、ヒト大腸がん LoVo 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスと細胞周期の G0/G1 期停止を誘導することを示した (90-93)。また、ヒキノカサ根の塊茎の 70%エタノール抽出物は、TNF を誘発する可能性があることを示唆した (81)。Wang は水抽出物、石油エーテル抽出物、クロロホルム抽出物、酢酸エチル抽出物及び n-ブタノール抽出物において肝がん H22 を移転したマウスに対して、抗腫瘍作用を評価した。この研究から、石油エーテル抽出物には抗腫瘍効果がないことが明らかになった。これに対して、クロロホルム抽出物及び酢酸エチル抽出物は、腫瘍の体積を減らすことから、明らかな抗腫瘍効果があることが明らかになった。水抽出物の抗腫瘍効果及び n-ブタノール抽出物にも抗腫瘍効果はあるが、酢酸エチル抽出物及びクロロホルム抽出物より効果が弱く、水抽出物、クロロホルム抽出物及び酢酸エチル抽出物はマウスの体重を増加し、正常細胞に対する細胞毒性がないことが明らかになった。石油エーテル抽出物及び n-ブタノール抽出物はマウスの体重を少し減少され、正常細胞に対する細胞毒性が若干、確認された (94)。

Nie は、水抽出物の毒性と副作用を評価した。急性毒性試験によってヒキノカサ根の塊茎の水抽出物の最大耐量 (MTD) が  $> 20.0 \text{ g/kg } \text{ }^{\circ}\text{body weight}$  である。Ames 試験として遺伝子変異誘発能の検証、マウス赤血球小核の形成能、及びマウス精子異常の変化の結果は水抽出物において陰性が確認された。90 d の水抽出物の摂食実験では、マウスの体重が増加し、食物利用率および白血球の総数、赤血球の総数及び血色素指標値に異常なく、生化学的指標値は正常範囲内であり、主要臓器組織に有意な病理学的変化は観察されなかった。従って、水抽出物には明らかな毒性と副作用はないことが示された (95)。

臨床的使用と薬理学的分析から、**ranunculin** が存在しないヒキノカサにも抗腫瘍効果があることが明らかになった。また、ヒキノカサのクロロホルム抽出物と酢酸エチル抽出物は水抽出物より、抗腫瘍性が強く、細胞毒性がないことから、化学療法剤に代わり、正常細胞の傷害を引き起こさず、がんに対して効果的に治療でき、新しい治療方法になる可能性が高い。しかしながら、ヒキノカサのクロロホルム抽出物と酢酸エチル抽出物の有効成分が不明であり、アポトーシスの関係性と誘導メカニズムも未だ解明されていない。そして、現在、ヒキノカサ以外の中薬の酢酸エチル抽出物には、豊富な抗がん作用を持つ物質が含まれていることが報告される。

以上のことから、本研究はヒキノカサの酢酸エチル抽出物により、アポトーシスを研究するためのモデルとして広く使用されているヒト急性T細胞白血病細胞株 Jurkat に対するアポトーシスへの関与及び誘導メカニズムを解明することにより、ヒキノカサの酢酸エチル抽出物は抗がん効果があるかどうかを検討した (96、97)。

## 第2章 カスパーゼ-7に依存的な RTE 誘導アポトーシス細胞死

### 2-1. 背景

伝統的な中薬から抽出された特定の成分は、細胞周期を停止させ、がん細胞のアポトーシスを誘導することにより、悪性腫瘍の増殖を抑制することが報告されている (98)。

細胞周期停止は、複製と分裂のプロセスを停止させ、細胞 DNA の損傷が修復不可能な場合、アポトーシスが発生する (11)。アポトーシスが誘導されると、ホスファチジルセリン (PS) の露出、細胞質の収縮、クロマチン凝縮、DNA 断片化、原形質膜の完全性に影響を与えないアポトーシス小体の形成などの識別可能な形態学的特徴がみられる (16)。また、アポトーシスの誘導に関わるシステインプロテアーゼのファミリーであるカスパーゼが開裂して活性化することにより、PS の露出と DNA の断片化など一連の過程に関与する (99、100)。

ヒキノカサは、第1章で説明したように、多くの抗がん効果を備えているため、伝統的な中薬の抗がん剤として広く使用されている。ヒキノカサの酢酸エチル抽出物 (RTE) は、マウスの肝臓がんの体積を減らすことが明らかになっているが、RTE が誘導するアポトーシスの分子機構やどのような構造的特徴がアポトーシスに関与しているのかは明らかになっていない。そこで、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株 Jurkat をがんモデルとして使用することにより、RTE 誘導アポトーシスの潜在的なメカニズムを検討した。

また、中薬から抽出した特定の成分はカスパーゼ開裂を介してアポトーシスを誘導することも報告された (101)。汎カスパーゼ阻害剤は、細胞透過性の広域スペクトルカスパーゼ阻害剤であり、多くのカスパーゼの開裂を有意的に阻害できる (37、102)。そこで、汎カスパーゼ阻害剤を用い、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死におけるカスパーゼへの関与を検討した。

ヒト乳がん MCF-7 細胞はカスパーゼ-3 が欠損していることが明らかになっている (103)。そこで、MCF-7 細胞を用い、RTE はカスパーゼ-3 開裂がなくでも、カスパーゼ-7 開裂のみを介してアポトーシス様細胞死を誘導するかどうかを検討した。

### 2-2. 実験方法

#### 2-2-1 細胞培養

ヒト急性白血病 T 細胞株 Jurkat は、国立成育医療センター研究所の宮下俊之先生より供与された。Jurkat 細胞の培養には RPMI1640 培地 [10.4 g/L RPMI1640 (Sigma-Aldrich),

St. Louis, USA)、5 mM HCl (Wako, Osaka, Japan)、3.5  $\mu$ L/L 2-メルカプトエタノール (Wako)、75 mg/L カナマイシン硫酸塩(Wako)、2 g/L NaHCO<sub>3</sub>(Wako)]を用い非働化済みのウシ胎児血清 (FBS; Biofill, Victoria, Australia) が 10%になるように添加し、0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。また培養条件は、インキュベーター内で CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培養を行った。

ヒト乳がん MCF-7 細胞は東北大学生物医学研究センターから供与された。MCF-7 細胞の培養には 10 g/L DMEM 培地(Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose)(Sigma)、5 mM HCl(Wako)、3.5  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール(Wako)、100mg/L ストレプトマイシン(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)、100U/mL ペニシリン(Thermo Fisher Scientific)、2 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Wako) を用い非働化済みの FBS を 10%になるように添加し、0.22  $\mu$ m フィルターを通して滅菌したものを用いた。また培養条件は、インキュベーター内で CO<sub>2</sub>濃度 5%、37 °Cで培養を行った。

#### 2-2-2. Jurkat 細胞に対する薬剤の作用方法

直径 100 mm 細胞培養ディッシュ(Corning, Durham, USA)を用い、RPMI1640 培地 10 mL 中に 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells となるように播種し、汎カスパーゼ阻害剤 benzyloxycarbonyl-Asp-2,6- dichlorobezoyloxymethylketone (Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB) (Peptide Institute, Osaka, Japan)を 50  $\mu$ M で 1 h 作用させた後、RTE を 0.2 mg/mL になるように作用させた。汎カスパーゼ阻害剤及び RTE の作用は CO<sub>2</sub> 濃度 5 % のインキュベーター内で 37°C で作用させた。

#### 2-2-3. ヒキノカサの有機層画分回収プロトコル

粉末ヒキノカサ(根)50 g に 95% エタノール(Wako) 70 mL を加えて 3 h、100 °Cで還留抽出した。エタノール溶液を回収し、ロータリーエバポレーター (東京理化学器械株式会社、東京、日本) によって、エタノールを除去した。Milli Q 40 mL に分散した後、80 mL 酢酸エチル(Wako)と 50 mg 塩化ナトリウム (Wako)を添加し、有機層を回収した。有機層は硫酸マグネシウム(Wako)によって脱水し、遠心エバポレーター (Thermo Fisher Scientific) によって濃縮乾固した後、DMSO (Wako)に溶解し、100 mg/mL のヒキノカサの酢酸エチル抽出物(RTE)を得た (94)。

#### 2-2-4. MTT assay

2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL に調製した Jurkat 細胞は 96 穴プレート(BD falcon, Franklin Lakes, USA)に 0.1 mL/well 分注した。また、1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL に調製した MCF-7 細胞は 96 穴プ



プレート(BD falcon)に 0.1 mL/well 分注し、一晚、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し接着させた。さらに 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で RTE を 24 h 作用させた。作用終了の 1 h 前に 5 mg/mL の 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 溶液 (MTT) 試薬 (Wako) を各ウェルに 10  $\mu$ L ずつ添加した。最後に、上清を除去し、100  $\mu$ L の DMSO を加えて生細胞の作用により生成した MTT ホルマザンを溶解した。マイクロプレートリーダー(Awareness Technology, Palm City, USA)を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

#### 2-2-5. フローサイトメーター

細胞周期を測定する際は、 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に RTE を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、リン酸生理緩衝液(PBS)によって、5 min、4 °C、1200 rpm で 2 回遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに 0.5 mL の 0.1% Triton-X 100 (Wako)を含んだ PBS で懸濁した後、12.5  $\mu$ L の 1 mg/mL ヨウ化プロピジウム(PI) (Wako)と 5  $\mu$ L の 5 mg/mL RNase A (Wako)を加えて懸濁し、20 min 室温暗所で静置した。その後、ナイロンメッシュ (Sigma) に通してフローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson, Mountain View, CA) で PI の蛍光強度の測定をした。Cell Quest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用い、結果を分析した。

PS の露出を測定する際は、 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に RTE を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに 197.5  $\mu$ L の binding buffer (10 mM HEPES (Dojindo, Tokyo, Japan)、140 mM NaCl (Wako)、2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (Wako)、pH 7.4) に懸濁した後、2.5  $\mu$ L の fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin V (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) を加えて懸濁し、10 min 室温暗所で静置した。300  $\mu$ L binding buffer で遠心洗浄し、1  $\mu$ L の 1 mg/mL PI を加え懸濁した後、ナイロンメッシュに通してフローサイトメーターで FITC の蛍光と PI の蛍光強度を測定した。Cell Quest ソフトウェアを用い、結果を分析した。

DNA 断片化を測定する際は、Terminal deoxynucleotidyl transferase を介した dUTP ニックエンドラベリング (TUNEL) アッセイを行い、MEBSTAIN Apoptosis TUNEL kit Direct (Medical&Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を使用した。 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に RTE 0.2 mg/mL 24 h または positive control としてスタウロスポリン 1  $\mu$ M 4 h を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで作用させた後、0.2 % ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。4 % パラホルムアルデヒド (0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) で 4 °C で 30 min 固定した。さらに 0.2 mL の 70 % エタノールを細胞ペレットに加え、-20 °C で 30 min 透過性亢進処理した。細胞を 0.2 % BSA を含む PBS で洗浄した後、30  $\mu$ L の terminal

deoxynucleotidyl-transferase (TdT)溶液 (TdT buffer II、FITC-dUTP、TdT を 18:1:1 の割合で混合した) を加え、37 °C で 1 h インキュベートした。その後、細胞を 0.2% BSA を含む PBS で洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。Cell Quest ソフトウェアを用い、結果を分析した。

#### 2-2-6. アガロースゲル電気泳動

2×10<sup>6</sup> cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に RTE を 24 h または positive control としてスタウロスポリン 1 μM、6 h を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに 500 μL の Buffer A [10 mM Tris (Wako)、3 mM MgCl<sub>2</sub> (Wako)、2 mM 2-メルカプトエタノール (Wako)、pH 7.8] で遠心洗浄し、1 mg/mL Proteinase K in Lysis buffer [50 mM Tris、10 mM EDTA・2Na、0.5 % sodium lauryl sarcocinate、pH 7.8] で懸濁した。30 min、50 °C でインキュベートし、5 mg/mL RNase A を添加して懸濁後、さらに 15 min、50 °C でインキュベートした。さらに 30 μL の Application buffer [1× TBE buffer (10.8 g Tris、0.744 g EDTA・2Na、5.5 g Boric acid (Wako) in dH<sub>2</sub>O)、0.025 % bromophenol blue (Wako)、20 % glycerol (Wako)] を加え、Running buffer (0.5 μg/ml ethidium bromide-TBE (Wako) に浸した 1.8 % アガロースゲルで電気泳動した。ゲルは、イメージアナライザー (GE Healthcare, Chicago, IL) を用い、紫外線下で臭化エチジウム染色を使用して視覚化した。

#### 2-2-7. 蛍光顕微鏡観察

Jurkat 細胞(2×10<sup>5</sup> cells/mL)を 96 穴プレート(BD falcon, Franklin Lakes, NJ)に 0.1 mL ずつ分注後、RTE を添加し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 h 作用させた。PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。1 mg/mL PI および 200 μg/mL Hoechst 33342 (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, MN) を含む PBS に 37 °C で 10 min 懸濁した。EVOS®FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific) を用い、400×で Hoechst 33342 の 461 nm の発光と PI の 620 nm 発光で蛍光を観察した。

#### 2-2-8. Western Blot 法

2×10<sup>6</sup> cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞は 10 mL を準備した。また、1×10<sup>6</sup> cells を 10 mL に調製した MCF-7 細胞は 10 mL を準備し、一晩、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し接着させた。RTE 作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。Lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10%

glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (Dojindo) , 1% protease inhibitor cocktail (Sigma)、pH7.5) を加えて、20min 氷冷した。氷冷後、4 °C, 13000 rpm で 15 min 遠心し、上清を回収した。ビスンコニン酸 (BCA) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) にてタンパク量を 2.0 mg/ml に調製した 20 μL の Cell Lysate と 20 μL の Sample Application buffer [10 % SDS (Wako) , 125 mM Tris , 20 % glycerol, bromo phenol blue, 5 % 2-mercaptoethanol, pH 6.8]を混合したサンプルを 100 °Cで 3 min インキュベートした。また分子量確認のために 20 μL Molecular Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 20 μL Lysis buffer, 40 μL Sample Application buffer を混合した分子量マーカーを 100 °Cで 3 min 加熱処理した。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 15 %アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4 %を用いた。ゲルを泳動槽に固定し、Electrode buffer [25 mM Tris, 186 mM Glycine, 3 mM SDS]を注いだ。ゲルのウェルに各サンプルを 20 μL ずつ入れ、50 V で 30 min、その後 100 V で 90 min 泳動を行った。泳動終了後、ゲルを取り出し、Blotting buffer [48 mM Tris, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20 % メタノール (Wako) ]に浸した。また、親水処理はポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン(Bio-Rad)をメタノールに 0.5 min、Milli Q 水に 3 min、Blotting buffer に 3 min の順に浸し、ましろ紙 (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を Blotting buffer に浸した。転写装置(Bio Craft, Tokyo, Japan)にろ紙 2 枚、ゲル、PVDF メンブレン、ろ紙 2 枚の順に積み重ね、30 min 転写を行った。転写終了後、PVDF メンブレンをスキムミルク原液[3 % スキムミルク粉末(Yukijirushi, Tokyo, Japan), 0.1 % NaN<sub>3</sub> (Wako)]に浸し、室温で 1 h ブロッキング操作を行った。その後、スキムミルク希釈液[1/10 スキムミルク原液, 0.1 % Tween-20 (Wako) , 0.1 % NaN<sub>3</sub>]に移し換え、PVDF メンブレンをビニール袋に移し、室温で 30 min ブロッキング操作を 2 回行った。PVDF メンブレンをビニール袋に移し、一次抗体液を入れ、4 °Cで一晩抗体反応させた。使用した一次抗体は、カスパーゼ-3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)、-7 (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)、-8 (Cell Signaling Technology) 、 -9 (Santa Cruz Biotechnology) 、 PARP-1 (Santa Cruz Biotechnology) 、及び β-actin (Cell Signaling Technology) (すべての抗体は Tween-20-PBS で 1 : 1000 に希釈された)。 反応後、一次抗体液を回収し、PVDF メンブレンを 0.1 % Tween-20-PBS で 5 min、3 回洗浄した。二次抗体 HRP-labeled anti-rabbit IgG secondary antibody または HRP-labeled anti-mouse IgG secondary antibody (Cell Signaling Technology)を Tween-20-PBS で 1:2000 の割合で希釈し抗体反応させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) を 1 min 作用させ、Image Quant LAS 4000(GE Healthcare Life Sciences)によってタンパク質を検出した。

## 2-2-9. 統計解析

GraphPad Prism7 (GraphPad, San Diego, CA)を用いて、Kolmogorov-Smirnov法によりデータの正規分布を確認した。有意差検定には Student's t-test を用いて行い、検定の結果が  $p < 0.05$  であるとき、統計的に有意であるとみなした。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. MTT assay による RTE の細胞傷害検出

RTE はどの程度細胞傷害性を有しているのかを MTT assay を用いて Jurkat 細胞の生存率より検討した。MTT 法とは、MTT (黄色) をホルマザン色素 (紫色) へ還元する生細胞中のミトコンドリアのコハク酸デヒドロゲナーゼ活性を測定する比色定量法であり、生細胞の生存率や毒物の細胞毒性を評価することにも用いられる(104)。結果、RTE は Jurkat 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした (図 12)。また、 $IC_{50}$  (half maximal 50 % inhibitory concentration) は細胞生存率が 50% の時の薬剤濃度であり、一般的に使用される薬物感受性統計としてよく使用されている(105)。RTE の  $IC_{50}$  値は 0.20 mg/mL であることが明らかになった。この結果から、RTE が Jurkat 細胞に対し、細胞傷害性を示すことが明らかになった。

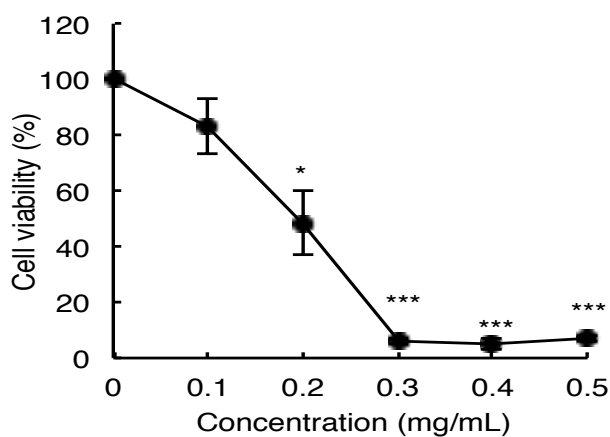


図 12. RTE は Jurkat 細胞に対して細胞傷害性を示す

Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$  vs untreated cells.

### 2-3-2. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出

PI は生細胞の細胞膜を透過せず、細胞膜の完全性を失った細胞に入り、DNA にインターカレートすることより、細胞 DNA の含有量をフローサイトメトリーによって測定できることが明らかになっている(106、017)。

アポトーシスの特徴として DNA の断片化を引き起こすことにより、G1 期で観察される DNA 含有量よりも低い DNA 含有量の細胞は、“Sub-G1 期”細胞と呼ばれ、Darzynkiewicz et al.と Newbold et al.は Sub-G1 期としてアポトーシス細胞数を推定できる可能性があると報告している(107、108)。

RTE は Jurkat 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした結果から、RTE により細胞周期停止が起きた可能性がある。これを確認するために PI 染色を用いて細胞周期の解析を行った。RTE により、Sub-G1 細胞が 2.76%から 50.0%に増加した(図 13 A)。このことより RTE による Sub G1 期の蓄積はアポトーシスが生じていたことが示唆された。また、G1、S、G2 期の細胞を分析した結果、RTE により、G1 期細胞が 47.1%から 28.4%に、S 期細胞が 15.8%から 6.39%に、G2 期細胞が 29.2%から 12.1%に減少することが明らかになった(図 13 B)。よって本実験から、RTE が細胞内で DNA 断片化を誘導する可能性があるが、細胞周期停止は誘導しないことが示唆された。

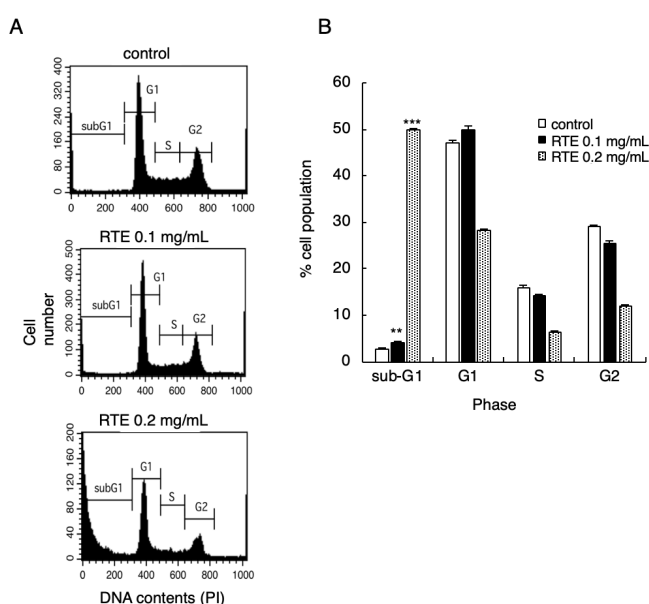


図 13. RTE は Sub-G1 期細胞の増加を誘導したが、細胞周期停止は起こらなかった

A: Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、PI で DNA を染色しフローサイトメトリーによって各細胞周期細胞を検出した。3 つの独立した測定値のいずれかの代表的なヒストグラムを示した。B: 各周期における細胞の割合は、チャートグラフで示された。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値 ±SD を示す。\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 vs. untreated cells.

### 2-3-3. フローサイトメトリーによる PS の検出

2-3-2 の結果より、RTE による Sub G1 期の増加が生じていたことは、DNA 断片化を引き起こした可能性がある。そこで、RTE 誘導細胞死におけるアポトーシスの関与を検討した。

健康な細胞の表面は、細胞膜の内側と外側のリーフレットに非対称に分布している脂質で構成されている。しかし、アポトーシスが誘導されると脂質の非対称性が失われ、細胞膜の構成成分であるリン脂質の一種、PS が細胞膜の内側から外側に露出することが明らかとなっている (99)。蛍光標識されたカルシウム結合タンパク質である annexin-V はアポトーシス細胞の外側に露出している PS を検出できるが、ネクローシス細胞も染色できる。PI はネクローシス細胞を染色できるが、アポトーシス細胞から除外されるため、annexin-V と PI の二重染色をすることで、アポトーシス細胞とネクローシス細胞を区別することができる (図 14 A)。annexin-V と PI の二重染色により、フローサイトメトリーを用い、アポトーシス細胞およびネクローシス細胞の検出、定量することが可能である (図 14 B) (109)。

Jurkat 細胞に、RTE を 24 h 作用させた。作用終了後、FITC-annexin-V 及び PI 染色し、フローサイトメーターで FITC と PI の蛍光変化を測定した。結果として、RTE により前期アポトーシス細胞の割合は 2.38%、2.00%、3.85% 及び 11.3% になった。後期アポトーシス/ネクローシス細胞の割合は 2.68%、4.45%、8.61% 及び 19.1% になった。よって 24 h 作用させた RTE は PS の露出を濃度依存的に増加したことが示唆された (図 15 A)。

さらに、RTE は後期アポトーシス/ネクローシス細胞の割合の有意的な増加を誘導したため、より短い作用時間で 0.2 mg/mL RTE の効果を検討した。結果として、RTE により前期アポトーシス細胞の割合は 2.05%、2.05%、6.79%、14.0% 及び 9.50% になった。後期アポトーシス/ネクローシス細胞の割合は 1.54%、2.40%、2.78%、4.09% 及び 3.65% になった。よって 0.2 mg/mL 作用させた RTE は PS の露出を時間依存的に増加させることが示唆された (図 15 B)。

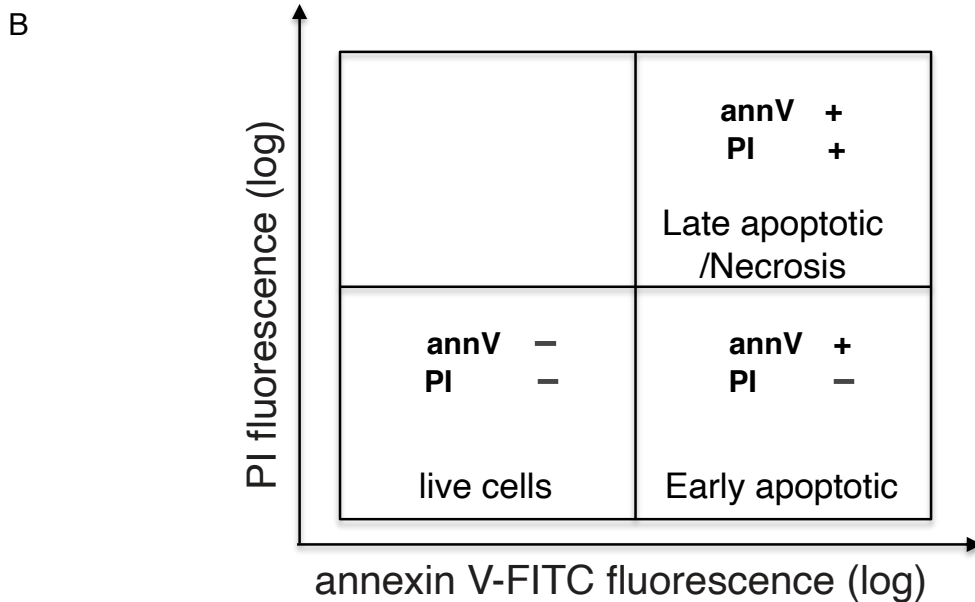
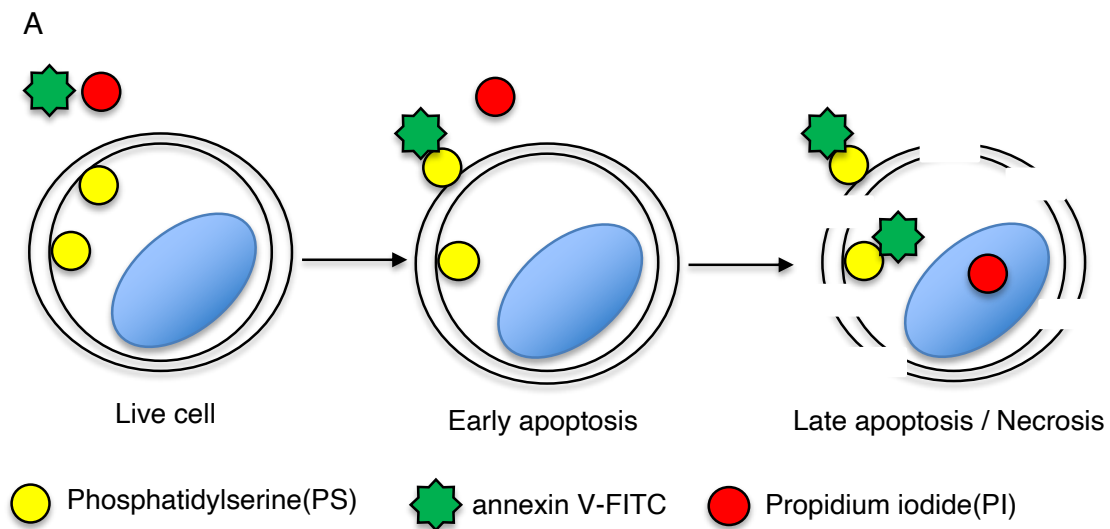
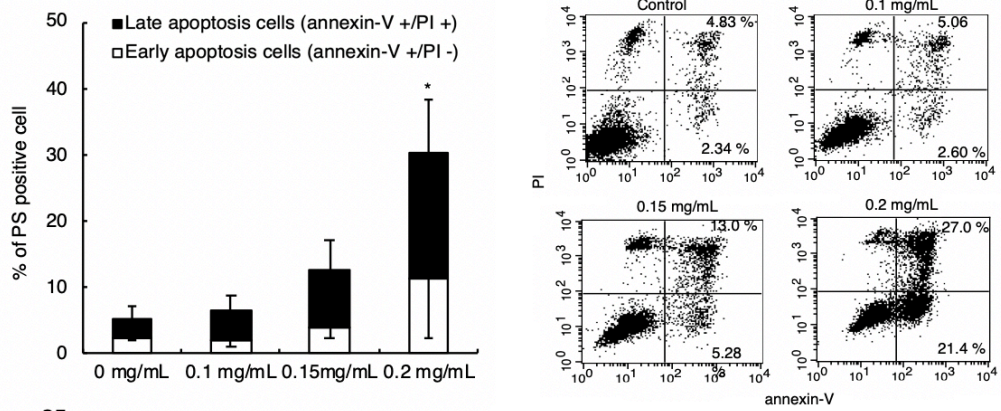


図 14. annexin-V と PI の二重染色による細胞死の測定

A: annexin-V と PI の二重染色プロセスである。 B: FACS Calibur を用いた解析では、annexin V と PI のいずれにも染まらない生細胞は左下に表示される。annexin V のみに染まる前期アポトーシス細胞は右下に表示される。annexin V および PI の両方に染まる後期アポトーシス細胞/ネクローシス細胞は右上に表示される。

A



B

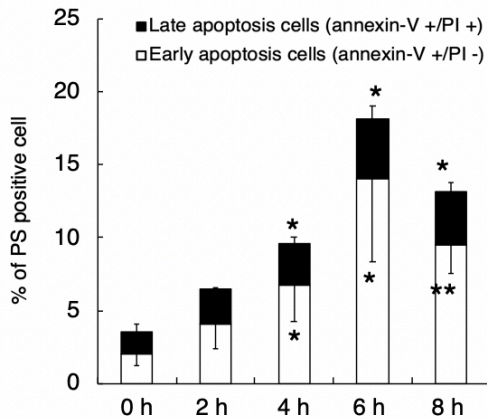


図 15. RTE は PS の露出を増加させた

A: Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、細胞を annexin-V と PI で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。3 つの独立した測定値のいずれかの代表的なドットプロットを表示した。白い棒グラフは、早期アポトーシス細胞の割合 (annexin-V + / PI-) を表し、負方向のエラーバーのみを表した。黒い棒グラフは、検出された後期アポトーシス細胞 (annexin-V + / PI +) の割合を表し、正方向のエラーバーのみを表した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。\* $p < 0.05$  vs untreated cells. B: Jurkat 細胞に RTE を 0.2 mg/mL 作用させた。その後、細胞を annexin-V と PI で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。3 つの独立した測定値のいずれかの代表的なドットプロットを表示した。白い棒グラフは、早期アポトーシス細胞の割合 (annexin-V + / PI-) を表し、負方向のエラーバーのみを表した。黒い棒グラフは、検出された後期アポトーシス細胞 (annexin-V + / PI +) の割合を表し、正方向のエラーバーのみを表した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. untreated cells.



#### 2-3-4. 蛍光顕微鏡による細胞形態変化の観察

アポトーシスの形態的特徴には、細胞膜の変性、細胞質の収縮、クロマチン凝縮、クロマチン断片化、複数の分離体の断片化、及びアポトーシス小体の形成が含まれる。RTEによりPSの露出を増加したことから、さらに細胞の形態を検討した。蛍光染色として、特にDNAとの特異的結合により、核の状態の確認に使用されるHoechst 33342（細胞膜透過性青色色素）およびPI（細胞膜非透過性赤色色素）で染色し、蛍光顕微鏡を用い、細胞核の状態を観察した(110)。RTEを24 h作用させたところ、蛍光顕微鏡検査により、細胞核全体が青色に染色され、小さな青色蛍光を持っているバブルが観察されたことから、クロマチン凝縮が発生したことが示唆された。RTEを0.2 mg/mL作用させたところ、PIによって核が赤く染色され、細胞の腫脹が発生した（図 16）。これは、膜の完全性が失われ、ネクローシス細胞死も発生したことを示唆している。

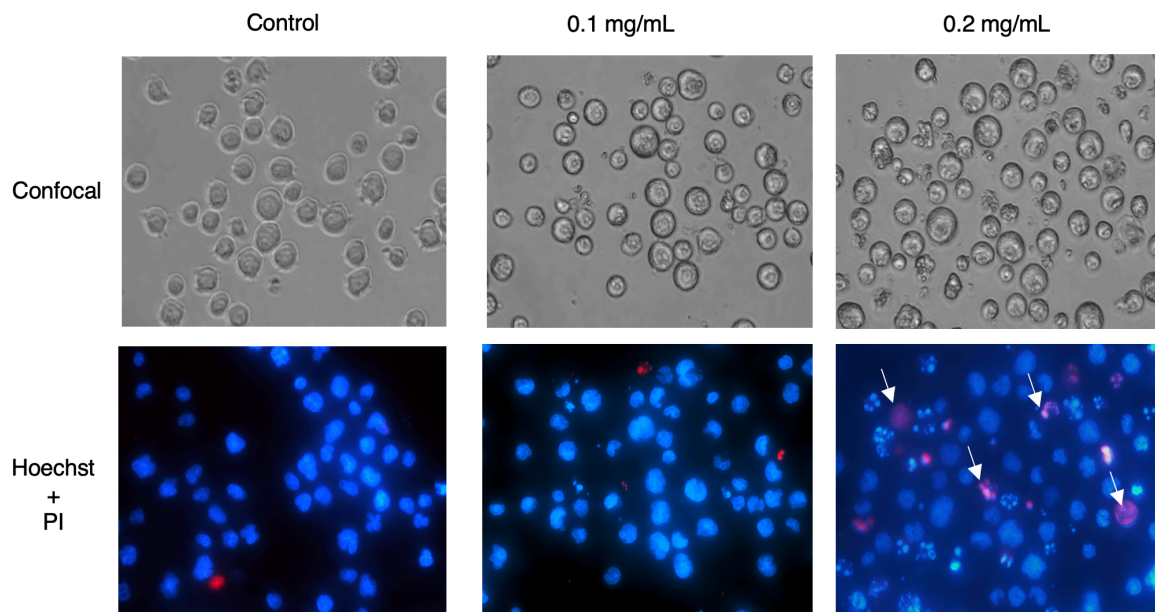


図 16. RTE による細胞形態の変化

Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、PI と Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡により核の状態を観察した。矢印は、膜崩壊した PI 染色細胞を示している。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

### 2-3-5. DNA ladder 法による DNA 断片化の検出

DNA 断片化はアポトーシスの重要な特徴の一つである。DNA ladder 法は、アポトーシス中に発生するヌクレオソーム単位での DNA 断片化の「DNA ladder」パターンの存在を使用している(111)。結果として、スタウロスポリンにより DNA のラダー状の断片化と比べ、RTE による DNA のラダー状の断片化が起こらなかった (図 17)。

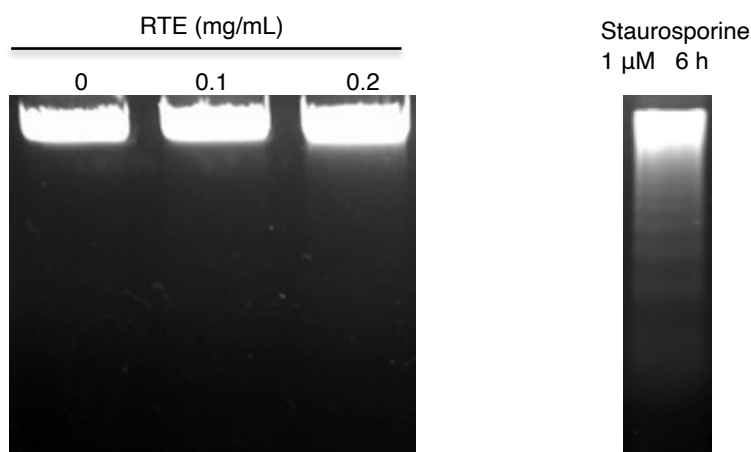


図 17. RTE はラダー状の DNA 断片化を誘導しない

Jurkat 細胞に RTE 24 h またはスタウロスポリンを作用させた後、DNA を回収し、アガロースゲルで電気泳動した。ゲルは、紫外線下で臭化エチジウム染色を使用して視覚化された。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

### 2-3-6. TUNEL 法による DNA 断片化の検出

TUNEL 法とは、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) により、切断された DNA 鎖の 3'-OH 末端にデオキシヌクレオチドアナログ (dUTP) を結合させて、切断された DNA 鎖を検出する方法である。TUNEL 法は最も感度が高く、切断された DNA 鎖を直接検出できる (112)。従って、TUNEL 法を実行して、RTE が DNA 断片化を誘導するかどうかを確認した。RTE により、dUTP 陽性細胞がわずかに増加したことを示した (図 18)。

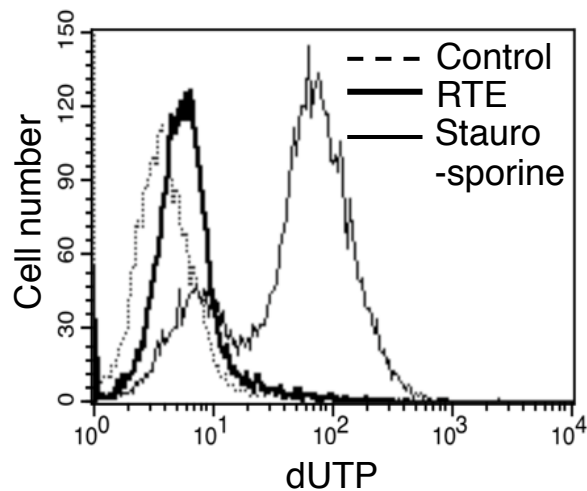


図 18. RTE は DNA 断片化をわずかに誘導する

Jurkat 細胞に 0.2 mg/mL RTE 24 h または 1 $\mu$ M スタウロsporin で 4 h を作用させた後、DNA の断片化は、TUNEL アッセイを用いてフローサイトメトリーによって分析した。3 つの独立した測定値のいずれかの代表的なヒストグラムを示した。

#### 2-3-7. Western Blot 法によるカスパーゼ及び PARP-1 開裂の検出

エフェクターカスパーゼの開裂もアポトーシスの重要な特徴の一つである。Western Blot を用い、エフェクターカスパーゼの開裂および核の修復酵素である PARP-1 の開裂を確認した (113)。図 19 より、RTE を 24 h 作用させた後、Jurkat 細胞に対し、カスパーゼ-7 開裂と PARP-1 開裂が観察されたが、カスパーゼ-3 の開裂は観察されなかったことから、RTE がカスパーゼ-7 を介したアポトーシスを誘導することが推察された。

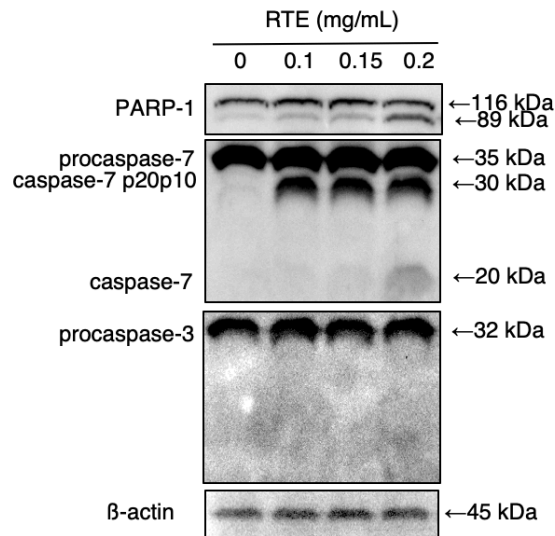


図 19. RTE によるカスパーゼ-7 及び PARP-1 の開裂

Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 2-3-8. Western Blot 法によるカスパーゼ-3、-7 及び PARP-1 開裂の時間依存変化検出

RTE はカスパーゼ-3、-7 をまず誘導するのかを検討するため、0.2 mg/mL RTE を用い、0-12 h で Western blot を行った。結果として、0.2 mg/mL RTE を 0-12 h 作用させると、カスパーゼ-7 及び PARP-1 の開裂が 4 h から開裂し、カスパーゼ-3 の開裂が観察されなかった (図 20)。これらの結果は、RTE はカスパーゼ-7 の開裂を介してアポトーシス様細胞死を誘導することが推察された。

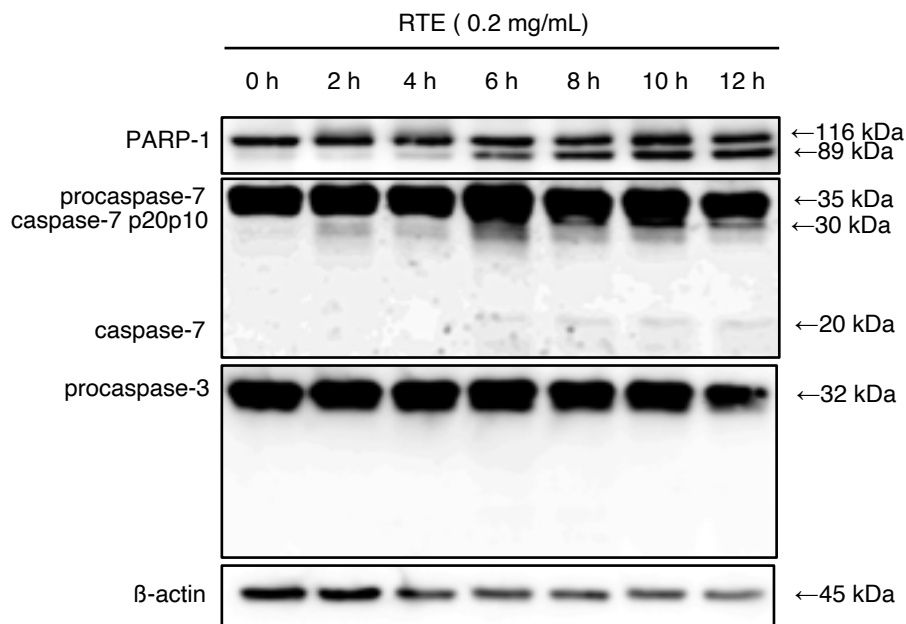


図 20. RTE によるカスパーゼ-7 の及び PARP-1 の開裂

Jurkat 細胞に RTE を 0-12 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 2-3-9. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE によるカスパーゼ開裂を抑制した

アポトーシスのシグナル伝達経路には外因性経路と内因性経路がある。外因性経路では、イニシエーターカスパーゼカスパーゼ -8 が開裂することで、エフェクターカスパーゼカスパーゼであるカスパーゼ -3 及び-7 が切断され活性化する。また、内因性経路では、イニシエーターカスパーゼカスパーゼ -9 が開裂することで、エフェクターカスパーゼカスパーゼであるカスパーゼ -3 及び-7 が切断され開裂する (18)。

図 20 の結果から、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死にカスパーゼが関与していることを示したことから、汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を用い、RTE が誘導するカスパーゼ開裂の変化を検討した。RTE を 24 h 作用させると、カスパーゼ-7 p20p10、カスパーゼ-8 p41、カスパーゼ-9 p35 の開裂は Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB によって有意に抑制され、PARP-1 の切断は部分的に抑制された (図 21)。

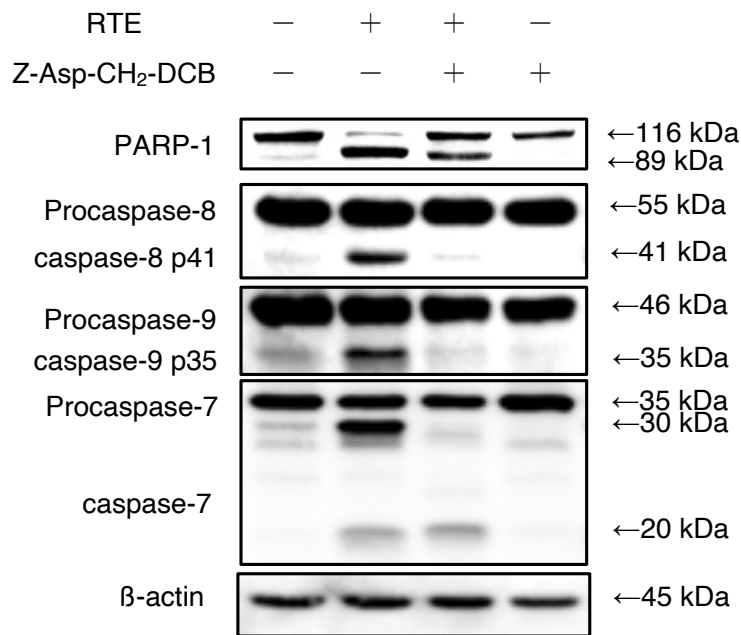


図 21. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE によるカスパーゼの開裂を抑制した

Jurkat 細胞に 50 μM Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を 1 h 作用させた後、0.2 mg/mL RTE を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、-8、-9、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 2-3-10. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による Sub-G1 期の増加を抑制した

RTE によるカスパーゼ開裂と Sub-G1 期の増加の関与を検討するため、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を用いて Sub-G1 期の解析を行った。結果として、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による Sub-G1 期の増加を抑制し、50.0 %から 14.1 %に減少した (図 22)。

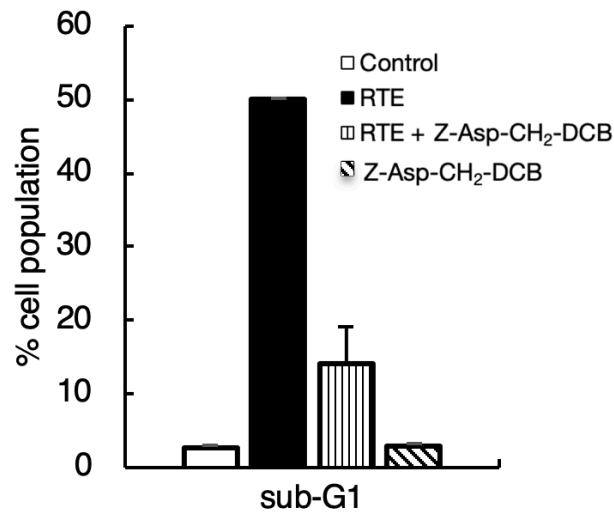


図 22. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による Sub-G1 期の増加を抑制した  
 Jurkat 細胞に 50  $\mu$ M Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を 1 h 作用させた後、0.2 mg/mL RTE を 24 h 作用させた。  
 その後、PI で DNA を染色しフローサイトメトリーによって Sub-G1 期を検出した。Sub-G1 期の割合  
 は、チャートグラフで示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。

#### 2-3-11. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による PS の露出増加を抑制した

RTE によるカスパーゼ開裂と PS の露出増加の関与を検討するため、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を用いて PS の変化を解析した。

Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による PS の露出の増加を抑制し、早期アポトーシス細胞率は 20.8% から 10.6% に減少し、後期アポトーシス細胞率/ネクローシス細胞率は 8.20% から 5.30% に減少した(図 23)。

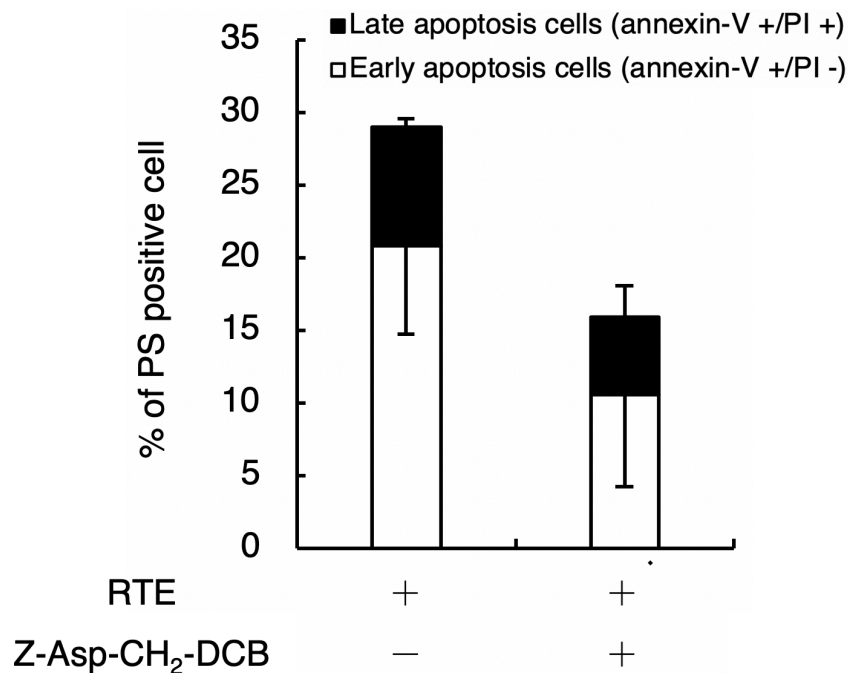


図 23. Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE による PS の露出増加を抑制した

Jurkat 細胞に 50  $\mu$ M Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を 1 h 作用させた後、0.2 mg/mL RTE を 24 h 作用させた。その後、細胞を annexin-V と PI で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。白い棒グラフは、早期アポトーシス細胞の割合 (annexin-V + / PI-) を表し、負方向のエラーバーのみを表した。黒い棒グラフは、検出された後期アポトーシス細胞 (annexin-V + / PI +) の割合を表し、正方向のエラーバーのみを表した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。

#### 2-3-12. MCF-7 細胞に対する RTE の細胞傷害検討

カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 はアポトーシスの実行段階に活性化する。カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は、触媒ドメイン全体で 57% の配列相同性を有しているが、機能的には異なることが報告されている (34)。RTE はカスパーゼ-7 の開裂を誘導し、カスパーゼ-3 の開裂を誘導しないことから、RTE 誘導アポトーシス様細胞死がカスパーゼ-3 に依存しないのかを検討するため、カスパーゼ-3 欠損したヒト乳がん MCF-7 細胞を用い、MTT assay を行った。結果として、RTE は MCF-7 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした (図 24)。MCF-7 細胞に対し、RTE の IC<sub>50</sub> 値は 0.32 mg/mL であった。この結果から、RTE は MCF-7 細胞に対し、細胞傷害性を示すことが明らかになった。



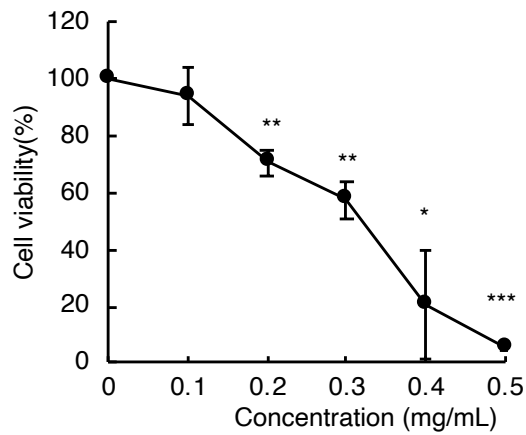


図 24. RTE は MCF-7 細胞に対して細胞傷害性を示す

MCF-7 細胞に RTE を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値±SD である。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. untreated cells.

### 2-3-13. MCF-7 細胞に対する RTE のカスパーゼ開裂の検出

RTE は MCF-7 細胞に対してカスパーゼの開裂を誘導するかどうかを検討するため、Western Blot を用い、カスパーゼおよび PARP-1 の切断を確認した。図 25 より、RTE を 24 h 作用させた後、MCF-7 細胞に対し、カスパーゼ-7、-8、及び-9 と PARP-1 開裂が観察された。

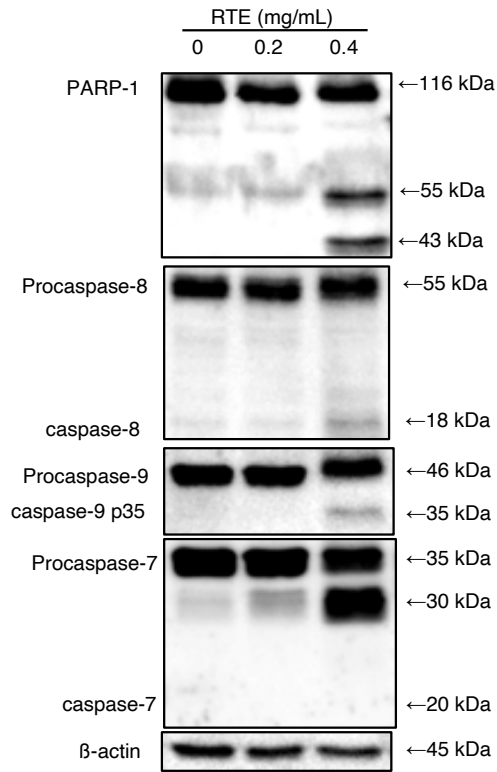


図 25. RTE は MCF-7 細胞に対してカスパーゼ及び PARP-1 の開裂を誘導する  
MCF-7 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

## 2.4. 考察

RTE を作用させると Jurkat 細胞に対してカスパーゼ-3 非依存的アポトーシス様細胞死を誘導する。本実験の結果、RTE は Jurkat 細胞に対し、有意的な細胞傷害性を持っていることが示唆された。

さらに、RTE は細胞周期の停止を誘導しなかったことから、アポトーシスの関与を確認するため、アポトーシスの特徴として PS の露出、DNA の断片化及びカスパーゼの開裂を検討した。図 15 を示したように、RTE は PS の露出を時間依存的に増加させ、アポトーシスを誘導する可能性が示された。

図 13 および図 16 に示したように、RTE は Sub-G1 細胞の増加とクロマチン凝縮を誘発したが、アポトーシス小体を検出したが、数が多くなかった。さらに、アガロースゲル電気泳動を用い、ヌクレオソーム単位での DNA 断片化を確認した結果、RTE によりヌクレオソーム単位での DNA 断片化は確認されなかった。TUNEL 法を用い、DNA のラダー状を

形成する前の DNA 鎖の切断を確認した結果、RTE は、スタウロsporin のように多数の DNA 鎖を切断せず、DNA 鎖を切断していることが明らかになった。これらの結果は、RTE は細胞の収縮と核の凝縮を誘発するが、ヌクレオソーム単位での DNA の断片化は誘発せず、高分子での DNA 断片化を誘導する可能性があることから、RTE は典型的なアポトーシスを誘発せず、アポトーシス様細胞死を誘発する能力を持つことが示された。“Sub-G1 期”細胞とは、G1 期細胞の DNA 含有量よりも低い DNA 含有量の細胞であり、アポトーシス細胞数を推定できる可能性があることが報告されているが、Sub-G1 期の増加だけでアポトーシスを誘導していることを証明するには不十分であり、DNA ladder や TUNEL 法による確認が必要である。また、Mattes は、Sub-G1 期の測定ではアポトーシス細胞とネクローシス細胞を区別できないことを報告している (114)。RTE はヌクレオソーム単位での DNA の断片化は誘発せず、少数の DNA 鎖の切断を誘導することにより、Sub-G1 期の増加を引き起こすことで、典型的なアポトーシスとは異なるアポトーシス様細胞死を誘導することが示された。

図 19 及び図 20 に示したように、RTE はカスパーゼ-3 を開裂させず、カスパーゼ-7 のみを開裂させ、PARP-1 の開裂を誘導した。主要なアポトーシス誘導エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ-3 はヌクレオソーム単位での DNA 断片化を誘導する。また、図 17 及に示したように、RTE は DNA のラダー状の断片化を起こさなかった。これは、RTE はカスパーゼ-3 を開裂させないため、ICAD を開裂させず、DNA のラダー状の断片化が起こらなかったと考えられる。Leicht は、カスパーゼ-7 の開裂を検出したが、カスパーゼ-3 は開裂せず、DNA のラダー状の断片化は起こらず、アポトーシスとネクローシスを同時に誘導していたことを報告した (115)。これらの報告は、本研究の結果に似ている。また、PARP-1 は DNA の損傷に伴って開裂するため、RTE は DNA 損傷を行うことが示された。

以上の結果より、RTE はカスパーゼ-7 を開裂させ、高分子での DNA 断片化と DNA 損傷を誘導したことが示された。また、RTE は典型的なアポトーシスを誘導せず、ヌクレオソーム単位での DNA の断片化を誘発しないため、カスパーゼ-3 非依存的アポトーシス様細胞死を誘導していると推測される。

汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB を用い、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死におけるカスパーゼへの関与を検討した。汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE が誘導するカスパーゼ-7 p20p10、-8 p41、-9 p35 及び PARP-1 の開裂を抑制したことを示した。RTE が誘導するカスパーゼの開裂部位は Edelman と Sawai が発見したカスパーゼの開裂部位が一致していて、及び汎カスパーゼ阻害剤はカスパーゼ-7 p20p10、カスパーゼ-8 p41、カスパーゼ-9 p35 開裂を抑制できることも一致している (39、116)。ただし、汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は PARP-1 の開裂を完全に抑制できないことから、RTE はカスパーゼ-7 を介して PARP-1 の開裂を誘導することを示したが、他の PARP-1 の開裂誘導因子としてアポトーシス誘導因子 (AIF) が PARP-1 の切断を誘導している可能性がある (113、117)。汎カスパーゼ阻害剤は RTE が誘導する Sub-G1 期の増加を抑制したことから、RTE

はカスパーゼ-7 を開裂させ、DNA 鎖の切断を介し、Sub-G1 期の増加を誘導することが明らかになった。そして、汎カスパーゼ阻害剤は RTE が誘導する PS 露出の増加を抑制したことから、RTE はカスパーゼ-7 の開裂を介し、PS 露出を誘導することが明らかになった。これらの結果から、汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE が誘導するアポトーシス様細胞死を抑制し、このカスパーゼ開裂が RTE 誘導アポトーシス様細胞死に重要な役割を果していることが示唆された。

MCF-7 細胞はカスパーゼ-3 が欠損している接着細胞であり、アポトーシス誘導シグナルに敏感ではない傾向があるが、その IC<sub>50</sub> 値は浮遊細胞の Jurkat 細胞の IC<sub>50</sub> 値と有意な差がないことから、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死にはカスパーゼ-3 が関与していないことが示された。従って、図 26 に示したように、RTE は Jurkat 細胞に対して、カスパーゼ-7 依存的アポトーシス様細胞死を誘導することが示された。

図 21 に示したように、カスパーゼ-8、-9 の開裂を検出した結果、RTE はアポトーシスの外因性経路及び内因性経路に関与していることが示された。しかし、RTE によるアポトーシス誘導経路が外因性か内因性のどちらが主流であるかを解明することが必要である。

カスパーゼ-3 が主要なアポトーシス関連エフェクターカスパーゼであり、何か薬剤がカスパーゼ-3 を開裂させ、アポトーシスを誘導する報告が多い (41)。一方で、カスパーゼ-3 を開裂せず、カスパーゼ-7 を介してアポトーシスを誘導する研究が非常に珍しい。RTE はカスパーゼ-3 を開裂させなかったため、RTE の成分の一つがカスパーゼ-3 開裂の阻害剤として作用する可能性があることを予想される。そして、RTE によるヌクレオソーム単位での DNA 断片化を誘導しないことは、RTE がカスパーゼ-3 を開裂させないため、DNA 断片化が誘導されない、または RTE の成分の一つがヌクレオソーム単位での DNA 断片化を抑制している可能性があると考えている。例えば、ショウガ科ショウガ属多年草であるウコンの根茎より得たエタノール抽出物であるクルクミンはヌクレオソーム単位での DNA 断片化を阻害することが報告されている (112)。また、RTE はどのような経路により、カスパーゼ-7 を介して、アポトーシス様細胞死を誘導したのかを検討することが必要である。例えば、中薬として使用されているセンシンレンの葉と茎から単離させたアンドログラフォライド (Andrographolide) はカスパーゼ-3 を開裂せずに、ROS-ERK-p53-カスパーゼ-7-PARP 経路のような特別な経路により、アポトーシスを促進する (118)。

従って、RTE はカスパーゼ-7 を介してアポトーシス様細胞死を誘導することが示された。

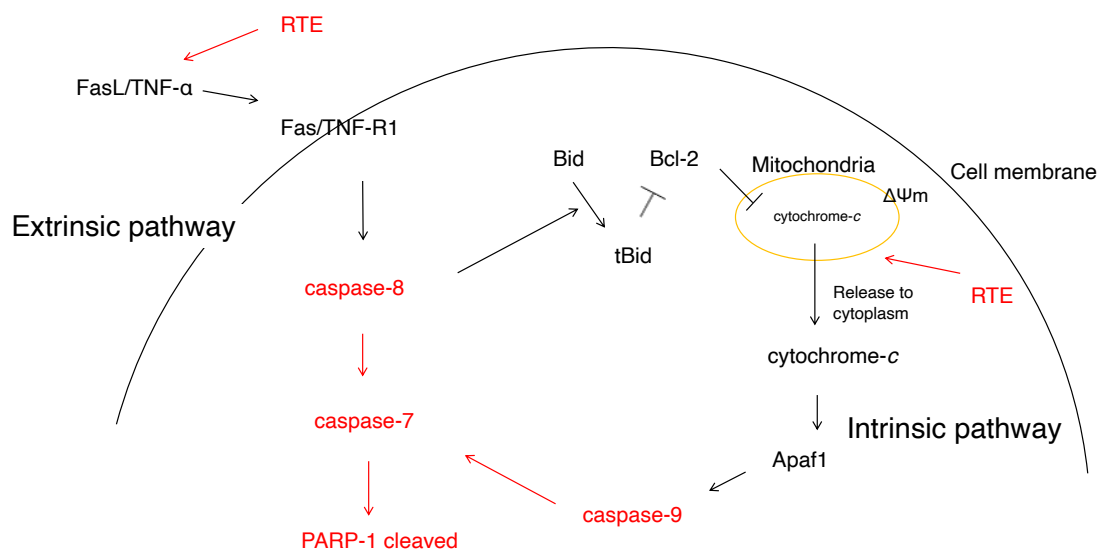


図 26. RTE は Jurkat 細胞に対して、カスパーゼ-7 依存的アポトーシス様細胞死を誘導する  
RTE は Jurkat 細胞に対して、カスパーゼ-8 及びカスパーゼ-9 を開裂させ、カスパーゼ-7 を開裂させ、  
PARP-1 の開裂を誘導する。

## 第3章 RTE 誘導アポトーシス様細胞死におけるミトコンドリアの関与

### 3-1. 背景

アポトーシス誘導には 2 つの主要な経路として、外因性経路と内因性経路がある。ただし、これらの 2 つの経路は相互に関連しており、1 つの経路のシグナルが別の経路に影響を与える可能性がある (119)。様々な非受容体媒介刺激によってミトコンドリアの膜透過性を亢進させ、ミトコンドリアから細胞質にアポトーシス誘導タンパク質であるシトクロム *c* を放出させた後、Apaf-1 と複合体を形成し、カスパーゼ-9 開裂を引き起こし、カスパーゼ-3 及び-7 などの下流のカスパーゼを切断し活性化させることが明らかになっている。Bcl-2 ファミリータンパク質はミトコンドリアの膜透過性を制御することでシトクロム *c* の放出を抑制し、アポトーシスを抑制する (120)。前章の結果から、RTE は外因性経路と内因性経路の両方が関与している可能性があることが示された。そこで、RTE によるアポトーシス誘導経路が外因性か内因性のどちらが主流であるか、Bcl-2 過剰発現株 Jurkat (Bcl-2) を用いて検討した。

### 3-2. 方法

#### 3-2-1 細胞培養

実験に用いた Jurkat 細胞の培養は 2-2-1.項に詳述した。Jurkat (Bcl-2)細胞も Jurkat 細胞と同様の方法で培養した。

#### 3-2-2 MTT assay

$2 \times 10^5$  cells/mL に調製した Jurkat 細胞及び Jurkat (Bcl-2)細胞を 96 穴プレート (BD falcon) に 0.1 mL ずつ分注後、RTE を添加し、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 h 作用させた。作用終了の 1 h 前に 5 mg/mL の 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 溶液 (MTT) 試薬 (Wako) を各ウェルに 10  $\mu$ L ずつ添加した。最後に、上清を除去し、100  $\mu$ L の DMSO を加えて MTT ホルマザンを溶解した。マイクロプレートリーダー (Awareness Technology) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

### 3-2-3 フローサイトメーター

ミトコンドリア膜電位を測定する際は、 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞及び Jurkat (Bcl-2)細胞に RTE 0.2 mg/mL または positive control としてミトコンドリア脱共役剤である 10  $\mu$ M カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン(CCCP、Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 30 min 作用させた後、リン酸生理緩衝液(PBS)によって、5 min、4 °C、1200 rpm で 2 回遠心洗浄を行い上清を除去した。作用終了の 15 min 前に、培地に 100 nM 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6)(Molecular Probes, Eugene, USA)を添加した。ナイロンメッシュに通してフローサイトメーターで DiOC6 の蛍光を測定した。Cell Quest ソフトウェアを用い、結果を分析した。

### 3-2-4 Western Blot 法

$2 \times 10^6$  cells を 10mL に調製した Jurkat 細胞及び Jurkat (Bcl-2)細胞に RTE を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。Lysis buffer [50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA (Dojindo) , 1% protease inhibitor cocktail (Sigma)、pH7.5] を加えて、20min 氷冷した。氷冷後、4 °C、13000 rpm で 15min 遠心し、上清を回収した。ビスニコニン酸 (BCA) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois)にてタンパク量を 2.0 mg/ml に調製した 20  $\mu$ l Cell Lysate と 20  $\mu$ l Sample Application buffer (10 % SDS (Wako) , 125 mM Tris , 20 % glycerol, bromo phenol blue, 5 % 2-mercaptoethanol, pH 6.8)を混合したサンプルを 100 °Cで 3 min 加熱処理した。また分子量確認のために 20  $\mu$ L Molecular Protein Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 20  $\mu$ L Lysis buffer, 40  $\mu$ L Sample Application buffer を混合した分子量マーカーを 100 °Cで 3 min インキュベートした。サンプルはドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した。SDS-PAGE には分離用ゲルとして 15 %アクリルアミドゲルを用い、濃縮用ゲルは 4 %を用いた。ゲルを泳動槽に固定し、Electrode buffer (25 mM Tris, 186 mM Glycine, 3 mM SDS)を注いだ。ゲルのウェルに各サンプルを 20  $\mu$ L ずつ入れ、50 V で 30 min、その後 100 V で 90 min 泳動を行った。泳動終了後、ゲルを取り出し、Blotting buffer [48 mM Tris, 39 mM Glycine, 1.3 mM SDS, 20 % メタノール (Wako) ]に浸した。また、親水処理はポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレン(Bio-Rad)をメタノールに 0.5 min、Milli Q 水に 3 min、Blotting buffer に 3 min の順に浸し、ろ紙 (Macherey-Nagel, Düren, Germany)を Blotting buffer に浸した。転写装置(Bio Craft, Tokyo, Japan)にろ紙 2 枚、ゲル、PVDF メンブレン、ろ紙 2 枚の順に積み重ね、30 min 転写を行った。転写終了後、PVDF メンブレンをスキムミルク原液

[3 % スキムミルク粉末(Yukijirushi, Tokyo, Japan), 0.1 %  $\text{NaN}_3$  (Wako)]に浸し、室温で 1 h ブロッキング操作を行った。その後、スキムミルク希釈液[1/10 スキムミルク原液, 0.1 % Tween-20 (Wako) , 0.1 %  $\text{NaN}_3$ ]に移し換え、PVDF メンブレンをビニール袋に移し、室温で 30 min ブロッキング操作を 2 回行った。PVDF メンブレンをビニール袋に移し、一次抗体液を入れ、4 °Cで一晩抗体反応させた。使用した一次抗体は、カスパーゼ-7 (Cell Signaling Technology)、-8 (Cell Signaling Technology)、-9 (Santa Cruz Biotechnology)、及び  $\beta$ -actin (Cell Signaling Technology) (すべての抗体は Tween-20-PBS で 1 : 1000 に希釈された)。反応後、一次抗体液を回収し、PVDF メンブレンを 0.1 % Tween-20-PBS で 5 min、3 回洗浄した。二次抗体 HRP-labeled anti-rabbit IgG secondary antibody または HRP-labeled anti-mouse IgG secondary antibody (Cell Signaling Technology)を Tween-20-PBS で 1:2000 の割合に希釈し抗体反応させ、PBS で 5 回洗浄した。洗浄終了後、Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) を 1 min 作用させ、Image Quant LAS 4000(GE Healthcare Life Sciences, Tokyo, Japan)によってタンパク質を検出した。

### 3-2-5 統計解析

GraphPad Prism7 (GraphPad, San Diego, CA)を用いて、Kolmogorov-Smirnov 法によりデータの正規分布を確認した。有意差検定には Student's t-test を用いて行い、検定の結果が  $p < 0.05$  であるとき、統計的に有意であるとみなした。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. Jurkat(Bcl-2)細胞に対する RTE の細胞傷害検討

アポトーシスの内因性経路またはミトコンドリア経路では、 $\Delta\Psi_m$  が低下し、シトクロム *c* が放出され、Apaf-1 に結合し、カスパーゼ-9 活性化を引き起こす。活性化されたカスパーゼ-9 は、カスパーゼ-3 及び-7 などの下流のカスパーゼを切断し活性化させることが知られている。抗アポトーシス Bcl-2 タンパク質はミトコンドリア外膜に存在し、アポトーシスを抑制する。

RTE の細胞傷害におけるミトコンドリアの関与を検討するため、ミトコンドリア局在 Bcl-2 の過剰発現の Jurkat(Bcl-2)細胞を用い、MTT assay を行った。結果として、RTE は Jurkat(Bcl-2)細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こし、細胞傷害性は有意に低下しないことが示された (図 27)。Jurkat(Bcl-2)細胞に対し、RTE の  $\text{IC}_{50}$  値は 0.18 mg/mL である。この結果から、Bcl-2 過剰発現は RTE の細胞毒性を抑制しないことが示された。



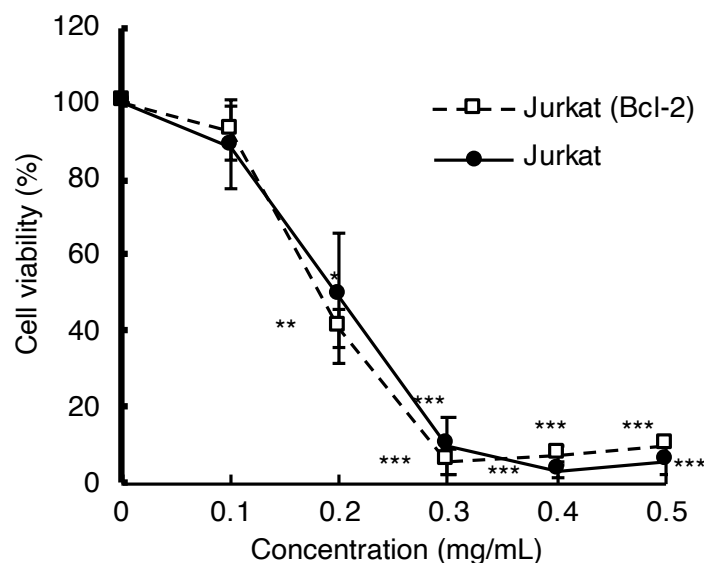


図 27. RTE の細胞傷害は Bcl-2 によって抑制されない

Jurkat(Bcl-2)細胞及び Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値±SD である。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs untreated cells.

### 3-3-2. RTE が誘導するミトコンドリアの膜電位の変化の検出

$\Delta\Psi_m$  は、ミトコンドリア機能の重要な指標の一つである。 $\Delta\Psi_m$  低下は、アポトーシス促進シグナルの開始を反映し、ミトコンドリア膜の完全性の喪失を示唆している。RTE は  $\Delta\Psi_m$  低下を誘導するかどうかを検討するため、ミトコンドリアに蓄積する DiOC6 及び Jurkat (Bcl-2)細胞を用い、 $\Delta\Psi_m$  の変化をフローサイトメトリー分析で検討した (120)。結果として、Jurkat 細胞および Jurkat (Bcl-2) 細胞に対し、 $\Delta\Psi_m$  は 0.2 mg / mL で RTE を 30 min 作用させると、低下した (図 28)。この結果から、Bcl-2 過剰発現は RTE が誘導する  $\Delta\Psi_m$  低下を抑制しないことが示された。

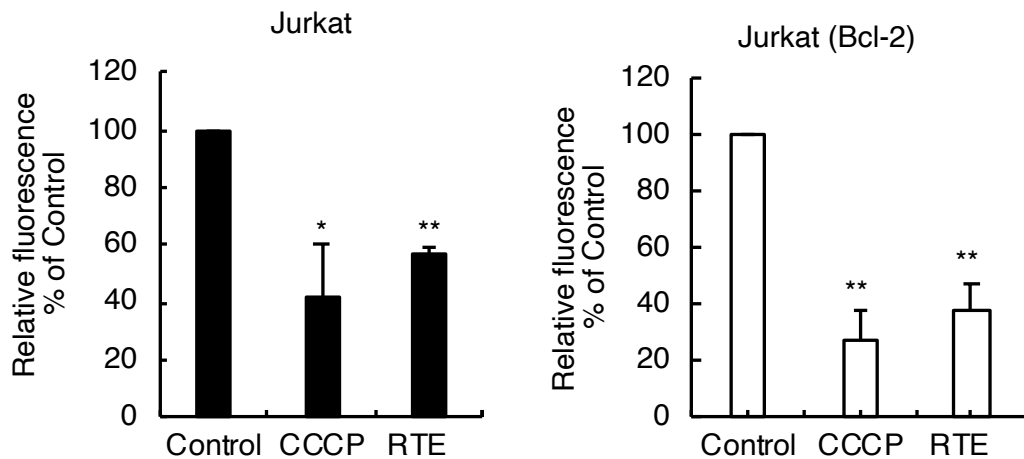


図 28. RTE は Jurkat 細胞及び Jurkat(Bcl-2)細胞に対して  $\Delta \Psi_m$  低下を引き起こした Jurkat(Bcl-2)細胞及び Jurkat 細胞に 0.2 mg/mL RTE または 10  $\mu$ M CCCP で 30 min を作用させた後、 $\Delta \Psi_m$  は、DiOC6 を用いてフローサイトメトリーによって分析した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs untreated cells.

### 3-3-3. RTE が誘導するカスパーゼ-7 開裂の検出

アポトーシスの内因性経路を介して活性化されたカスパーゼ-9 は、下流であるカスパーゼ-7 を切断し活性化させる。RTE が誘導するカスパーゼ-7 開裂の変化を検討するため、Jurkat (Bcl-2)細胞を用い、Western blot を行った。0.2 mg / mL RTE を 24 h 作用させると、Jurkat 細胞および Jurkat (Bcl-2) 細胞に対してカスパーゼ-7 を開裂したことが示された (図 29)。これらの結果は、Bcl-2 過剰発現は RTE が誘導するカスパーゼ-7 の開裂を抑制しないことが示された。

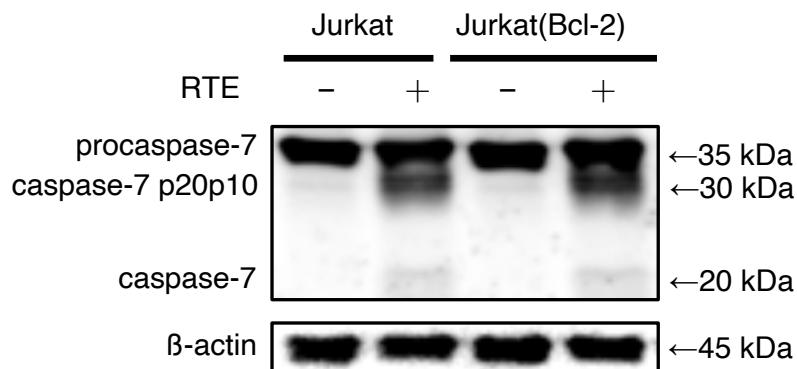


図 29. RTE は Jurkat(Bcl-2)細胞に対してカスパーゼ-7 の開裂を誘導した Jurkat(Bcl-2)細胞及び Jurkat 細胞に RTE を 24 h 作用させ、Western blot を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-7 開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

### 3-3-4. RTE が誘導するカスパーゼ-8 及び-9 開裂の検出

RTE はどのアポトーシス経路をまず誘導するのかを検討するため、0.2 mg/mL RTE を用い、0-12 h で Western blot を行った。結果として、0.2 mg / mL RTE を 0-12 h 作用させると、カスパーゼ-8 が 4 h から開裂し、12 h まででカスパーゼ-9 の開裂は観察されなかった (図 30)。しかし、図 21 からカスパーゼ-9 の開裂は 24 h で観察されたことから、RTE はカスパーゼ-8 の開裂を介してカスパーゼ-9 の開裂を誘導していることが推察された。

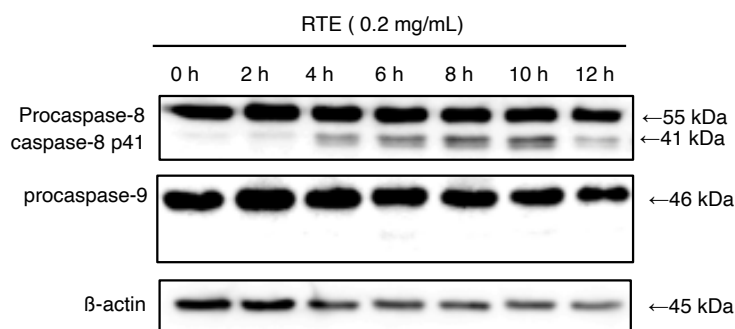


図 30. RTE は 0-12 h でカスパーゼ-8 の開裂を誘導した Jurkat 細胞に 0.2 mg/mL RTE を 0-12 h 作用させ、Western blot を行った。得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-8 及び-9 開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

### 3-3-5. HepG2 細胞に対する RTE の細胞傷害検討

RTE は他のがん細胞に対して、カスパーゼ-3 ではなく、カスパーゼ-7 のみに依存して細胞死を誘導するかどうかを検討するため、ヒト肝がん細胞株である HepG2 を用い、MTT assay を行った。結果として、RTE は HepG2 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした (図 31)。HepG2 細胞に対し、RTE の IC<sub>50</sub> 値は 0.30 mg/mL であった。この結果から、RTE は HepG2 細胞に対し、細胞傷害性を示すことが明らかになった。

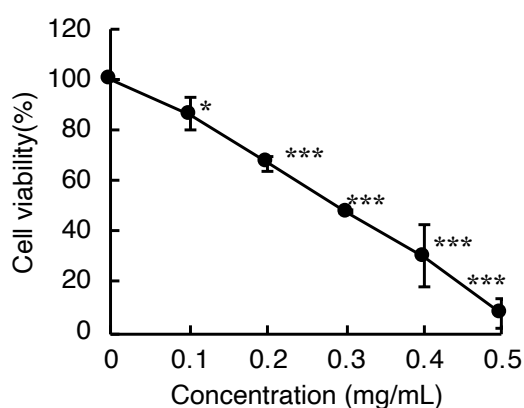


図 31. RTE は HepG2 細胞に対して細胞傷害性を示す

HepG2 細胞に RTE を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値 ± SD である。\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$  vs untreated cells.

### 3-3-6. HepG2 細胞に対する RTE のカスパーゼと PARP-1 の開裂の検出

RTE は HepG2 細胞に対してカスパーゼ-7 のみの開裂を誘導するかどうかを検討するため、Western Blot を用い、カスパーゼ-3、-7 活性を確認した。図 32 より、RTE を 24 h 作用させた後、HepG2 細胞に対し、カスパーゼ-7 と PARP-1 の開裂が観察され、カスパーゼ-3 の開裂は観察されなかった。

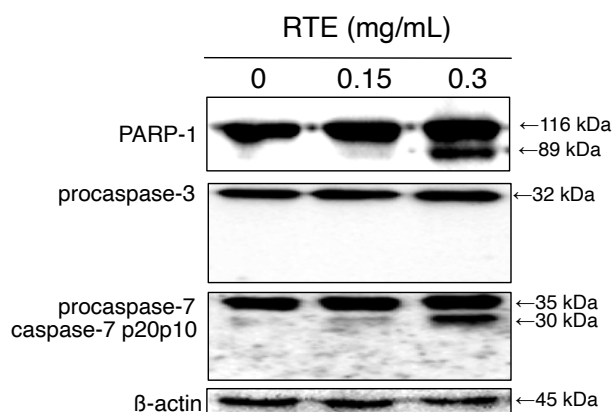


図 32. RTE は HepG2 細胞に対してカスパーゼ-7 と PARP-1 の開裂を誘導する  
HepG2 細胞に RTE を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、PARP-1 の状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

### 3-4. 考察

前章の結果から、RTE は外因性経路と内因性経路の両方が関与している可能性があることを示した。本章では、RTE による主流のアポトーシス誘導経路を明らかにするため、Bcl-2 過剰発現株 Jurkat (Bcl-2) を用いて検討した。Jurkat (Bcl-2) 細胞の IC<sub>50</sub> 値は、Jurkat 細胞の IC<sub>50</sub> 値と有意な差がないことから、RTE の細胞傷害性が Bcl-2 では抑制できないことが示された。RTE は Jurkat 細胞に対して  $\Delta\Psi_m$  低下を誘導したが、Jurkat (Bcl-2) 細胞において RTE が誘導する  $\Delta\Psi_m$  低下を抑制できなかった。また、RTE が誘導したカスパーゼ-7 の開裂が抑制できなかったことから、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死はミトコンドリアを関与しているが、依存していないことが示された。

内因性経路は、外因性経路のアポトーシスシグナル伝達の増幅によっても活性化される (121)。そして、Jiang はカスパーゼ-8 開裂を介してカスパーゼ-9 開裂を誘導できることを報告した (121)。そこで、RTE は先にカスパーゼ-8 の開裂を誘導した後、カスパーゼ-9 の開裂を誘導することから、RTE がカスパーゼ-8 開裂を介してカスパーゼ-9 開裂を誘導することは Jiang から報告した結果に合っている可能性が高い。ただし、Bcl-2 の過剰発現は RTE が誘導するカスパーゼ-9 開裂の変化を検討せず、カスパーゼ-9 の下流であるカスパーゼ-7 開裂を抑制していないことから、RTE が誘導するカスパーゼ-9 の開裂を抑制しないと推測される。

また、RTE は Jurkat に対して、カスパーゼ-7 の開裂に依存し、カスパーゼ-3 非依存にアポトーシスを誘導する。このことは他のがん細胞に対して、カスパーゼ-3 を開裂するかどうかを検討することに至った。RTE はヒト肝がん細胞 HepG2 に対して、カスパーゼ-7

を開裂させ、PARP-1を開裂すること、カスパーゼ-3を開裂しないことが示唆された。つまり、他のがん細胞に対して、RTEはカスパーゼ-7の開裂に依存し、カスパーゼ-3非依存にアポトーシスを誘導することが示唆された。

図 33 に示したように、RTEはミトコンドリア経路ではなく、外因性経路を介してアポトーシス様細胞死を誘導することが示された。

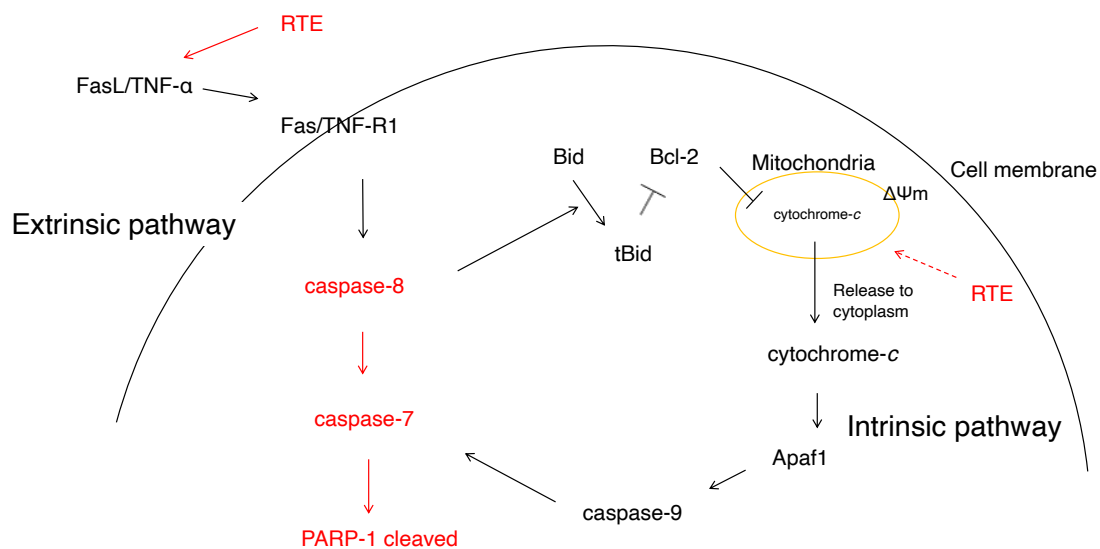


図 33. RTEはJurkat細胞に対して、外因性経路を介してアポトーシス様細胞死を誘導する  
RTEはJurkat細胞に対して、カスパーゼ-8を開裂させ、カスパーゼ-7を開裂させ、PARP-1の開裂を誘導する。

## 第4章 RTE成分の一つ、パルミチン酸の細胞死誘導メカニズム

### 4-1. 背景

RTEは外因性経路を介し、カスパーゼ-7の開裂に依存するアポトーシス様細胞死を誘導することが示唆された。ただし、RTEの有効成分は未だ不明である。第1章で説明したように、RTEには多く成分が含まれていることが報告された。RTEには何種類の有効成分が含まれているのか、カスパーゼ-3の開裂を抑制する成分があるのかを検討することが必要である。そのため、本章はRTEの成分を分離し、分離した各フラクション成分の細胞死誘導メカニズムの解明を行った。

### 4-2. 方法

#### 4-2-1. RTE成分の推定

RTE含有成分の同定を東京理科大学菅原研究室にて実施した。RTEを288.8mg測りとり、展開用溶媒[ヘキサン(wako)：酢酸エチル(wako)=30:1]で溶かした。内径2.4cmのカラムクロマトグラフィー管を用いて、シリカゲル(KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan)の高さ20cmまで入れた。表2より溶媒を各比率、量で流し、それぞれのフラクション溶液を集め、エバポレーターで溶媒を除去し、窒素によって乾燥させ、乾燥したフラクションの重さを測った。各フラクションの化合物には、薄層クロマトグラフィー[TLCプレートシリカゲル60F<sub>254</sub>; (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)]を用い、展開用溶媒[ヘキサン(wako)：酢酸エチル(wako)=30:1]により展開した後、254nm、365nmの紫外線吸収と表3によりアニスアルデヒドによる発色を行った。発色剤をスプレーしたのち、約220℃でTLCを加熱し、スポットを確認した。目的のフラクション中の物質について、エレクトロスプレーイオン法(ESI-MS)により、QSTAR質量分析計(Applied Biosystem Abiqstar Pulsar, Thermo Fisher Scientific)を用いて質量電荷比がNegative modeとPositive modeで検出された。そして、目的の化合物をNMRにかけた。NMRはBruker Avance Drx-400(Bruker, Osaka, Japan)を用い、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMRを測定し、NMRの測定溶媒には、基準物質のTMS入り重クロロホルム(CDCl<sub>3</sub>)を用いた。

表 2 展開溶媒の比率と使用量

フラクション	溶媒	使用量
1	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	250 mL
2	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	250 mL
3	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	250 mL
4	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	250 mL
5	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	260 mL
6	ヘキサン:酢酸エチル=30:1	260 mL
7	ヘキサン:酢酸エチル=25:1	
8	ヘキサン:酢酸エチル=25:1/20:1	
9	ヘキサン:酢酸エチル=20:1	
10	酢酸エチル	
11	酢酸エチル	
12	酢酸エチル	
13	メタノール	

表 3 アニスアルデヒドによる発色実験

アニスアルデヒドによる発色実験

アニスアルデヒド	1.25 mL
エタノール	22.5 mL
濃硫酸	1.25 mL
醋酸	0.25 mL

4-2-2. 細胞培養

実験に用いた Jurkat 細胞及び MCF-7 細胞の培養は 2-2-1.項に詳述した。

4-2-3. MTT assay

2×10<sup>5</sup> cells/mL に調製した Jurkat 細胞は 96 穴プレート(BD falcon, Franklin Lakes, USA)に 0.1 mL/well 分注した。また、1×10<sup>5</sup> cells/mL に調製した MCF-7 細胞は 96 穴プレート(BD falcon)に 0.1 mL/well 分注し、一晚、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養し接着させた。PA 及び各フラクションを添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 h 作用させた。作用終了の 1 h 前に 5 mg/ml の 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide 溶液 (MTT) 試薬 (Wako) を各ウェルに 10 µL ずつ添



加した。最後に、上清を除去し、100 $\mu$ L の DMSO を加えて MTT ホルマザンを溶解した。マイクロプレートリーダー(Awareness Technology)を用いて 570 nm の吸光度を測定した。

#### 4-2-4. フローサイトメーター

細胞周期を測定する際は、 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に PA を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、リン酸生理緩衝液(PBS)によって、5 min、4 °C、1200 rpm で 2 回遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに 0.5 mL の 0.1 % Triton-X 100 (Wako)を含んだ PBS で懸濁した後、12.5  $\mu$ L の 1 mg/mL ヨウ化プロピジウム(PI) (Wako)と 5  $\mu$ L の 5 mg/mL RNase A (Wako)を加えて懸濁し、20 min 室温暗所で静置した。その後、ナイロンメッシュ (Sigma) に通してフローサイトメーター (FACS Calibur) で PI の蛍光強度の測定をした。Cell Quest ソフトウェア (Becton Dickinson) を用い、結果を分析した。

PS の露出を測定する際は、 $2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に PA を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに 197.5  $\mu$ L binding buffer (10mM HEPES (Dojindo, Tokyo, Japan)、140 mM NaCl (Wako)、2.5 mM CaCl<sub>2</sub> (半井化学薬品株式会社)、pH 7.4) に懸濁した後、2.5  $\mu$ L fluorescein isothiocyanate (FITC)-annexin V (Alexis Biochemicals, San Diego, USA) を加えて懸濁し、10 min 室温暗所で静置した。300  $\mu$ L binding buffer で遠心洗浄し、1  $\mu$ L の 1 mg/mL PI を加え懸濁した後、ナイロンメッシュに通してフローサイトメーターで FITC の蛍光と PI の蛍光強度を測定した。Cell Quest ソフトウェアを用い、結果を分析した。

#### 4-2-5. アガロースゲル電気泳動

$2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に PA または RTE を 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーターで 24 h 作用させた後、PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。さらに Buffer A [10 mM Tris (Wako)、3 mM MgCl<sub>2</sub>(Wako)、2 mM 2-メルカプトエタノール(Wako)、pH 7.8]で遠心洗浄し、1 mg/mL Proteinase K in Lysis buffer [50 mM Tris、10 mM EDTA  $\cdot$  2Na、0.5 % sodium lauryl sarcocinate、pH 7.8]で懸濁した。30 min、50 °Cでインキュベートし、5 mg/mL RNase A で懸濁後、さらに 15 min、50 °Cでインキュベートした。さらに 30  $\mu$ l の Application buffer [1 $\times$  TBE buffer (10.8 g Tris、0.744 g EDTA  $\cdot$  2Na、5.5 g Boric acid (Wako) in dH<sub>2</sub>O)、0.025 % bromophenol blue (Wako)、20 % glycerol (Wako) ]を加え、Running buffer (0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide-TBE (Wako) に浸した 1.8 % アガロースゲルで電気泳動した。ゲルは、イメージアナライザー(GE Healthcare)を用い、紫外線下で臭化エチジウム染色を使用して視覚化された。

#### 4-2-6. Western Blot 法

Western Blot 法の実験方法は 2-2-8.項に詳述した。

#### 4-2-7. カラムクロマトグラフィーによる RTE の分離

RTE を 405 mg 測り、展開用溶媒[ヘキサン (wako) : 酢酸エチル (wako) =30:1]で溶かした。内径 3.5 cm のカラムクロマトグラフィー管(Asahi, Saitama, Japan)の下の部分に脱脂綿を詰め、展開用溶媒 (ヘキサン : 酢酸エチル=30:1) で混ぜたシリカゲル(KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan)を高さ 20 cm までに入れた。RTE は 1.52 L の展開用溶媒 (ヘキサン : 酢酸エチル=30:1) を展開し、365 nm の紫外線 UVA 照射により、発色によるフラクションを回収した。1.52 L の展開溶媒を流した後、100 mL のエタノールによって残りのフラクションを全て回収した。ロータリーエバポレーターにより、濃縮し、各フラクションの重さを測った。

#### 4-2-8. Ac-DEVD-pNA によるカスパーゼ-3/-7 活性の測定

$2 \times 10^6$  cells を 10 mL に調製した Jurkat 細胞に、RTE と RTE 9' -12' を 24 h 作用させた後 PBS によって、5 min、4 °C、1200 rpm で遠心洗浄を行い上清を除去した。40  $\mu$ M の RIPA buffer (25 mM Tris, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40 (Igepal CA-630), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, pH7.4) を加えて、溶解した後、4 °C、14000 rpm で 5 min 遠心し、上清を回収した。ビスンコニン酸 (BCA) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific)にてタンパク量を 0.3 mg/ml に調製した 15  $\mu$ L の Cell Lysate と 120  $\mu$ L の カスパーゼ buffer [100 mM HEPES, 20% glycerol, 0.5 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.5] を混合したサンプルを 37 °C で 30 min インキュベートした。Substrate solution [1 mM Ac-DEVD-pNA (Cayman Chemical, Michigan, USA) in DMSO] を添加して、37 °C で 4 h インキュベートした。96 穴プレートにそれぞれのサンプルを 150  $\mu$ L 加えて、マイクロプレートリーダーで 405nm での吸光度を測定した。100mM の pNA (Wako)より調製した 0, 0.5, 1, 2, 4 mM ストック溶液は 96 穴プレートの場合マイクロプレートリーダーで 405nm での吸光度を測定して、各濃度の pNA の吸光度による標準曲線を作成し、カスパーゼ-3/-7 の活性を測定した。

#### 4-2-9. RTE から分離した各フラクション中の PA 含有量の測定

各フラクション中の PA 含有量の測定は、山口東京理科大学の吉見研究室にて実施した。

質量分析は AccuTOF LC-plus 4G (JEOL) にエレクトロスプレーイオン源 (ESI) を取り付けた ESI-TOF-MS 装置を用いて行った。ラインの洗浄は試料が変わるごとに試料の溶解に用いたメタノール(Wako)を用いて行われた。装置のキャリブレーションは Negative mode ではメタノールに溶解したトリフルオロ酢酸ナトリウム (Wako) を用いて、Positive mode ではメタノールに溶解した PEG200 (Wako) を用いて行った。各試料はシリンジポンプにより流速 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  で装置に導入された。なお、パルミチン酸の測定は Negative mode において行った。各試料は特級メタノール (Wako) あるいは LC/MS 用メタノール (Wako) に溶解された。RTE から分離したフラクション中の PA の含有量を Negative mode において測定した。装置固有の設定に関する情報は表 4 に示した。

表 4. ESI-TOF-MS 装置固有の設定に関する情報

Needle [V]	2000 V
Desolvating Chamber [°C]	250°C
Orifice 1 [°C]	80°C
Nebulizing Gas	ON
Drying Gas	ON
Orifice 1 [V]	80 V
Orifice 2 [V]	5 V
Ring Lens [V]	15 V
Ion Guide RF [V]	2500 V

#### 4-2-10. 統計解析

GraphPad Prism7 (GraphPad, San Diego, CA)を用いて、Kolmogorov-Smirnov 法によりデータの正規分布を確認した。有意差検定には Student's t-test を用いて行い、検定の結果が  $p < 0.05$  であるとき、統計的に有意であるとみなした。

### 4-3. 結果

#### 4-3-1. PA の推定

RTE のアポトーシス様細胞死誘導メカニズムを詳細に解明するため、RTE 含有成分の精製及び同定を東京理科大学菅原研究室にて実施した。

カラムクロマトグラフィーを用いて RTE 原液を展開溶液の比率により分離し、13 フラ

クションを集めた。エバポレーターにより、溶媒を除去し、フラクションの重さを測った (表 5)。TLC を用いて回収したフラクションを展開し、アニスアルデヒドの発色により、スポットを確認した (図 34)。RTE 3 は収量が一番大きく、単一発色していることから、分子質量と分子構造の分析を行った。

表 5. 展開溶媒の比率によるフラクションの収量

フラクション	収量 (mg)
1	29.6
2	10.2
3	50.0
4	27.5
5	9.7
6	25.0
7	2.0
8	0.1
9	3.2
10	13.6
11	10.8
12	6.5
13	59.4
総量	247.6

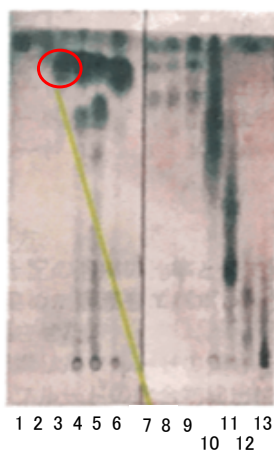


図 34. 13 個のフラクションの展開

左から右まで、フラクション RTE 1 番から 13 番まで展開された。アニスアルデヒドの発色により、スポットを確認した

最後に、RTE 3 はエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) により、分子質量を確認した。その結果、RTE 3 は複数の化合物を含まれていることが示された。RTE 3 の中の化合物の候補の一つは Negative mode による質量電荷比  $m/z$  が 255  $[M-H]^-$  であり、核磁気共鳴(NMR)より、分子式が推定された。

核磁気共鳴 (NMR) による  $C_{16}H_{32}O_2$  の分子構造を確認した。 $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ ) の結果は、 $\delta$  0.88 (3H, t,  $J = 4.6$  Hz, H-1), 1.26~1.35 (24H, m, H-2~13), 1.63 (2H, dt,  $J = 9.8, 5$  Hz H-14), 2.34 (2H, t,  $J = 5$  Hz, H-15)を確認した。 $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )の結果は、 $\delta$  14.0 (C-1), 22.6 (C-2), 31.9 (C-3), 28.9~29.7 (C-4~13), 24.8 (C-14), 34.1 (C-15), 178.6 (C-16)を確認した。ESI-MS と NMR の結果から、パルミチン酸 (palmitic acid ; PA、図 35) を推定した。

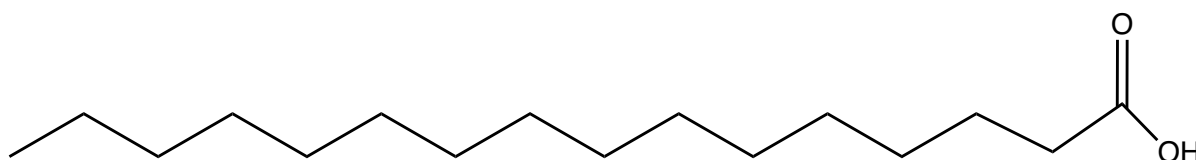


図 35. PA

以前の報告により、Zhou のヒキノカサのエタノール抽出物の同定、Zhang の揮発性油成分の同定、Xiong の脂肪酸化合物の同定及び Yue の脂肪酸化合物の同定の結果から、ヒキノカサには PA が含まれていることが明らかになった。また、菅原研究室から検出した PA の NMR の結果は、Xiong は脂肪酸化合物の同定した PA の  $^1H$  NMR と  $^{13}C$  NMR を似ているため、RTE は PA を含まれていることが考えた。そこで、PA は RTE の抗がん有効成分なのかを検討するため、PA の細胞死誘導メカニズムを検討した。

#### 4-3-2. MTT assay による PA の細胞傷害検出

PA はどの程度細胞傷害性を有しているのかを MTT assay を用いて Jurkat 細胞の生存率より検討した。結果、PA は Jurkat 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした (図 36)。PA の  $IC_{50}$  値は 0.12 mM であることが明らかになった。この結果から、PA が Jurkat 細胞に対し、細胞傷害性を示すことが明らかになった。

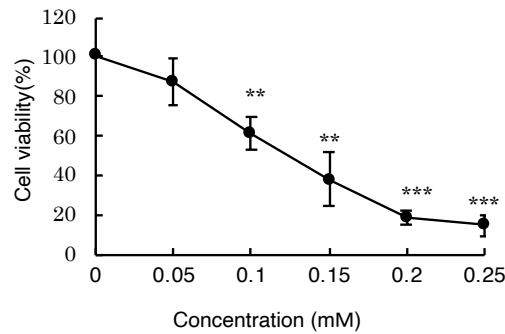


図 36. PA は Jurkat 細胞に対して細胞傷害性を示す

Jurkat 細胞に PA を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値±SD である。

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005 vs untreated cells.

#### 4-3-3. フローサイトメトリーによる Sub-G1 期細胞の検出

PA は Jurkat 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした結果から、PA により Sub-G1 期の変化を確認するために PI 染色を用いて細胞周期の解析を行った。PA により、Sub-G1 細胞が 2.04 %から 53.2 %に増加した(図 37)。PA は細胞内で DNA 断片化を誘導したことが示唆された。

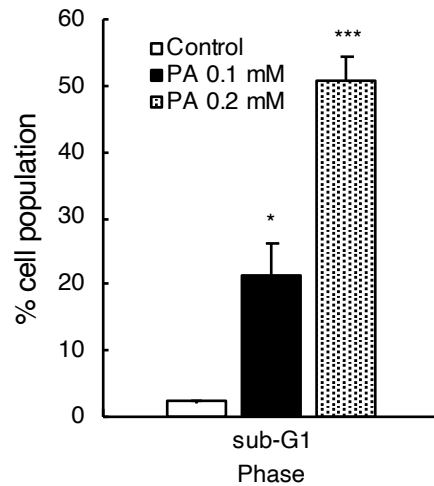


図 37. PA は Sub-G1 期細胞の増加を誘導した

Sub-G1 期における細胞の割合は、チャートグラフで示された。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値±SD である。\*p<0.05, \*\*\*p<0.005 vs. untreated cells.

#### 4-3-4. フローサイトメトリーによる PS の検出

Jurkat 細胞に、PA を 24 h 作用させた。作用終了後、FITC-annexin-V 及び PI で染色し、フローサイトメーターで FITC と PI の蛍光変化を測定した。結果として、PA により前期アポトーシス細胞の割合は 1.80 %、11.1 %及び 34.6 %になった。後期アポトーシス/ネクロトーシス細胞の割合は 0.60 %、1.70 %及び 9.89 %になった。よって 24 h 作用させた PA は PS の露出を濃度依存的に増加したことが示唆された (図 38)。

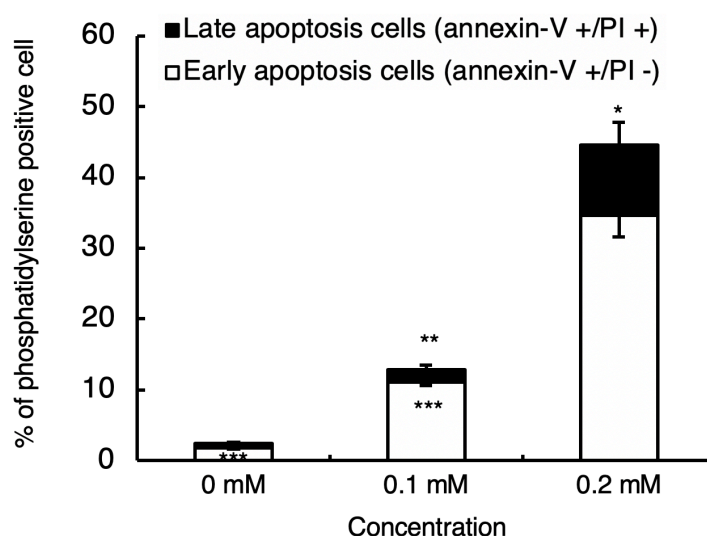


図 38. PA は PS の露出を増加させた

Jurkat 細胞に PA を 24 h 作用させた。その後、細胞を annexin-V と PI で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。3 つの独立した測定値のいずれかの代表的なドットプロットを表示した。白い棒グラフは、早期アポトーシス細胞の割合 (annexin-V + / PI-) を表し、負方向のエラーバーのみを表した。黒い棒グラフは、検出された後期アポトーシス細胞 (annexin-V + / PI+) の割合を表し、正方向のエラーバーのみを表した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値  $\pm$  SD である。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.005$  vs untreated cells.

#### 4-3-5. DNA ladder 法による DNA 断片化の検出

RTE はラダー状の DNA 断片化を起こさないことから、PA は同じくラダー状の DNA 断片化を起こさないのかを検討するため、アガロースゲル電気泳動を行った。RTE の結果と比べ、PA はラダー状の DNA 断片化を引き起こしたことが明らかになった (図 39)。

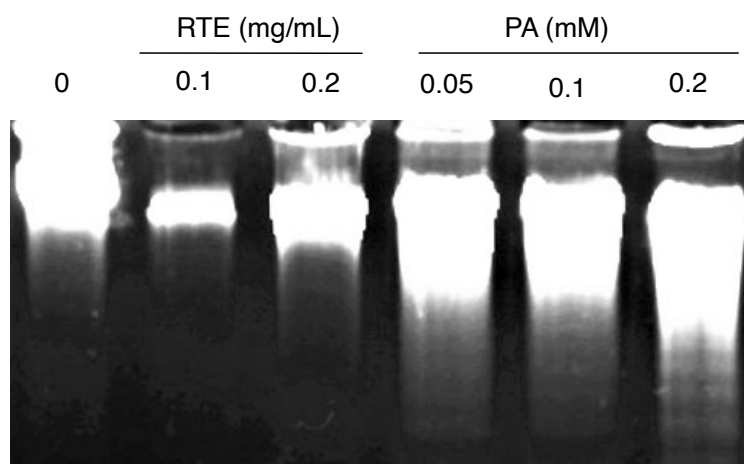


図 39. PA はラダー状の DNA 断片化を引き起こした

Jurkat 細胞に RTE を 24 h または PA を 24 h を作用させた後、DNA を回収し、アガロースゲルで電気泳動した。ゲルは、紫外線下で臭化エチジウム染色を使用して視覚化された。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 4-3-6. Western Blot 法によるカスパーゼ及び PARP-1 開裂の検出

PA はカスパーゼを開裂するかどうかを確認するため、Western blot を行った。図 40 より、PA を 24 h 作用させると、Jurkat 細胞に対し、カスパーゼ-3、カスパーゼ-7、カスパーゼ-8、カスパーゼ-9 と PARP-1 切断が観察されたことから、PA がカスパーゼを介したアポトーシスを誘導することが推察された。



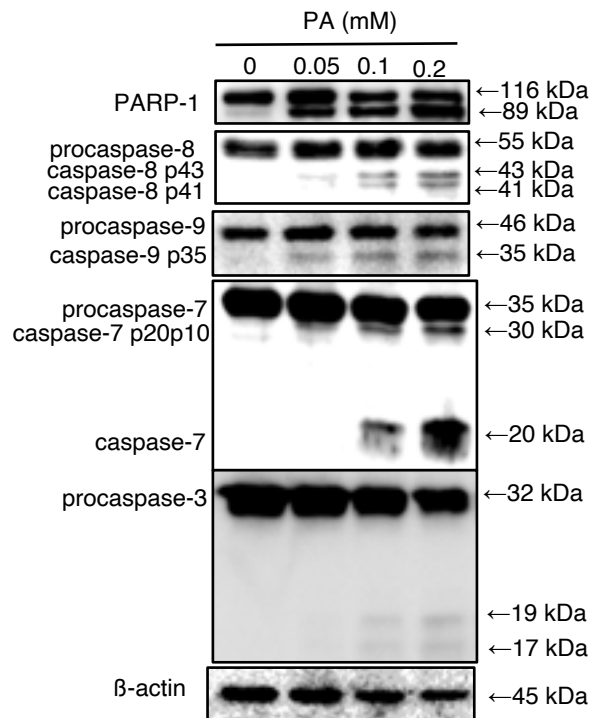


図 40. PA によるカスパーゼ及び PARP-1 の開裂

Jurkat 細胞に PA を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、-8、-9、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 4-3-7. Western Blot 法によるカスパーゼ-3、-7、-8、-9 及び PARP-1 の時間依存的な開裂の検出

PA はカスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 に対してどちらを先に開裂するかどうかを確認するため、Western blot を行った。図 41 より、0.2 mM PA を 0-8 h 作用させた後、Jurkat 細胞に対し、カスパーゼ-8、カスパーゼ-7 と PARP-1 の開裂が 4 h から観察され、カスパーゼ-9、カスパーゼ-3 の開裂は 8 h までに観察されないことが示された。

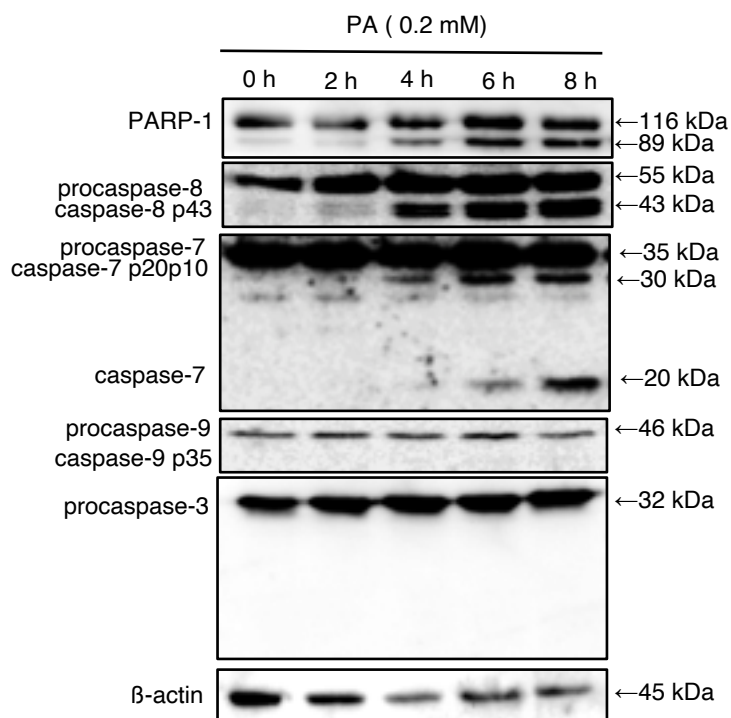


図 41. PA によるカスパーゼ及び PARP-1 の開裂

Jurkat 細胞に PA を 0.2 mM 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-3、-7、-8、-9、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 4-3-8. MCF-7 細胞にする PA の細胞傷害検討

RTE はカスパーゼ-3 欠損したヒト乳がん MCF-7 細胞に対する細胞傷害性は、Jurkat 細胞と同じであり、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死はカスパーゼ-3 に依存しないことが明らかになった。では、PA は RTE の効果を同じなのかを検討するため、MTT assay を行った。結果として、PA は MCF-7 細胞に対して濃度依存的に細胞傷害を引き起こした (図 42)。MCF-7 細胞に対する、PA の 0.2 mM から 0.25 mM の数値の線形関係を分析すると、PA の IC<sub>50</sub> 値は 0.54 mM になることが推測された。

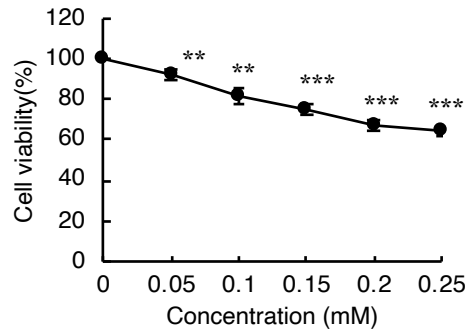


図 42. PA は MCF-7 細胞に対して細胞傷害性を示す

MCF-7 細胞に PA を 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値 ± SD である。  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. untreated cells.

#### 4-3-9. MCF-7 細胞に対する RTE のカスパーゼ、PARP-1 の開裂の検出

4-3-8 の結果から、PA は MCF-7 細胞に対してカスパーゼ-7 の開裂を誘導するかどうかを検討するため、Western Blot を用い、カスパーゼ-7 の開裂を確認した。図 43 より、PA を 24 h 作用させた後、MCF-7 細胞に対し、カスパーゼ-7 の開裂が観察されていて、PARP-1 の開裂が観察された。

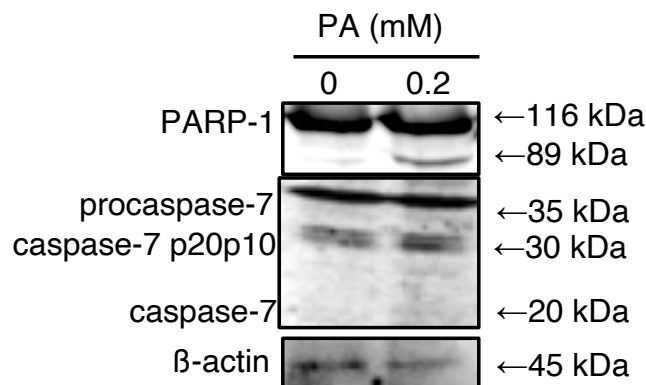


図 43. PA は MCF-7 細胞に対してカスパーゼ-7 の開裂を誘導する

MCF-7 細胞に 0.6 mM PA 及び 0.6 mM PA の同量の溶媒を 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot によってカスパーゼ-7、及び PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 4-3-10. カラムクロマトグラフィーによる RTE の分離

菅原研究室の結果から、RTE 3 中から、PA の含まれていることが推定したが、PA 以外に複数の物質が検出された。そこで、RTE 中の PA の含有量を確認するため、カラムクロマトグラフィーを用いて、展開溶媒（ヘキサン：酢酸エチル=30：1）により、RTE 原液を展開した。365 nm の紫外線 UVA 照射を用いて、発色によるフラクションを回収した。12 フラクションを集めた。エバポレーターにより、溶媒を除去し、フラクションの重さを測った（表 6）。

表 6. 365 nm の紫外線 UVA 照射により、12 フラクションを回収した

フラクション	紫外線吸収による発色	収量 (mg)	使用量	展開溶媒
1'	色なし	9.7	1.52 L	ヘキサン:酢酸エチル  30 : 1
2'	薄く青い	11.5		
3'	色なし	10.1		
4'	薄く白い	9.5		
5'	色なし	18.5		
6'	深く黄色	12.3		
7'	深く青い	11.3		
8'	色なし	14.2		
9'	大量、深く青い	58.8		
10'	薄く黄色	80.3		
11'	青い	26.0		
12'		106.2		

カラムクロマトグラフィーを用いて、RTE 原液を展開した。365 nm の紫外線 UVA 照射を用いて、発色によるフラクションを回収した。

#### 4-3-11. MTT assay による各フラクションの細胞傷害検出

回収した各フラクションはどの程度細胞傷害性を有しているのかを検討するため、各フラクションを DMSO で 100 mg/mL に調製し、MTT assay を用いて細胞傷害性を確認した。表 7 に各フラクションを作用させたときの細胞生存率が 50% となる濃度を示す IC<sub>50</sub> 値を算出してまとめた。結果、RTE 9' -12' は Jurkat 細胞に対して細胞傷害を引き起こしたことが示された。PA は RTE 9' -12' の中に含まれている可能性があると考えた。

表 7. 各フラクションの細胞傷害性

fraction	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
1'	なし
2'	なし
3'	なし
4'	なし
5'	なし
6'	なし
7'	なし
8'	なし
9'	0.2
10'	0.15
11'	0.28
12'	0.16

Jurkat 細胞に各フラクションを 24 h 作用させ、MTT assay を行った。結果は、未処理の培養における吸光度のパーセンテージとして表示した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値 ±SD である。

#### 4-3-12. Ac-DEVD-pNA によるカスパーゼ-3/-7 活性の検出

カスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 は DEVD を認識して切断することが明らかになっている。図 40 に示したように、PA はカスパーゼ-3 とカスパーゼ-7 を活性化するため、Ac-DEVD-pNA を切断する。このことより、細胞傷害性を持っている RTE 9' -12'はどの程度カスパーゼ-3/-7 の活性を有しているのかを検討するため、Jurkat 細胞に RTE 9' -12'の IC<sub>50</sub> 値を 24 h 作用させ、比色定量法を用いて、カスパーゼ-3/-7 の活性を測定した。図 44 で示したように、RTE 9' -12'はカスパーゼ-3/-7 の活性を有していることが明らかになった。この結果から、PA は RTE 9' -12'の中に含まれている可能性があると考えた。

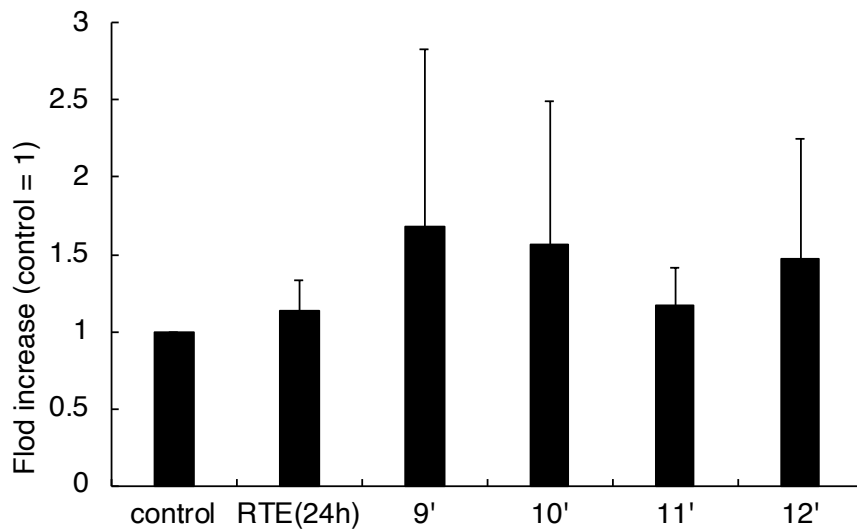


図 44. RTE 9' -12' は Jurkat 細胞に対してカスパーゼ-3/-7 の活性化を引き起こした Jurkat 細胞に 0.2 mg/mL RTE または IC<sub>50</sub> 値の RTE 9' -12' で 24 h を作用させた後、Ac-DEVD-pNA を用いてマイクロプレートリーダーによって吸光度を測定した。データは、3 回の独立した実験の結果の平均値±SD である。

#### 4-3-13. RTE 9' -12' の Jurkat 細胞に対する PARP-1 開裂の検出

4-3-12 では、カスパーゼ-3/-7 の活性評価を行ったため、RTE 9' -12' による PARP-1 の開裂を Western Blot を用いて確認した。図 45 より、RTE 9' -12' は、Jurkat 細胞に対し PARP-1 を開裂することが観察した。この結果から、PA は RTE 9' -12' の中に含まれている可能性があると考えた。

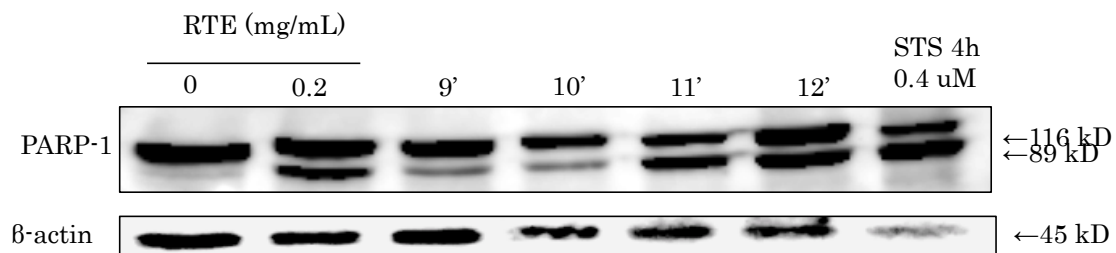


図 45. RTE 9' -12' は Jurkat 細胞に対する PARP-1 の開裂を誘導する  
 Jurkat 細胞に 0.2 mg/mL の RTE、 $IC_{50}$  値の RTE 9' -12' 及び 0.4  $\mu$ M のスタウロスポリンを 24 h 作用させた。その後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、Western Blot による PARP-1 の開裂状態を解析した。3 つの独立した実験のいずれかの代表的な図を示した。

#### 4-3-14. ESI-MS による PA の質量電荷比のピークの検出と検量線の作成

RTE 9'-12'中の PA 含有量を測定した。まず PA の質量電荷比のピークを検出した。この実験は山口東京理科大学の吉見研究室で ESI-MS を用いて、実施した。

ESI-MS のネガティブモードを用いて、PA である質量電荷比  $m/z$  255  $[M-H]^-$  のピークを検出した。PA の 0、0.62、1.25、2.5  $\mu$ g/mL におけるピーク強度は 0、2700、4200、7200 であり、PA の検量線を作成した。図 46 に示したように、PA の濃度が 0-2.5  $\mu$ g/mL における検量線を作成し、 $y = 2781.4x + 486.35$ ,  $R^2 = 0.9782$  であった。

A



B

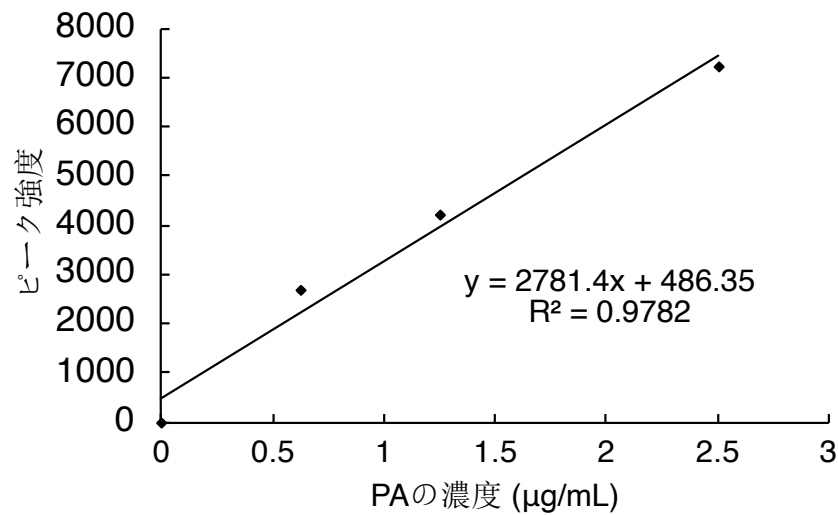


図 46. PA の質量分析と検量線

A : ESI-MS による PA の質量分析を行った。B : ESI-MS を用いて、PA の 0, 0.62, 1.25, 2.5  $\mu\text{g/mL}$  におけるピーク強度を測定した。

#### 4-3-15. RTE から分離した各フラクション中の PA の検出

RTE 9'-12'は Jurkat 細胞に対して細胞傷害性を示し、カスパーゼ-3/7 の活性及び PARP-1 の開裂を誘導したことから、PA がどのフラクションの中に含まれているかを検討した。

ESI-MS の Negative mode により、RTE 9'-12'を分析した。図 47 に示したように、RTE 9'、11'、12'の中に、255  $[\text{M}-\text{H}]^-$  のピークが検出されたことから、PA が含まれていることが示唆された。また、RTE 10' の中において 255  $[\text{M}-\text{H}]^-$  のピークが検出されなかった。



め、PA が含まれていないことが示唆された。

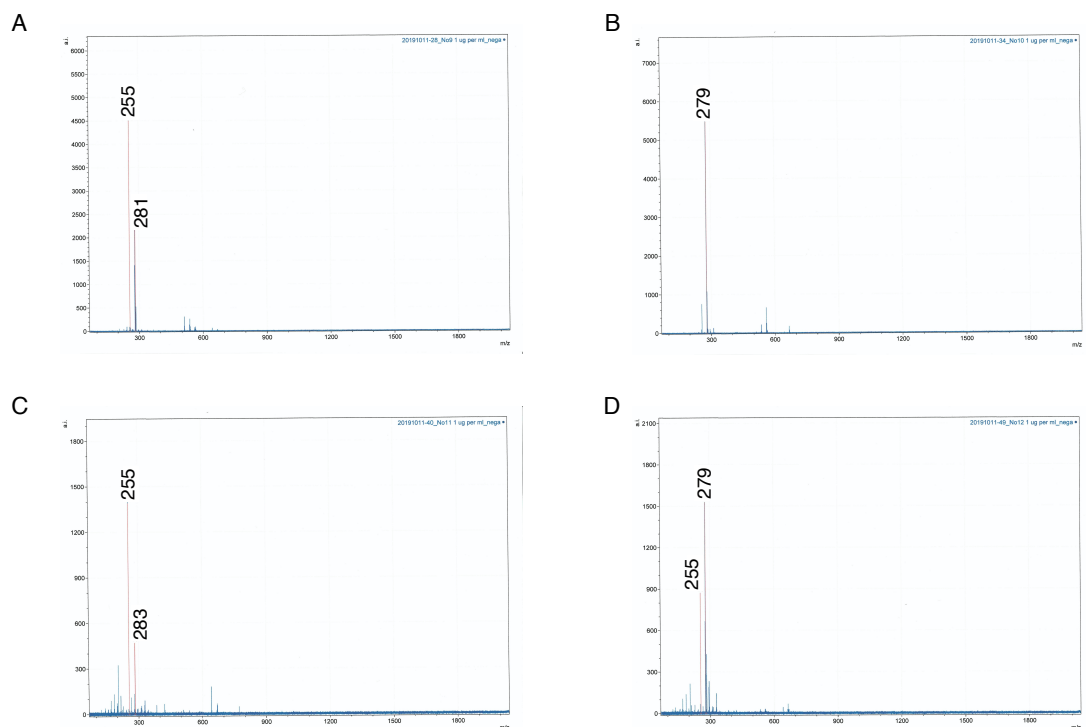


図 47. ESI-MS による RTE 9' -12' の質量分析

ESI-MS を用いて、Negative mode による 1  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の RTE 9' -12' のスペクトルを分析した。A : RTE 9' の質量分析結果 B : RTE 10' の質量分析結果。C : RTE 11' の質量分析結果。D : E RTE 12' の質量分析結果。

#### 4-4. 考察

前章では、RTE は外因性経路を介し、カスパーゼ-7 の開裂に依存するアポトーシス様細胞死を誘導することが示唆されたが、RTE の有効成分及び有効成分のアポトーシス誘発メカニズムは未だ不明のままである。さらにヒキノカサを抗がん作用があるかどうかを評価するためにも、科学的な根拠を提供する必要がある。その場合、RTE の有効成分の分離及び有効成分のアポトーシス誘発メカニズムを解明することが必要である。

本章では、RTE 含有成分の分析を東京理科大学菅原研究室にて実施した結果、RTE 3 の成分の候補の一つは PA が推定された。これは以前のヒキノカサ成分の分析研究により、Zhou のヒキノカサのエタノール抽出物の同定、Zhang の揮発性油成分の同定、Xiong の脂肪酸化合物の同定及び Yue の脂肪酸化合物の同定の結果から、ヒキノカサには PA が含まれているため、RTE は PA を含まれていることが考えた (78-81)。

脂肪酸は、トリグリセリド (TAG) として保存される細胞エネルギーの重要な供給源であ

り、またエイコサノイドやリン脂質などの生体分子の成分として重要な役割を果たす (122)。脂肪酸 (Fatty acid、FA) は一般的に飽和 FA と不飽和 FA を区別される。長鎖の飽和 FA である PA は、ヘキサデカン酸(hexadecanoic acid)とも呼ばれていて、動物、植物、微生物に見られる最も一般的な飽和脂肪酸である。PA は細胞膜を作り、皮脂として分泌し、栄養の体内循環に必須で、人体において最も豊富な脂肪であり、脂肪酸全体の 20-30% を占める (123)。PA はパーム油の主要成分 (総脂肪の 44%) であり、肉や乳製品 (総脂肪の 50-60%)、ココアバター (総脂肪の 26%)、オリーブオイル (8-20%)、及び母乳 (総脂肪の 20~30%) である (124、125)。また、パルミチン酸はバリア機能の改善に役立つことが明らかになっている (126)。

人体は、脂肪組織から脂肪消費組織へ 24 h で輸送されるために約 0.3 mol 遊離 FA を必要とする。遊離 FA は、TAG やリン脂質などの大きな分子にエステル化されていないものである (122)。血漿中の約 0.3 mM の遊離 FA の濃度が必要であるが、遊離 FA は水溶液よりもはるかに低い溶解度を持っている。血漿中の濃度を必要なレベルまで上昇させるために、遊離 FA は 2 つの方法でリンパ管と血液を介して体中に輸送される。第一では、カイロミクロンおよび非常に低密度のリポタンパク質に関連する TG として可溶になる。第二では、血液および間質液の主要な脂肪酸結合タンパク質 (FABP) であるアルブミン (Albumin) は遊離 FA に非共有結合し、遊離 FA の濃度を数桁的に増加させる (122)。

細胞外遊離 FA が細胞にシグナル伝達または代謝の結果を及ぼすためには、まず細胞によって認識及び取り込まれる必要がある。遊離 FA の T 細胞膜表面受容体には、FA トランスロカーゼである CD36、FA 結合タンパク質 (Fatty Acid-Binding Proteins、FABP)、および FA 輸送タンパク質 (Fatty acid transport proteins、FATP) が含まれている。この結合により、T 細胞への遊離 FA の拡散と安定化を促進する (127、128)。

図 48 に示したように、遊離 FA は血漿アルブミンから解離した後、CD36、FA 輸送タンパク質 (FATP)、および細胞膜 FA 結合タンパク質 (FABP) を含むさまざまな遊離 FA トランスポーターによって細胞に取り込まれる。細胞に取り込まれた遊離 FA は、TAG として保存するか、脂肪アシル CoA シンターゼ (Fatty-acyl-CoA synthase、FACS) により脂肪アシル CoA に変換する。FA-CoA は、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (Carnitine palmitoyltransferase、CPT) 1 を介してカルニチン (Carnitine) に転移できる。アシルカルニチンは、カルニチントランスロカーゼ (Carnitine translocase、CT) によるミトコンドリアに浸透し、そこで  $\beta$ -酸化を受け、トリカルボン酸 (The tricarboxylic acid、TCA) サイクルを用い、アデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate ATP) を生成する (127、128)。

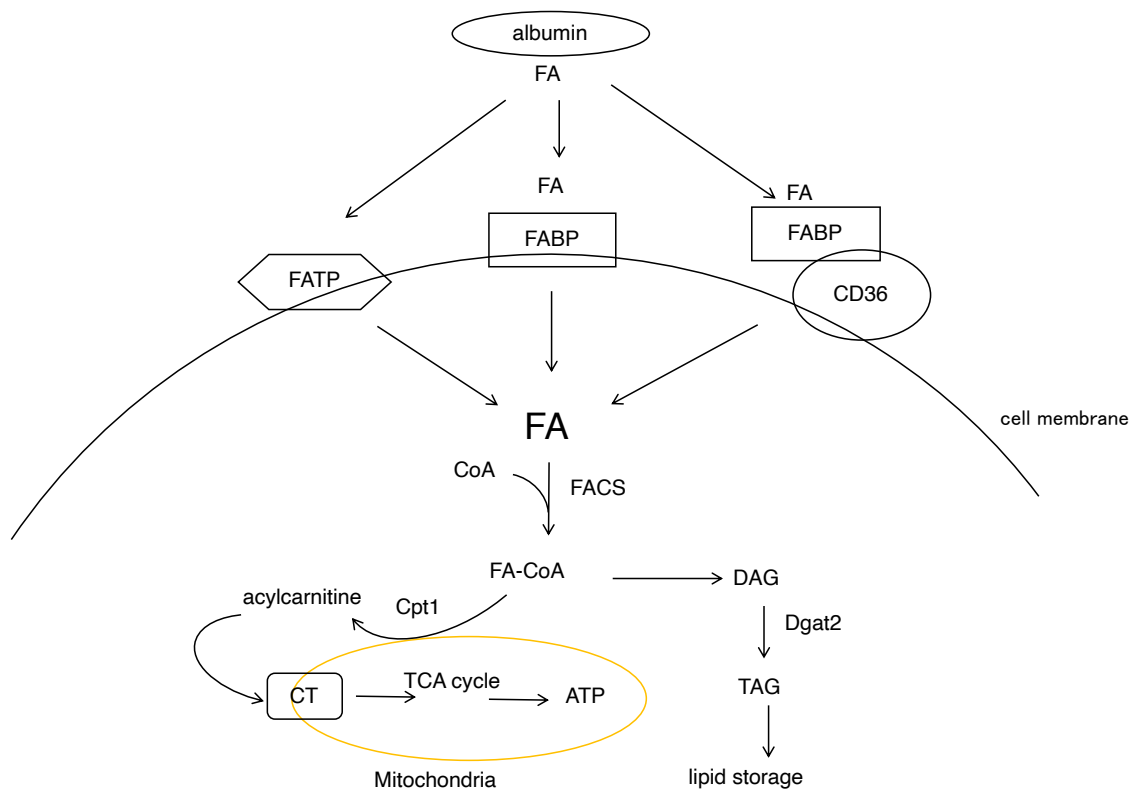


図 48. FA 代謝の概要

遊離 FA は血漿アルブミンから解離した後、CD36、FATP、および FABP を含むさまざまな遊離 FA トランスポーターによって細胞に取り込まれる。細胞に取り込まれた遊離 FA は、FACS による脂肪アシル CoA に変換する。FA-CoA は、CPT1 を介して Carnitine に転移できる。アシルカルニチンは、CT によるミトコンドリアに浸透し、そこで  $\beta$ -酸化を受け、TCA サイクルを用い、ATP を生成する

PA は、ヒト血漿に存在する最も一般的な長鎖飽和遊離 FA である (129)。PA 濃度の恒常性は厳密に制御されている。PA 濃度の恒常性バランスが崩れると、高濃度の遊離 FA は、脂肪毒性を形成し、細胞機能の障害、炎症とアポトーシスを引き起こす可能性がある。現在、高濃度の PA は肥満、2 型糖尿病、異所性脂肪の蓄積、脂質媒介血管細胞機能不全、神経変性疾患、心血管疾患、敗血症、非アルコール性脂肪性肝炎及び Toll-like receptor 4 を介した炎症が促進されることが報告した (126、130-136)。

ここで、PA は RTE の主要な有効成分であるかどうかを検討するため、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死のメカニズムと、PA が誘導するアポトーシスの関連性及び誘導メカニズムの差異を検討した。PA は Jurkat 細胞に対して、Sub-G1 期の増加、PS の露出、ラダー状の DNA 断片化、カスパーゼ-3、-7、-8、-9 の開裂、PAPR-1 の開裂を誘導し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。これらの結果から、PA はアポトーシス外因性経路と内因性経路を両方介してアポトーシスを誘導する可能性があると考えた。以上の結果から、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死は、PA が誘導するアポトーシスによるもの

ではないことが考えられる。

Takahashi は PA が Jurkat 細胞に対し、PKC- $\delta$  をリン酸化させ、ROS を生成し、グルコース含量の消耗、TAG の形成を引き起こしたことが報告した (137)。この報告の結果から、PA により ROS の生成と TAG の形成が非常に重要だと考えた。ROS には  $O_2$  の逐次 1 電子還元産物である  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  などが含まれ、生体内に存在するスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ, ペルオキシダーゼなどの抗酸化酵素がその代謝に関与する。ROS は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化系に過剰な負荷をかけることにより、または NADPH オキシダーゼ (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX) により生成される (138)。また、グリセロールは過剰な遊離 FA をエステル結合し、TAG を形成することより、遊離 FA の細胞毒性を抑制することが明らかになった (139)。

過剰な遊離 FA がまずグリセロールとエステル結合し、TAG 形成に伴い、NOX を介して ROS を生成させ、NF- $\kappa B$  経路を誘導する。その後、TAG を加水分解し、過剰な遊離 FA によるミトコンドリアの ROS を生成することが報告した (139)。この報告から、異なる遊離 FA が誘導するメカニズムに基づいて、ROS の生成部位が異なっている。そこで、図 40 と図 41 に示された結果より、24 h の PA によるカスパーゼ-8 とカスパーゼ-9 の開裂を観察された。または、0.2 mM の PA により、カスパーゼ-8 の開裂が 4 h から観察され、カスパーゼ-9 の開裂は 8 h まで観察されなかった。この結果により、PA はまずカスパーゼ-8 を開裂した後、カスパーゼ-9 を開裂することが示された。以上の結果より、PA はまず外因性経路を活性化した後、内因性経路を活性化することから、まず細胞質内で ROS を生成した後、ミトコンドリアで ROS を生成することが考えられる。また、過剰な PA により、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) の発現量を増加し、炎症を促進することも報告された (140)。従って、PA が誘導する ROS の生成の経路を図 49 に示した。まず、PA はグルコースを消費し、細胞内でジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) を主に形成し、少量の TAG を形成し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化系を維持する。そして、PA は Toll 様受容体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) を介し、及び DAG の形成することを介し、PKC- $\delta$  のリン酸化により、NOX を活性化させ、ROS を生成し、NF- $\kappa B$  をリン酸化させ、細胞核へ移動し、TNF- $\alpha$  の発現量を増加し、炎症を引き起こす。さらに、TNF- $\alpha$  により、アポトーシス外因性経路を介してアポトーシスを誘導する。しかし、グルコースを完全に消費したから、TAG 及び DAG から分解し、遊離 PA の含量を増加させ、ミトコンドリアの酸化的リン酸化系の機能障害を引き起こし、 $\beta$ -酸化と ATP 生成を減少し、ROS の生成を増加させ、さらにアポトーシス内因性経路を介してアポトーシスを誘導する (139, 140)。従って、PA はまず TNF- $\alpha$  を介してアポトーシス外因性経路を活性化させたと、ミトコンドリア内因性経路を活性化することを明らかになった。以上の結果から、PA が誘導するアポトーシスは RTE が誘導するアポトーシス様細胞死により、まずアポトーシス外因性経路を活性化させたと、ミトコンドリア内因性経路を活性化することが一致していると示された。

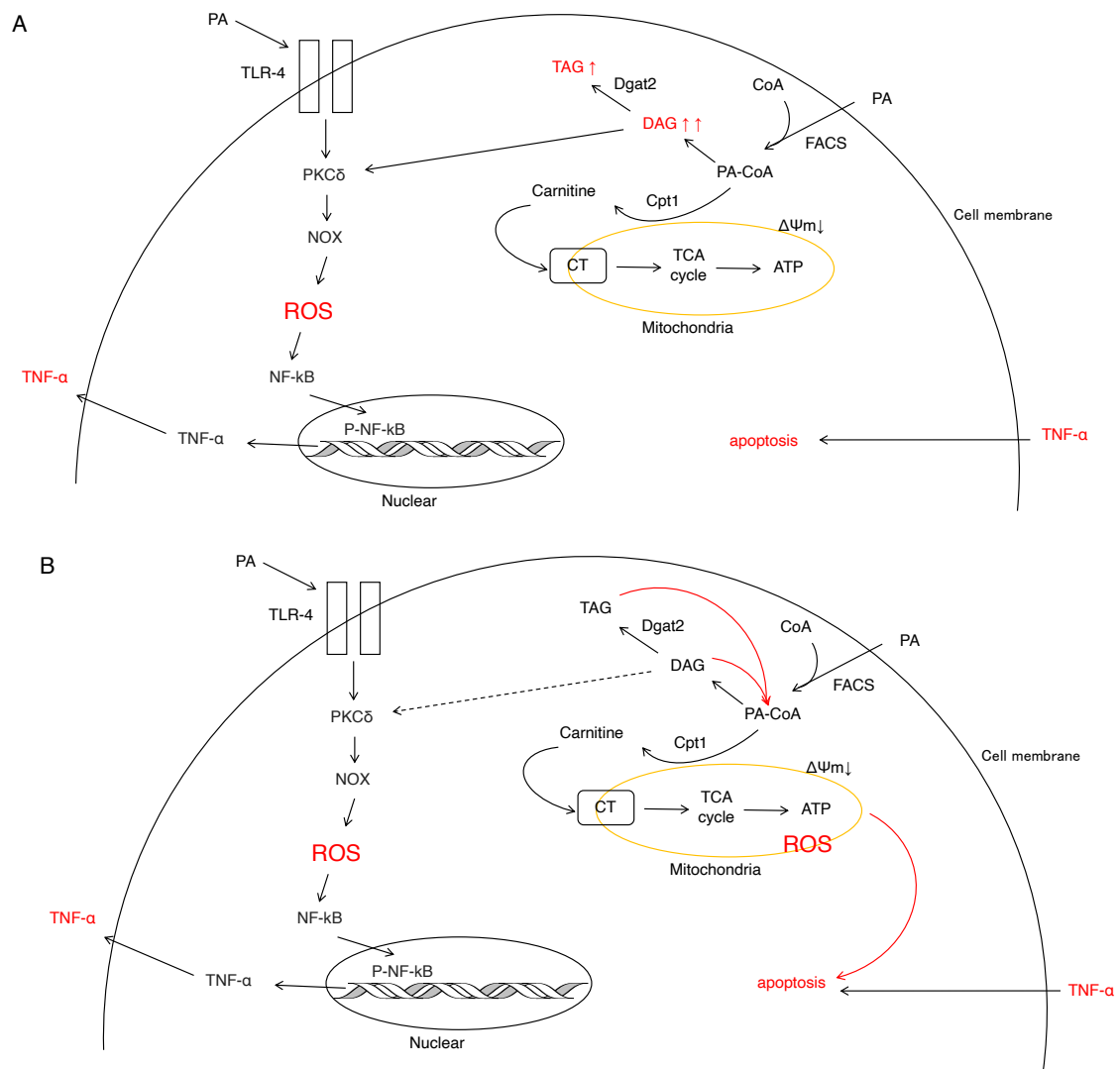


図 49. PA は Jurkat 細胞に対して、ROS の生成と中性脂肪の形成に関するメカニズム

A : PA はグルコースを消耗し、細胞内で DAG を主に形成し、少量の TAG を形成し、ミトコンドリアの酸化リン酸化系を維持する。そして、PA は TLR4 を介し、及び DAG の形成することを介し、PKC- $\delta$  のリン酸化により、NOX を活性化させ、ROS を生成し、NF- $\kappa$ B をリン酸化させ、細胞核へ移動し、TNF- $\alpha$  の発現量を増加し、炎症を引き起こす。さらに、TNF- $\alpha$  により、アポトーシス外因性経路を介してアポトーシスを誘導する。B : グルコースを完全に消耗したから、TAG 及び DAG から分解し、遊離 PA の含量を増加させ、ミトコンドリアの酸化リン酸化系の機能障害を引き起こし、 $\beta$ -酸化と ATP 生成を減少し、ROS の生成を増加させ、さらにアポトーシス内因性経路を介してアポトーシスを誘導する。

TNF- $\alpha$  は、サイトカインの TNF スーパーファミリーに属し、炎症、分化、細胞増殖の制御、アポトーシスの開始など、さまざまな細胞プロセスに関与している。TNF- $\alpha$  は、TNF 受容体 (TNF-receptor、TNF-R) スーパーファミリーの 2 つの受容体、TNF-R1 および TNF-R2 に結合する。TNF-R1 は、TNF- $\alpha$  刺激に応答してアポトーシスを媒介する唯一の受容体である。TNF- $\alpha$  は TNF-R1 への結合し、アポトーシスシグナル伝達経路を誘導できる。まず、TNF-R1 の DD に TRADD を結合させ、さらにプロカスパーゼ-8 と結合し、DISC を形成し、アポトーシスを誘導する。しかし、Edelmann は他の TNF- $\alpha$ -TNF-R1 のモデルを報告した(116、141)。図 50 を示したように、TNF- $\alpha$  が TNF-R1 へ結合し、クラスリンを介してエンドサイトーシスを行い、エンドソームを形成する。前期 TNF 受容体 (TNF receptors) エンドソームは TRADD、FADD 及びプロカスパーゼ-8 を補充し、DISC を形成する。エンドサイトーシス経路に沿って、前期 TNF 受容体エンドソームは、プロ酸スフィンゴミエリナーゼ (pro-A-SMase) 及びプレプロカテプシン D (pre-pro-CTSD) を含むトランスゴルジ小胞と融合して、後期 TNF 受容体エンドソームを形成する。後期 TNF 受容体エンドソームの中に、カスパーゼ-8 によるカスパーゼ-7 を開裂させ、pro-A-SMas を開裂して活性化させる。活性化された A-SMase は pre-pro-CTSD を開裂し、CTSD を活性化する。CTSD は後期 TNF 受容体エンドソームから細胞質へ放出する。CTSD は Bid を開裂し、tBid を活性化し、ミトコンドリアへ移動し、シトクロム *c* の放出を促進する。そして、後期 TNF 受容体エンドソームにはプロカスパーゼ-3 とカスパーゼ-3 は後期 TNF 受容体エンドソーム中に局在していないことが明らかになった (116)。以上の報告により、TNF- $\alpha$  が誘発するアポトーシスはカスパーゼ-8 とカスパーゼ-7 を介して行ったことが示された。図 41 に示したように、0.2 mM の PA により、カスパーゼ-8 と caspase-7 の開裂が 4 h 作用で観察され、カスパーゼ-9 とカスパーゼ-3 の開裂が観察されないため、PA が TNF- $\alpha$  を介して外因性経路はまず TNF 受容体エンドソームを形成し、カスパーゼ-8 を開裂させ、カスパーゼ-7 を開裂し、アポトーシスを誘導する。PA は TNF- $\alpha$  を介して外因性経路を誘導する時に、カスパーゼ-3 の開裂を関与していないことが明らかになった。また、Takahashi は 24 h 作用の PA が Jurkat 細胞に対し、ROS の生成を増加させ、 $\Delta\Psi_m$  を低下し、シトクロム *c* を放出し、カスパーゼ-9 を開裂させ、カスパーゼ-3 を開裂し、ミトコンドリア内因性経路を関与してアポトーシスを誘導することも報告した (137)。図 40 に示したように、24 h 作用の PA により、カスパーゼ-9 の開裂が観察されていて、Takahashi の報告と一致している。

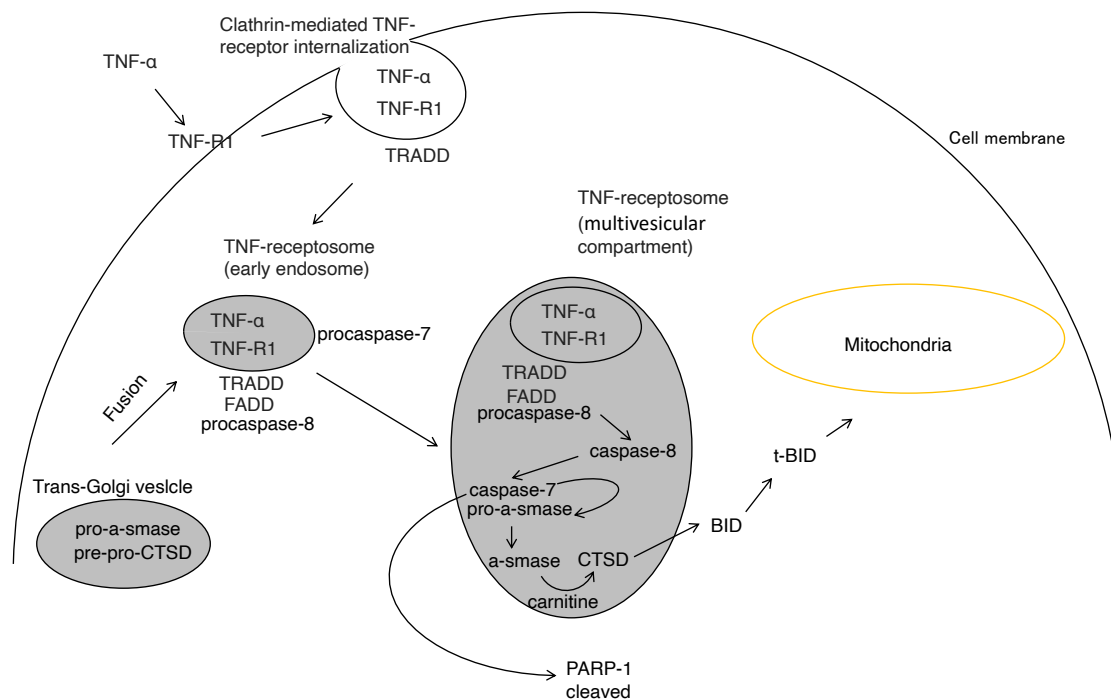


図 50. TNF- $\alpha$  を介してアポトーシス外因性経路

TNF- $\alpha$  が TNF-R1 への結合し、クラスリンを介してエンドサイトーシスを行い、エンドソームを形成する。前期 TNF 受容体エンドソームは TRADD、FADD 及びプロカスパーゼ-8 を補充し、DISC を形成する。エンドサイトーシス経路に沿って、前期 TNF 受容体エンドソームは、pro-A-Smase と pre-pro-CTSD を含むトランスゴルジ小胞と融合して、後期 TNF 受容体エンドソームを形成する。後期 TNF 受容体エンドソームの中に、カスパーゼ-8 によるカスパーゼ-7 を開裂させ、PARP-1 と pro-A-SMas を開裂して開裂させる。開裂された A-SMase は pre-pro-CTSD を開裂し、CTSD を活性化する。CTSD は後期 TNF 受容体エンドソームから細胞質へ放出する。CTSD は Bid を開裂し、tBid を活性化し、ミトコンドリアへ移動する。

また、前章の結果から、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死にはカスパーゼ-3 が関与していないことが示された。そこで、PA は MCF-7 細胞に対するアポトーシスを誘導するか、カスパーゼ-3 の開裂に依存するのかを検討した。PA は MCF-7 細胞に対する細胞傷害性があり、カスパーゼ-7 の開裂を観察したことが示された。この結果から、PA は TNF- $\alpha$  を介してアポトーシス外因性経路により、カスパーゼ-7 を開裂させ、アポトーシスを誘導することが推察された。しかし、0.25 mM の PA では、約 60% の細胞が生きていて、PA は MCF-7 細胞における IC<sub>50</sub> 値が Jurkat 細胞における IC<sub>50</sub> 値の 4.5 倍になることが推定される。このことから、PA はカスパーゼ-3 の開裂に関与している可能性があることが推測された。以上の結果から、PA が MCF-7 細胞の増殖を抑制能力は PA が Jurkat 細胞の増殖を抑制する能力より弱いため、RTE 中 PA 以外の成分が MCF-7 細胞に対する細胞毒性がある。

従って、PA は ROS の生成、中性脂肪の形成、TNF- $\alpha$  の発現及びアポトーシスを誘導する経路をまとめ、図 51 を示した。

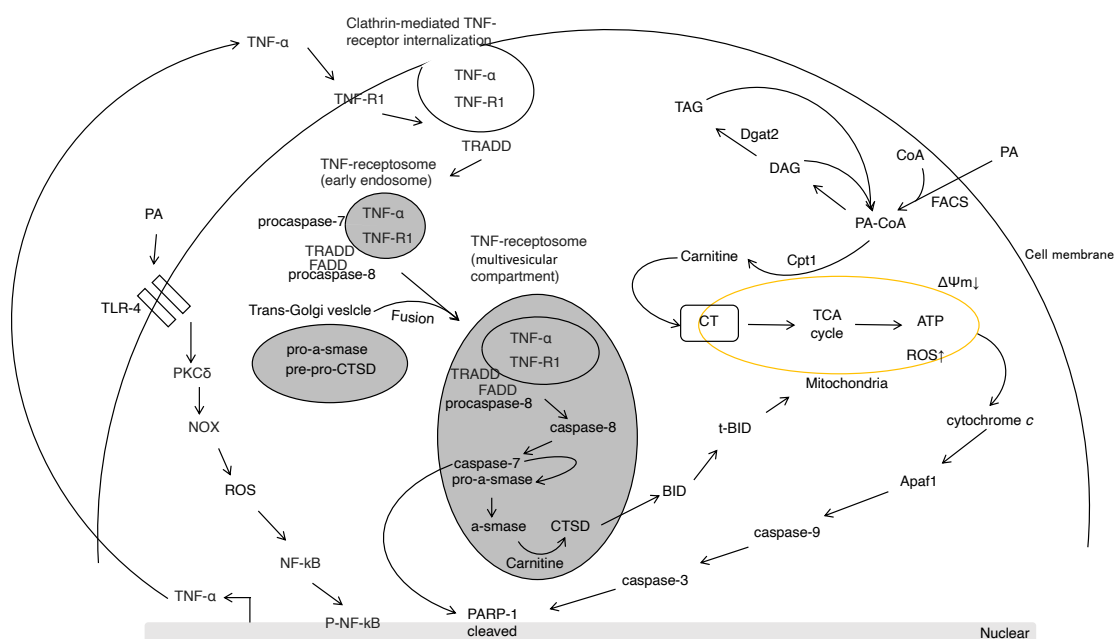


図 51. PA が誘導するアポトーシスのメカニズム

PA は TLR4 を介し、PKC- $\delta$  のリン酸化により、NOX を活性化させ、ROS を生成し、NF- $\kappa$ B をリン酸化させ、細胞核へ移動し、TNF- $\alpha$  の発現量を増加し、炎症を引き起こす。さらに、TNF- $\alpha$  が TNF-R1 への結合し、クラスリンを介してエンドサイトーシスを行い、エンドソームを形成する。前期 TNF 受容体エンドソームは TRADD、FADD 及びプロカスパーゼ-8 を補充し、DISC を形成する。エンドサイトーシス経路に沿って、前期 TNF 受容体エンドソームは、pro-A-Smase と pre-pro-CTSD を含むトランスゴルジ小胞と融合して、後期 TNF 受容体エンドソームを形成する。後期 TNF 受容体エンドソームの中に、カスパーゼ-8 によるカスパーゼ-7 を開裂させ、PARP-1 を開裂し、及び pro-A-SMas を開裂して開裂させる。活性化された A-SMase は pre-pro-CTSD を開裂し、CTSD を活性化する。CTSD は後期 TNF 受容体エンドソームから細胞質へ放出する。CTSD は Bid を開裂し、tBid を活性化し、ミトコンドリアへ移動する。TAG 及び DAG から分解しすることを伴い、遊離 PA の含量を増加させ、ミトコンドリアの酸化的リン酸化系の機能障害を引き起こし、 $\beta$ -酸化と ATP 生成を減少し、ROS の生成を増加させ、 $\Delta\Psi_m$  を低下し、シトクロム c を放出し、カスパーゼ-9 を開裂させ、カスパーゼ-3 を開裂し、PARP-1 を開裂させる。



菅原研究室で行われた実験では、RTE から分離した RTE 3 から PA の含有を推定した。しかし、菅原研究室の実験方法により、アニスアルデヒドの発色を用い、PA が発色されないことが発見した。また、ESI-MS の結果より、Negative mode と Positive mode を用い、Negative mode により、 $m/z$  が 281  $[M-H]^-$  も検出された。一方で、Positive mode により、 $m/z$  が 279  $[M-H]^+$  と 305  $[M-H]^+$  など検出された。この結果より、RTE 3 にはいくつかの物質が含まれていて、RTE 3 の収量から RTE 中の PA 含有量を定量しないと、RTE 中の PA の作用メカニズムと RTE の全体の抗がんメカニズムの解明ができない。そのため、RTE 中の PA 含有量を確認することが必要である。

そこで、RTE 中の PA 含有量を検討するため、菅原研究室の実験方法の一部を参考に、UVA 照射の発色によって、RTE を分離し、フラクションとして回収した。RTE から分離された RTE 9'-12' は Jurkat 細胞に対して細胞傷害性を持っていて、カスパーゼ-3/7 の活性を引き起こし、PARP-1 の開裂も観察されたことから、RTE 9'-12' の中に、PA もしくは他の抗がん成分が含まれていることが示された。さらに、PA は 0-2.5  $\mu\text{g/mL}$  における検量線を作成し、ESI-MS を用いて、PA は Negative mode により、 $m/z$  が 255  $[M-H]^-$  が検出された。

この結果から、RTE 9'-12' を ESI-MS を用いて分析し、RTE 9', 11', 12' は Negative mode による  $m/z$  において、255  $[M-H]^-$  が検出されたため、PA が含まれていることが示唆された。RTE 10' の中に、255  $[M-H]^-$  のピークが検出されなかったことから、PA が含まれていないことが示された。RTE 9' の結果から、255  $[M-H]^-$  のピック強度が 4500 と 281  $[M-H]^-$  のピック強度が 2200 であったことから、RTE 9' の中に PA が 66.7% あると推測された。また、RTE 11' の結果から、255  $[M-H]^-$  のピック強度が 1400 と 283  $[M-H]^-$  のピック強度が 350 であったことから、RTE 11' の中には PA が 80% あり、RTE 12' の結果から、255  $[M-H]^-$  のピック強度が 900 と 279  $[M-H]^-$  のピック強度が 1550 であったことから、RTE 12' の中に PA は 35% あることが推測された。以上の結果から、RTE 中には PA 以外の成分が存在することになる。つまり、PA を含有している RTE はカスパーゼ-3 の開裂を誘導できるはずだが、RTE 添加によるカスパーゼ-3 の開裂を観察できなかったため、RTE の他の成分が PA により誘導されるカスパーゼ-3 の開裂を阻害していることが考えられた。

図 47 の A に示されたことより、RTE 9' には、Negative mode により、 $m/z$  が約 281  $[M-H]^-$  が検出され、オレイン酸 [Oleic acid, OA,  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ , 数値表現 18:1(n-9)] ではないかと考えられた。Yue の脂肪酸化合物の同定の結果から、ヒキノカサには OA が含まれていて、RTE 中に OA を含まれている可能性が高い (80)。また、今回の極性が高いシリカゲルにより、極性が弱い展開溶媒を用い、極性が低い物質がまず分離する (142)。つまり、PA、OA を順番に分離することより、RTE 9' 中に OA が含まれている可能性が高い。

OA は動物性脂肪や植物油に多く含まれている脂肪酸であり、オリーブオイルの主要成分である。炭素原子間の二重結合を介して結合している一価の不飽和脂肪酸である。非脂肪

細胞（膵島ベータ細胞、肝細胞、Tリンパ細胞など）は遊離飽和FAを飽和FA誘発性の脂肪毒性から保護するTAGにエステル結合する能力が制限され、DAGに多く合成する。DAGはPKC- $\delta$ をリン酸化し、ROSを生成する。OAはDgat2の発現を増加し、DAGからTAGへの合成を促進することにより、PA誘発性のDAGの蓄積を減少させる。これにより、OAはPAが誘導するカスパーゼ-3の開裂、ladder状のDNA断片化を抑制し、さらにアポトーシスを抑制することが明らかになった(139)。一方で、過剰なPAにより、OAはDAGからTAGへの合成を促進するが、TAG貯蔵の細胞能力を超えた場合、TAGを加水分解され、細胞の遊離FAレベルが増加し、ROSを生成し、アポトーシスを誘導することも報告した(139)。

OAは正常細胞に対する毒性はなく、細胞保護に関与している(143)。Fischerは腫瘍細胞に致死的なヒト $\alpha$ -ラクトアルブミン(Human  $\alpha$ -Lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells, HAMLET)が $\alpha$ -ラクトアルブミンとオレイン酸の分子複合体である。 $\alpha$ -ラクトアルブミンは強く結合したCa<sup>2+</sup>イオンを放出し、OAの添加により、HAMLETを形成する。HAMLETはがん細胞に対するアポトーシスを誘導し、正常細胞に対する毒性はないことが報告した(144)。OAはHepG2細胞に対する毒性があり、ROSを生成させ、TNF- $\alpha$ の発現を増加させることが報告した(145)。特に、OAはJurkat細胞に対し、sub-G1期の増加、PKC- $\delta$ のリン酸化、ROSの生成、クロマチンの凝縮、 $\Delta\Psi_m$ の低下、カスパーゼ-3/-7の開裂、及びTNF- $\alpha$ の発現の増加を誘導することも報告した(146)。ただし、HallgrenはHAMLETがJurakt細胞に対する誘導するアポトーシスがBcl-2及びp53に依存せず、カスパーゼの開裂を依存する。また、HAMLETはカスパーゼの開裂を非依存的な細胞死誘導していることも報告した(147)。以上のことから、OAは $\alpha$ -ラクトアルブミンに結合させ、HAMLETを形成するから、PKC- $\delta$ のリン酸化により、ROSを生成し、TNF- $\alpha$ の発現量を増加し、カスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導する。また、HAMLETはネクローシスなどの非カスパーゼ依存的な細胞死を誘導すると推測した。

PAとOAの共作用による、Jurkat細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムを図51に示した。OAはDgat2の発現を増加し、PA誘発性のDAGをTAGへの合成を促進することにより、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を維持し、PAがミトコンドリア内因性経路を介してアポトーシスを抑制する。一方で、PAとOAはTLR4を介し、PKC- $\delta$ のリン酸化により、ROSを生成し、TNF- $\alpha$ の発現量を増加した。さらに、TNF受容体エンドソームを形成し、カスパーゼ-8によるカスパーゼ-7を開裂させ、アポトーシスを誘導することが推察された。図52に示したように、PAとOAのアポトーシス誘導メカニズムは、RTEは外因性経路を介し、カスパーゼ-7依存的なアポトーシス様細胞死を誘導することと似ていることが示された。

RTE 9'に、OAが含まれている可能性があるが、定量ができないため、今後の実験で、RTA中のOAの含量を測定すれば、RTEのアポトーシス様細胞死のメカニズムがさらに予測できると考える。そして、RTE 9'-12'には抗がん作用があり、PAやOAが含まれていな

いことから、他の抗がん物質を含んでいる可能性が非常に高く、同定することが必要である。

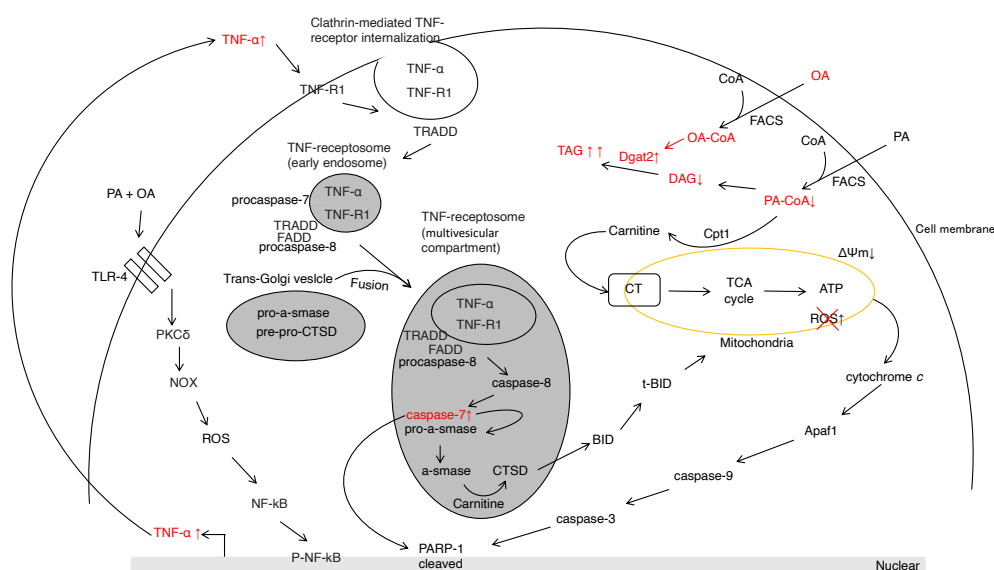


図 52. PA と OA が誘導するアポトーシスのメカニズム

OA は Dgat2 の発現を増加し、PA 誘発性の DAG を TAG への合成を促進することにより、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を維持し、PA がミトコンドリア内因性経路を介してアポトーシスを抑制する。一方で、PA と OA は TLR4 を介し、PKC- $\delta$  のリン酸化により、ROS を生成し、TNF- $\alpha$  の発現量を増加した。さらに、TNF- $\alpha$  が TNF-R1 への結合し、クラスリンを介してエンドサイトーシスを行い、エンドソームを形成する。前期 TNF 受容体エンドソームは TRADD、FADD 及びプロカスパーゼ-8 を補充し、DISC を形成する。エンドサイトーシス経路に沿って、前期 TNF 受容体エンドソームは、pro-A-Smase と pre-pro-CTSD を含むトランスゴルジ小胞と融合して、後期 TNF 受容体エンドソームを形成する。後期 TNF 受容体エンドソームの中に、カスパーゼ-8 によるカスパーゼ-7 を開裂させ、PARP-1 を開裂し、及び pro-A-SMas を開裂して開裂させる。活性化された A-SMase は pre-pro-CTSD を開裂し、CTSD を活性化する。CTSD は後期 TNF 受容体エンドソームから細胞質へ放出する。CTSD は Bid を開裂し、tBid を活性化し、ミトコンドリアへ移動し、シトクロム *c* を放出し、カスパーゼ-9 を開裂させ、カスパーゼ-3 を開裂し、PARP-1 を開裂させる。

## 第5章 総合討論

がんは、世界の多くの地域で主要な疾患として問題になっている(1)、全世界で、2040年には1,640万人ががんによって死亡すると予測されている(2、3)。現在の治療方法には局限性があり、強い副作用を伴っていることが明らかになっている(7)。この問題を解決するため、抗がん性を持ち、正常細胞に対して毒性がなく、人体に対して副作用がない中薬に着目した(53)。RTEは抗腫瘍性が強いことから、化学療法剤に代わり、正常細胞に傷害を引き起こさず、がんに対して効果的に作用し、新しい治療方法になる可能性が高いが、成分が不明であり、アポトーシスと誘導メカニズムも未だ解明されていない。本研究では、*in vitro*でJurkat細胞におけるRTEの抗がん性及び抗がんメカニズムを検討した。

研究の結果から、RTEはJurkat細胞の増殖を有意に抑制したことから、RTEは抗がん性を持っていることが示された。中薬から抽出された特定の成分はがん細胞に対して細胞周期停止を誘導することが報告されている(83)。RTEと細胞周期停止の関係性を検討した結果から、RTEは細胞周期を停止しないことが明らかになった。

アポトーシスの形態学的な特徴として、細胞が丸くなって収縮すること、及び隣接する細胞との剥離、クロマチンの凝縮、核の変形からの核膜崩壊、DNAの断片化、膜ブレブの形成、アポトーシス小体と呼ばれる細胞質ゾル、凝縮したクロマチンおよびオルガネラを含むコンパクトな膜密閉構造に断片化することが確認されている。ネクローシスはアポトーシスとは対照的に細胞膜の完全性の喪失、細胞の膨張及び破壊をもたらし、細胞内の炎症性物質などが放出し、周囲の細胞の炎症を誘導する(15、17)。また、その他の特徴として、カスパーゼ-3及び-7の開裂、ヌクレオソーム単位のDNA断片化及びPARP-1の切断がある(34、41)。また、中薬から抽出された特定の成分はがん細胞に対してアポトーシスを誘導することが報告されている(63)。

RTEは細胞周期の停止を誘導しなかったことから、アポトーシスの関与を確認した。RTEは細胞の収縮と核の凝縮を誘発するが、ヌクレオソーム単位でのDNAの断片化は誘発せず、高分子でのDNA断片化を誘導する可能性がある。したがって、RTEは典型的なアポトーシスではなく、アポトーシス様細胞死を誘発する能力を持つことが示された。

RTEはSub-G1細胞を増加したため、ヌクレオソーム単位でのDNA断片化を誘導できると考えているが、ヌクレオソーム単位でのDNA断片化を誘導しないことが観察した。Mattesよりネクローシス細胞はアポトーシス細胞のようにSub-G1期の増加を引き起こすことから、Sub-G1期の増加は単純にアポトーシス細胞の増加ではなく、ネクローシス細胞の増加も検出できる(114)。Sub-G1期の測定だけではなく、カスパーゼの活性評価をすることで、アポトーシスが誘導されているのかを正確に判断する必要があると考えられる。

RTEが誘導するアポトーシス様細胞死はカスパーゼ依存性があるかどうかを汎カスパーゼ阻害剤を用いて検討した(39、87、116)。汎カスパーゼ阻害剤により、RTEが誘導するアポトーシス様細胞死はカスパーゼに依存していることが示されたが、Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCBは

PARP-1 の開裂を完全に抑制できなかったことから、非カスパーゼ依存的な AIF など、カスパーゼ以外の影響があると予想される (113, 117)。そして、汎カスパーゼ阻害剤 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB は RTE が誘導するアポトーシス様細胞死を抑制したことから、RTE がカスパーゼ-3 の開裂に依存せず、カスパーゼ-7 の開裂を介して PS の露出と Sub-G1 期細胞の増加を誘導することが示された。カスパーゼ-3 が欠損した MCF-7 細胞は、薬剤によって誘導されるアポトーシスとカスパーゼ-3 の関係性を検討するためによく使用されている (86)。RTE が誘導するアポトーシス様細胞死はカスパーゼ-3 の開裂に依存せず、カスパーゼ-7 の開裂に依存していることが示された。これらの結果は、Yang よりアンドログラフオライドが C6 グリオーマ細胞に対してカスパーゼ-7 を介してアポトーシスを誘導するという報告と一致している (118)。

カスパーゼ-3 が主要なアポトーシス関連エフェクターカスパーゼであり、様々な薬剤がカスパーゼ-3 を開裂させ、アポトーシスを誘導する報告が多い (41)。一方で、カスパーゼ-3 を開裂せず、カスパーゼ-7 を介してアポトーシスを誘導する研究は非常に珍しい。RTE はカスパーゼ-3 を開裂させなかったため、RTE の含有成分がカスパーゼ-3 開裂の阻害剤として作用する可能性があることを予想される。そして、RTE によるヌクレオソーム単位での DNA 断片化を誘導しないことは、RTE がカスパーゼ-3 を開裂させないため、DNA 断片化が誘導されない、または RTE の成分の一つがヌクレオソーム単位での DNA 断片化を抑制している可能性があると考えている。例えば、ショウガ科ショウガ属多年草であるウコンの根茎より得たエタノール抽出物であるクルクミンはヌクレオソーム単位での DNA 断片化を阻害することが報告されている (118)。

アポトーシスのシグナル伝達経路には、外因性経路及びミトコンドリア経路がある (25)。外因性経路には、細胞死受容体にデスリガンドが結合して活性化され、DISC を介して、カスパーゼ-8 を開裂させる (26-28)。ミトコンドリア経路は、 $\Delta\Psi_m$  低下及びシトクロム *c* を放出し、カスパーゼ-9 を開裂させる (29-31)。カスパーゼ-8 及び-9 の活性化はカスパーゼ-3 及び-7 を開裂することで、アポトーシスを進行させる。抗アポトーシスタンパク質の Bcl-2 はミトコンドリアの外膜に存在し、シトクロム *c* の放出を阻害する (30)。Bcl-2 の過剰発現は抗がん剤とミトコンドリア経路の関連性を検討するためによく使用されている (30)。Bcl-2 過剰発現を用い、RTE によるミトコンドリア経路への関与性を検討した。Bcl-2 の過剰発現は RTE が誘導するアポトーシス様細胞死を抑制しなかったことから、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死はミトコンドリア経路に依存しないことが示された。これらの結果は、Jiang よりカスパーゼ-8 開裂を介してカスパーゼ-9 開裂を誘導できるという報告と一致している (121)。また、カスパーゼ-8 が開裂すると、tBid がミトコンドリアへ移動し、Bcl-2 を阻害するため、シトクロム *c* の放出を促進することから、RTE もこのメカニズムを誘発する可能性がある (35)。

ヒキノカサの化学組成は非常に複雑であり、栽培技術、収穫時期、土壌、加工などによって品質に影響を与えるため、有効成分が多少異なることがある。ヒキノカサが抗がん治療に

利用できる科学的な根拠を提供するため、RTE の有効成分の同定及び有効成分のアポトーシス誘発メカニズムを解明することが必要である。本研究では、菅原研究室の結果から、PA は RTE の構成成分の一つであると推定した。これらの結果は、Zhang の揮発性油成分の分析、Xiong の脂肪酸化合物の分析、Yue の脂肪酸化合物の分析、Zhou の 70 %のエタノール抽出物の分析から、PA を推定したことと一致している。また、吉見研究室の結果から、PA は RTE の構成成分の一つであることが明らかになった。PA は、最も一般的な飽和脂肪酸であり、細胞膜を作り、皮脂として分泌され、栄養の体内循環に必須である (123、124)。人体組織の PA 濃度の恒常性は厳密に制御されている。PA 濃度の恒常性バランスが崩れると、高濃度の遊離 FA は、脂肪毒性を形成し、細胞機能の障害、炎症とアポトーシスを引き起こす可能性がある (130-136)。以上のことより、PA が RTE の主要な有効成分であるかどうかを検討するため、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死のメカニズムと、PA が誘導するアポトーシスの関連性及び誘導メカニズムの差異を検討した。その結果、PA は Jurkat 細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになった。これらの結果は Takahashi が発見した結果と一致している (137)。また、PA は ROS を生成することにより、TNF- $\alpha$  の発現の増加とミトコンドリアの酸化的リン酸化系の機能障害を引き起こし、カスパーゼ-3 依存的なミトコンドリア内因性経路や外因性経路を介して、アポトーシスを誘導することが推察された (140)。つまり、PA が誘導するアポトーシスメカニズムはカスパーゼ-3 を開裂させるため、RTE が、カスパーゼ-7 のみを介したアポトーシス様細胞死誘導メカニズムと異なっていることが示された。

菅原研究室の結果から、RTE 3 中から、PA が含まれていると推定された。キンポウゲ科に所属する *Nigella sativa* 中 PA の含有量 8.51 %、キンポウゲ科に所属するトリカブト中 PA の含有量 14.24 %により、PA の含有量が高い可能性が高く、これはヒキノカサが他のキンポウゲ属を持っていない塊茎を持っていることが重要な原因だと考えている (148、149)。

さらに、0.2 mg/mL の RTE はカスパーゼ-3 の開裂が誘導できるが、RTE はカスパーゼ-3 の開裂を誘導しないため、RTE に含まれる他の成分によって、PA が誘導するカスパーゼ-3 の開裂を阻害していることが考えられた。また、吉見研究室の結果から、OA が含まれていることが示唆された。Yue の脂肪酸化合物の分析により、ヒキノカサには OA を含んでいることが明らかになっている (80)。OA は動物性脂肪や植物油に多く含まれている不飽和 FA である (139)。 $\alpha$ -ラクトアルブミンは強く結合した  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを放出し、OA の添加により、HAMLET を形成し、がん細胞に対してアポトーシスを誘導し、正常細胞に対する毒性はないことが報告された (144)。特に、OA は  $\alpha$ -ラクトアルブミンに結合し、HAMLET を形成するため、Jurkat 細胞に対して PKC- $\delta$  をリン酸化させることで、ROS を生成し、TNF- $\alpha$  の発現量が増加し、カスパーゼ依存的なアポトーシスを誘導する。また、HAMLET はネクローシスなどの非カスパーゼ依存的な細胞死を誘導すると推測した (147)。そして、OA は DAG を TAG への合成を促進させ、ミトコンドリアの酸化的リン酸化系の機能障害を抑制し、ミトコンドリアの酸化的リン酸化を維持することから、トコンドリア内因性経路

を介したアポトーシスを抑制する。一方で、OA は PA が誘導する TNF- $\alpha$  の発現の増加を促進し、カスパーゼ-7 の開裂に依存的な外因性アポトーシスを誘導することが推察された。つまり、OA と PA を共作用させることにより、カスパーゼ-3 を開裂せず、ミトコンドリア内因性経路非依存的に、TNF- $\alpha$  の発現を増加させ、外因性経路を介したカスパーゼ-7 によるアポトーシスを誘導することが推察される。このアポトーシス誘導メカニズムは RTE が誘導するアポトーシス様細胞死と似ていることが示された。Zhou はヒキノカサの 70 % のエタノール抽出物は TNF を誘発することから、抽出物の有効成分の PA は TNF を誘発する。同様に RTE は PA を含んでいるので、TNF- $\alpha$  の発現を増加できると考えている。つまり、PA と OA を組み合わせることで、RTE の抗がん作用になっていることが考えられる。

ただし、今回 RTE 中の OA 含量を測定していない。RTA 中の OA の含量を測定すれば、RTE のアポトーシス様細胞死のメカニズムがさらに予測できると考える。そして、RTE 10' -12' には抗がん作用があり、PA や OA が含まれていないことから、他の抗がん物質を含んでいる可能性が非常に高く、同定することが必要であり、さらに、RTE のアポトーシス様細胞死のメカニズムを解明させると考えた。また、ヒキノカサ中に他の不飽和 FA を含まれていること明らかになったため、RTE 10' -12' の中に PA の作用メカニズムを抑制している可能性があり、カスパーゼ-3 の開裂を阻害する可能性もある。

図 53 に示したように、RTE が誘導するアポトーシス様細胞死メカニズムを予測した。RTE は外因性経路を介して、カスパーゼ-7 の活性依存的なアポトーシス様細胞死を誘導することが示された。また、RTE の成分は一部同定され、PA が含まれていることが明らかになった。また、RTE 中に OA が含まれていることが推測された。従って、RTE は抗がん効果があり、複数の有効成分を含む可能性があることが示された。

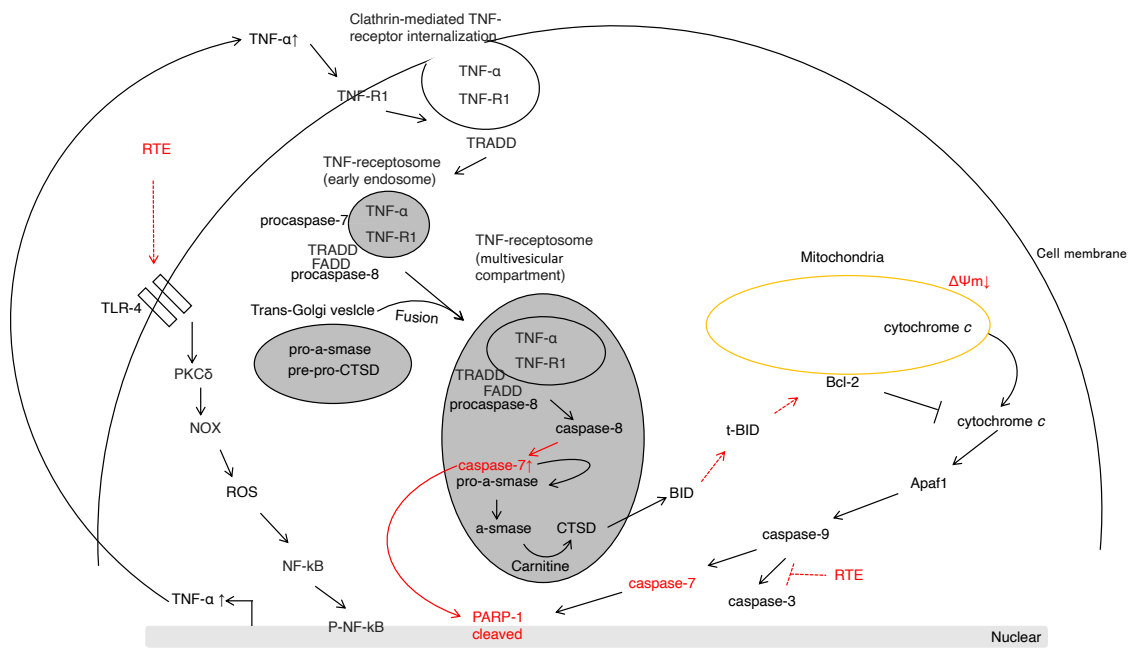


図 53. RTE が誘導するアポトーシス様細胞死のメカニズム

RTE はカスパーゼ-8 を開裂させ、カスパーゼ-7 に依存的なアポトーシス様細胞死を誘導する。



## 参考文献

- 1) David AR and Zimmerman MR. (2010) Cancer: An old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer* 10(10): 728–733.
- 2) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6):394-424.
- 3) Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Graph production: Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Accessed: 23. 12. 2019.
- 4) Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott U, Campbell PJ. (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 43: D805-811.
- 5) Yan Z, Lai Z, Lin J. (2017) Anticancer Properties of Traditional Chinese Medicine. *Comb Chem High Throughput Screen* 20(5):423-429.
- 6) Vinnitsky V. (2014) The development of a malignant tumor is due to a desperate asexual self-cloning process in which cancer stem cells develop the ability to mimic the genetic program of germline cells. *Intrinsically Disord Proteins* 18:2(1): e29997.
- 7) Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, Jemal A, Kramer JL, Siegel RL. (2019) Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69(5):363-385.
- 8) Gabrielli B, Brooks K, Pavey S. (2012) Defective cell cycle checkpoints as targets for anti-cancer therapies. *Front Pharmacol* 2; 3:9.
- 9) Benada J and Macurek L. (2015) Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules* 5(3):1912-1937.
- 10) Pietenpol JA and Stewart ZA. (2002) Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 27:181-182, 475-481.
- 11) Lord CJ and Ashworth A. (2012) The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481(7381):287-294.
- 12) Lawen A. (2003) Apoptosis-an introduction. *Bioassays* 25(9):888-896.
- 13) Vogt C. (1842) Untersuchungen uber die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkroete (Alytes obstetricians). Solothurn: Jent und Gassman, 130.
- 14) Clarke PG and Clarke S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol* 193(2):81-99.
- 15) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239 -257.
- 16) Elmore S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 35(4):

- 495–516.
- 17) Rello S, Stockert JC, Moreno V, Gámez A, Pacheco M, Juarranz A, Cañete M, Villanueva A. (2005) Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* 10(1):201-208.
  - 18) Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22(4):526-539.
  - 19) Julien O and Wells J. (2017) caspases and their substrates. *Cell Death Differ* 24(8):1380-1389.
  - 20) Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W. (2000) Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ* 7(12):1218-1224.
  - 21) Lamkanfi M and Kanneganti TD. (2010) caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 2(1):21-24.
  - 22) Logue SE and Martin SJ. (2008) caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36:1-9.
  - 23) Jin Z and El-Deiry WS. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4(2):139-163.
  - 24) Gaur U and Aggarwal BB. (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 66(8):1403-1408.
  - 25) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14(22):5579-5588.
  - 26) Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276(49):46639-46646.
  - 27) Tsujimoto Y and Shimizu S. (2007) Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 12(5):835-840.
  - 28) Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-1132.
  - 29) Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. (2017) Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie* 135:111-125.
  - 30) Wang X. (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15(22):2922-2933.
  - 31) Adams JM and Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.

- Science 281(5381):1322-1326.
- 32) Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(4): a008714.
  - 33) Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94(4):491-501.
  - 34) Boucher D, Blais V, Denault JB. (2012) caspase-7 uses an exosite to promote poly (ADP ribose) polymerase 1 proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(15):5669-5674.
  - 35) McStay GP, Salvesen GS, Green DR. (2008) Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ* 15(2):322-331.
  - 36) Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. (2007) Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem* 273(18):10815-10818.
  - 37) Sawai H. (2013) Differential effects of caspase inhibitors on TNF-induced necroptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 432(3):451-455.
  - 38) Suita H, Shinomiya T, Nagahara Y. (2017) caspase-6 Induces 7A6 Antigen Localization to Mitochondria During FAS-induced Apoptosis of Jurkat Cells. *Anticancer Res* 37(4):1697-1704.
  - 39) Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276(10):7320-7326.
  - 40) Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. (2008) Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(35):12815-9.
  - 41) Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391(6662):43-50.
  - 42) Gafni J, Cong X, Chen SF, Gibson BW, Ellerby LM. (2009) Calpain-1 cleaves and activates caspase-7. *J Biol Chem* 284(37):25441-25449.
  - 43) Cheung F. (2011) TCM: Made in China. *Nature* 480: S82–S83.
  - 44) Tu Y. (2016) Artemisinin-A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 55(35):10210-10226.
  - 45) Qi F, Zhao L, Zhou A, Zhang B, Li A, Wang Z, Han J. (2015) The advantages of using traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy in the whole course of cancer treatment instead of only terminal stage of cancer. *Biosci Trends* 9(1):16-34.
  - 46) Wu XQ. (1999) Advances in anti-cancer effects of tonic Chinese herbal medicine.

- Hunan Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacology 9: 10-13. (in chinese)
- 47) Pu BK. (1999) Molecular Biology Research on Enhancing Anti-cancer Ability and Anti-metastasis of Traditional Chinese Medicine. Bulletin of Chinese Cancer 10: 447-448. (in chinese)
- 48) Hou W and Li J. (1999) Study on the anti-metastasis of Fuzheng Jiedu Huoxue. Bulletin of Chinese Cancer 10: 449-450. (in chinese)
- 49) Zhang MF and Wang Y. (2009) Application value of blood rheology in diagnosis and prevention of diseases. Laboratory Medicine and Clinic 21: 1870-1871, 1883. (in chinese)
- 50) Li PW. (1999) Possible Ways of Preventing Tumor Metastasis by Traditional Chinese Medicine. Journal of Traditional Chinese Medicine 02: 115-117. (in chinese)
- 51) LI JY and LI DX. (1998) Possible mechanism of anti-tumor metastasis therapy induced by traditional Chinese medicine. Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine 09: 398-400. (in chinese)
- 52) Jiang XL. (2009) Characteristics of Traditional Chinese Medicine Against Cancer, Existing Problems and Research Ideas. Clinical Journal of Traditional Chinese Medicine 21: 351-352. (in chinese)
- 53) Cheng Y and Zhang L. (2013) Research Progress of Antitumor Mechanism of Traditional Chinese Medicine and Drugs. China Pharmaceuticals 22: 103-104. (in chinese)
- 54) Flora of China. (2001) 6: 133-438.
- 55) Flora Republicae Popularis Sinicae. (1980) 27: 24-36, 593-595.
- 56) Chinese Materia Medica. (1999) 3: 95-281.
- 57) Wang J. (2017) Pharmacodynamics and Clinical Application of *Coptis chinensis*. Modern health magazine 01: 72. (in chinese)
- 58) Gao YX, Yu JJ, Du RN, Yang LM, Zhao PW, Sun P. (2019) Effects of water extract of berberine on apoptosis and proliferation of human skin tumor A431 cells. China Medical Herald 16: 21-24. (in chinese)
- 59) Yang YH, Zhang N, Liu LJ, Li KD, Chen J, Zhang JF. (2017) Study on the inhibition of berberine on gastric cancer cells. Journal of Guangdong Pharmaceutical University 33(4): 513-517. (in chinese)
- 60) Tian DF and Tang FQ. (1996) Effect of *Coptis chinensis* and its compound on nasopharyngeal carcinoma tumor-bearing nude mice. Journal of Hunan College of Traditional Chinese Medicine 16: 43-45. (in chinese)
- 61) Liu D, Meng X, Wu D, Qiu Z, Luo H. (2019) A Natural Isoquinoline Alkaloid with Antitumor Activity: Studies of the Biological Activities of Berberine. Front Pharmacol

10:9.

- 62) Zhang YS, Shen Q, Li J. (2015) Traditional Chinese medicine targeting apoptotic mechanisms for esophageal cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* 37(3):295-302.
- 63) Liao YJ, Bai HY, Li ZH, Zou J, Chen JW, Zheng F, Zhang JX, Mai SJ, Zeng MS, Sun HD, Pu JX, Xie D. (2014) Longikaurin A, a natural ent-kaurane, induces G2/M phase arrest via downregulation of Skp2 and apoptosis induction through ROS/JNK/c-Jun pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 5: e1137.
- 64) Zhang L, Yang Z, Tian JK. (2007) Two new indolopyridoquinazoline alkaloidal glycosides from *Ranunculus ternatus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 55:1267-1269.
- 65) Zhou LJ, Tian YQ, He JT. (2017) Pesticide activity and active ingredients of *Ranunculaceae* plants. *Acta AgriculuraeUniversitatis Jiangxiensis* 39:261-271. (in chinese)
- 66) Li C and Wang MH. (2014) Potential Biological Activities of Magnoflorine: A Compound from *Aristolochia debilis* Sieb. et Zucc. *Korean J. Plant Res* 27:223-228.
- 67) Hao DC, He CN, Shen J, Xiao PG. (2017) Anticancer Chemodiversity of *Ranunculaceae* Medicinal Plants: Molecular Mechanisms and Functions. *Curr Genomics* 18:39-59.
- 68) Chen BC, Hang YY, Chen BR. (2002) Advances in medicinal plant *Ranunculus Ternatus*. *Chin Wild Plant Res* 1(4):7-9. (in Chinese)
- 69) Liu XF, Ma J, Chen L, Wang TT, Cao Y, Ma YY. (2019) Microscopic identification of *Ranunculi ternati Radix*. *WCJ · PS* 34(3):258-260.
- 70) Zhang HW, Liu Jm, Zhao QT, Wang JM. (2019) Research Pogression on the Chemical Composition and Quality Control of *Radix Ranuncoli Ternati*. *China Journal of Chinese Medicine* 34(3):961-964. (in Chinese)
- 71) Nong Y. (2017) Cultivation methods of traditional Chinese medicine market darling Maozhaocao. *Friends of farmhouse* 05: 61. (in Chinese)
- 72) Miao YD, Li XJ, Jia YJ. (2014) Research progress on chemical constituents of *Ranunculi Ternati Radix* and their pharmacological effects. *Chin Tradit Herb Drugs* 45(11):1651-1654. (in Chinese)
- 73) Tian JK, Wu LM, Wang AW, Liu HM, Yan H, Wang M, Deng LQ. (2004) Study on the Chemical Constituents of *Ranunculi Ternati Radix* I. *Chinese Pharmaceutical Journal* 09: 661-662. (in Chinese)
- 74) Chen W, Tian JK, Cheng YY. (2005) Study on the Chemical Constituents of *Ranunculi Ternati Radix* II. *Chinese Pharmaceutical Journal* 18: 1373-1375. (in Chinese)
- 75) Xiong Y, Deng KZ, Guo YQ, Gao WY. (2008) Studies on Toxiological chemical constituents of flavonoids and glycosides in *Ranunculus ternatus*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 39(10):1449-1452. (in Chinese)

- 76) Zhang XG and Tian JK. (2006) Studies on chemical constituents of *Ranunculus ternatus* (III). Chin Pharmacol J 41(19):1460-1461. (in Chinese)
- 77) Tian JK, Sun F, Cheng YY. (2006) Chemical Constituents from the roots of *Ranunculus ternatus*. J Asian Nat Prod Res 8(1-2):35-39.
- 78) Zhang HS, Yue XF, Zhang ZQ. (2006) Extraction of Volatile Oil from *Ranunculus ternatus* and GC-MS Analysis of Its Chemical Constituents. China Journal of Chinese Materia Medica 07: 609-611. (in Chinese)
- 79) Xiong Y, Chang MY, Zhang CH, Luo YM, Deng KZ. (2016) Fatty Acids from *Ranunculus ternatus*. Journal of Tropical and Subtropical Botany 24(3): 348-351. (in Chinese)
- 80) Yue XF, Zhang HS, Zhang ZQ. (2007) GC-MS analysis acids in Radix Ranunculi Ternat. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis 27: 665-667.
- 81) Zhou L, Zhang W, Xu J. (1995) Effect of the active components of *Ranunculus ternatus* Thunb. on the inductive production of tumor necrosis factors by macrophages. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 17(6):456-460. (in Chinese)
- 82) Zhang ZL, Wang L, Wu JJ, Zhang HX. (2007) Study on Immunological Activity of Polysaccharides from Chinese Herbal Medicine *Ranunculus Ternatus* Thunb. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research 18(3): 537-539. (in Chinese)
- 83) Hu ZK, Miao MS, Liu HL. (2010) Screening of immunologically active parts of Chinese medicine *Ranunculus Ternatus* Thunb. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine 35(3): 24-26. (in Chinese)
- 84) Niu L, Zhou Y, Sun B, Hu J, Kong L, Duan S. (2013) Inhibitory effect of saponins and polysaccharides from Radix ranunculi ternati on human gastric cancer BGC823 cells. Afr J Tradit Complement Altern Med 10(3):561-566.
- 85) Han HX and LV SJ. (2010). Protective effects of *Ranunculus Ternatus* Thunb polysaccharide on acute chemical liver injury in mice. Laboratory Medicine and Clinic 7(9): 769-770. (in Chinese)
- 86) Xiong YY and Yang CS. (2017) Study on the Petroleum Ether Extracts from *Radix Ranunculi* on Activities of Anti multidrug Resistant Mycobacterium Tuberculosis Journal of Anhui Science and Technology University 31(2): 27-30. (in Chinese)
- 87) LI JY, Liu DJ, Liu JK. (1964) Analysis of 180 Cases of Cervical Lymph Node Tuberculosis Treated by Chinese Herbal Medicine Radix *Ranunculus Ternati*. Tianjin Medical Journal 6(11): 958-962. (in Chinese)
- 88) Wang AW, Wang M, Yuan JR, Tian JK, Wu LM, Geng H. (2004) The Study on Antitumour Efficacy in Vitro of Different Extracts in Radix *Ranunculus Ternati*. Natural Product Research and Development 16(6): 529-531. (in Chinese)
- 89) Sun DL, Xie HB, Xia YZ. (2013) A study on the inhibitory effect of polysaccharides

- from *Radix ranunculus ternati* on human breast cancer MCF-7 cell lines. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 10(6):439-443.
- 90) Tong YL, Yang F, Dai GH, Ren ZM, Wang BB. (2013) Study on activity in vitro of radix *Ranunculus Ternati* saponins on cell A549 of non-small cell lung cancer. *Chin Arch Tradit Chin Med* 31(10): 2181-2184. (in Chinese)
- 91) Tong YL, Yang F, Dai GH, Ren ZM, Wang BB. (2013) Study on the in vitro Activity of *Ranunculus Ternati* Radix Saponins on Non-Small Cell Lung Cancer Cell of NCI-H460. *Chin JMAP* 31(11): 1182-1186. (in Chinese)
- 92) Zhou QA. (2009) Study on *Ranunculus Ternati* saponins on proliferation and apoptosis in colorectal cancer. *Nanjing University of Chinese Medicine*. (in Chinese)
- 93) Yin CP, Fan LC, Zhang LD, Lin ZC He JW, Liu MN, Wang YQ. (2008) The inhibiting effect of extracts in *Radix Ranunculi Ternati* on the growth of human breast cancer cells in vitro. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy* 28(2): 93-96. (in Chinese)
- 94) Wang AW, Yuan H, Sun PY, Yuan JR, Geng H. (2006) Antitumor effect of different extracts from *Radix Ranunculus Ternati* in H22 hepatoma mice. *Chin New Drugs* 15(12):971-974. (in Chinese)
- 95) Nie Y, Hu YM, Yi CZ. (2010) Study on toxicological safety of *Radix Ranunculi Ternati* Extracts. *Practical Preventive Medicine* 17(12): 2507-2509. (in Chinese)
- 96) Katharina K and Bengt F. (2019) Three cell deaths and a funeral: macrophage clearance of cells undergoing distinct modes of cell death. *Cell Death Discov* 5: 65.
- 97) Olivier J, Min Z, Arun PW, Anthony J O'D, Giselle MK, Charles SC, James AW. (2016) Quantitative MS-based Enzymology of caspases Reveals Distinct Protein Substrate Specificities, Hierarchies, and Cellular Roles. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(14): E2001-10.
- 98) Karimian H, Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Golbabapour S, Razavi M, Hajrezaie M, Arya A, Abdulla MA, Mohan S, Ali HM, Noordin MI. (2014) *Ferulago angulata* activates intrinsic pathway of apoptosis in MCF-7 cells associated with G1 cell cycle arrest via involvement of p21/p27. *Drug Des Devel Ther* 8:1481-1497.
- 99) Segawa K and Nagata S. (2015) An apoptotic 'eat me' signal: phosphatidylserine exposure. *Trends Cell Bio* 5(11):639-650.
- 100) Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X. (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). *J Biol Chem* 74(20):13836-13840.
- 101) Xu H, Zhao X, Liu X, Xu P, Zhang K, Lin X. (2015) Antitumor effects of traditional Chinese medicine targeting the cellular apoptotic pathway. *Drug Des Devel Ther* 9:2735-2744.

- 102) Majerciak V, Kruhlak M, Dagur PK, McCoy JP Jr, Zheng ZM. (2010) caspase-7 cleavage of kaposi sarcoma-associated herpesvirus ORF57 confers a cellular function against viral lytic gene expression. *J Biol Chem* 285(15):11297-11307.
- 103) Wang S, He M, Li L, Liang Z, Zou Z, Tao A. (2016) Cell-in-Cell Death Is Not Restricted by caspase-3 Deficiency in MCF-7 Cells. *J Breast Cancer* 19(3):231-241.
- 104) Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. (2018) Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018(6).
- 105) Vis DJ, Bombardelli L, Lightfoot H, Iorio F, Garnett MJ, Wessels LF. (2007) Multilevel models improve precision and speed of IC50 estimates. *Pharmacogenomics* 17(7):691-700.
- 106) Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. (2016) Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2016(9).
- 107) Darzynkiewicz Z., Huang X, Zhao H. (2017) Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology* 119, 5.7.1–5.7.20.
- 108) Newbold A, Martin BP, Cullinane C, Bots M. (2014) detection of apoptotic cells using propidium iodide staining. *Cold Spring Harb Protoc* (11):1202-1206.
- 109) Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. (2016) Quantitation of Apoptosis and Necrosis by annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc* (11).
- 110) Banfalvi G. (2017) Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*. 22(2):306-323.
- 111) Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. (2005) Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 38(4):223-243.
- 112) Majtnerová P and Roušar T. (2018) An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep* 45(5):1469-1478.
- 113) Chaitanya GV, Steven AJ, Babu PP. (2010) PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 8:31.
- 114) Mattes MJ. (2007) Apoptosis assays with lymphoma cell lines: problems and pitfalls. *Br J Cancer* 96(6):928-936.
- 115) Leicht M, Marx G, Karbach D, Gekle M, Köhler T, Zimmer HG. (2003) Mechanism of cell death of rat cardiac fibroblasts induced by serum depletion. *Mol Cell Biochem* 251(1-2):119-126.
- 116) Edelmann B, Bertsch U, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Perrotta C, Jakob M, Adam-Klages S, Kabelitz D, Schütze S. (2011) caspase-8 and caspase-7 sequentially mediate proteolytic activation of acid sphingomyelinase in TNF-R1 receptosomes. *EMBO J* 30(2):379-394.



- 117) Candé C, Vahsen N, Garrido C, Kroemer G. (2004) Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11(6):591-595.
- 118) Yang SH, Wang SM, Syu JP, Chen Y, Wang SD, Peng YS, Kuo MF, Kung HN. (2014) Andrographolide induces apoptosis of C6 glioma cells via the ERK-p53-caspase 7-PARP pathway. *Biomed Res Int* 2014:312847.
- 119) Igney FH and Krammer PH. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002 Apr;2(4):277-88.
- 120) Levenson R, Macara IG, Smith RL, Cantley L, Housman D. (1982) Role of mitochondrial membrane potential in the regulation of murine erythroleukemia cell differentiation. *Cell* 28(4):855-863.
- 121) Jiang C, Wang Z, Ganther H, Lu J. (2001) caspases as key executors of methyl selenium-induced apoptosis (anoikis) of DU-145 prostate cancer cells. *Cancer Res* 61(7):3062-3070.
- 122) Howie D, Ten Bokum A, Necula AS, Cobbold SP, Waldmann H. (2018) The Role of Lipid Metabolism in T Lymphocyte Differentiation and Survival. *Front Immunol*. 8:1949.
- 123) Carta G, Murru E, Banni S, Manca C. (2017) Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Front Physiol* 8:902.
- 124) Gesteiro E, Guijarro L, Sánchez-Muniz FJ, Vidal-Carou MDC, Troncoso A, Venanci L, Jimeno V, Quilez J, Anadón A, González-Gross M. (2007) Palm Oil on the Edge. *Nutrients* 11(9).
- 125) Innis SM. (2016) Palmitic Acid in Early Human Development. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56(12):1952-1959.
- 126) Turner GA, Hoptroff M, Harding CR. (2012) Stratum corneum dysfunction in dandruff. *Int J Cosmet Sci* 34(4):298-306.
- 127) Azzazy HM, Pelsers MM, Christenson RH. (2006) Unbound free fatty acids and heart-type fatty acid-binding protein: diagnostic assays and clinical applications. *Clin Chem* 52(1):19-29.
- 128) Bayeva M, Sawicki KT, Ardehali H. (2013) Taking diabetes to heart--deregulation of myocardial lipid metabolism in diabetic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc* 2(6): e000433.
- 129) Hu X, Ge X, Liang W, Shao Y, Jing J, Wang C, Zeng R, Yao B. (2018) Effects of saturated palmitic acid and omega-3 polyunsaturated fatty acids on Sertoli cell apoptosis. *Syst Biol Reprod Med* 64(5):368-388.
- 130) Prentki M and Madiraju SR. (2008) Glycerolipid Metabolism and Signaling in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 29(6):647-676.
- 131) Zhang C, Luo XX, Yan Y, Zhong S, Zhao L. (2018) Palmitate triggers inflammatory response by upregulating fatty acid translocase in THP-1 macrophages. *Chinese Journal*

- of Pathophysiology 34(3):393-398.
- 132) Wang Y, Qian Y, Fang Q, Zhong P, Li W, Wang L, Fu W, Zhang Y, Xu Z, Li X, Liang G. (2017) Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun* 8:13997.
- 133) Wu D, Liu J, Pang X, Wang S, Zhao J, Zhang X, Feng L. (2007) Palmitic acid exerts pro-inflammatory effects on vascular smooth muscle cells by inducing the expression of C-reactive protein, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Int J Mol Med* 34(6):1706-1712.
- 134) Yuan Q, Zhao S, Wang F, Zhang H, Chen ZJ, Wang J, Wang Z, Du Z, Ling EA, Liu Q, Hao A. (2007) Palmitic acid increases apoptosis of neural stem cells via activating c-Jun N-terminal kinase. *Stem Cell Res* 10(2):257-266.
- 135) Adrian L, Lenski M, Tödter K, Heeren J, Böhm M, Laufs U. (2017) AMPK Prevents Palmitic Acid-Induced Apoptosis and Lipid Accumulation in Cardiomyocytes. *Lipids* 52(9):737-750.
- 136) Oh JM, Choi JM, Lee JY, Oh SJ, Kim HC, Kim BH, Ma JY, Kim SK. (2007) Effects of palmitic acid on TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity in SK-Hep-1 cells. *Toxicol In Vitro* 26(6):783-790.
- 137) Takahashi HK, Cambiaghi TD, Luchessi AD, Hirabara SM, Vinolo MA, Newsholme P, Curi R. (2012) Activation of survival and apoptotic signaling pathways in lymphocytes exposed to palmitic acid. *J Cell Physiol* 227(1):339-350.
- 138) Rastogi R, Geng X, Li F, Ding Y. (2017) NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. *Front Cell Neurosci* 10: 301.
- 139) Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE. (2003) Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(6):3077-3082.
- 140) Han CY. (2003) Roles of Reactive Oxygen Species on Insulin Resistance in Adipose Tissue. *Diabetes Metab J* 40(4):272-279.
- 141) Bertsch U, Edelmann B, Tchikov V, Winoto-Morbach S, Schütze S. (2011) Compartmentalization of TNF-receptor 1 signaling: TNF-R1-associated caspase-8 mediates activation of acid sphingomyelinase in late endosomes. *Adv Exp Med Biol* 691:605-616.
- 142) Lou QM, Li LH, Chen SJ, Yang WE, Zhang JJ, Xue CH. (2017) Analysis of Oleic Acid and Linoleic Acid Isomers by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology* 10:241-247. (in Chinese)
- 143) Němcová-Fürstová V, James RF, Kovář J. (2011) Inhibitory effect of unsaturated fatty acids on saturated fatty acid-induced apoptosis in human pancreatic  $\beta$ -cells: activation

- of caspases and ER stress induction. *Cell Physiol Biochem* 27(5):525-538.
- 144) Fischer W, Gustafsson L, Mossberg AK, Gronli J, Mork S, Bjerkgvig R, Svanborg C. (2004) Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res* 64(6):2105-2112.
- 145) Kwon EB, Kang MJ, Kim SY, Lee YM, Lee MK, Yuk HJ, Ryu HW, Lee SU, Oh SR, Moon DO, Lee HS, Kim MO. (2018) Corrigendum to "Zanthoxylum ailanthoides Suppresses Oleic Acid-Induced Lipid Accumulation through an Activation of LKB1/AMPK Pathway in HepG2 Cells". *Evid Based Complement Alternat Med* 2019:3498219.
- 146) Cury-Boaventura MF, Pompéia C, Curi R. (2004) Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. *Clin Nutr* 23(4):721-732.
- 147) Hallgren O, Gustafsson L, Irjala H, Selivanova G, Orrenius S, Svanborg C. (2006) HAMLET triggers apoptosis but tumor cell death is independent of caspases, Bcl-2 and p53. *Apoptosis* 11(2):221-233.
- 148) Nickavar B, Mojab F, Javidnia K, Amoli MAR. (2003) Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella Sativa* L. From Iran. *Z Naturforsch C J Biosci* 58(9-10):629-631.
- 149) Liang Y, Yan GY, Wu JL, Zong XX, Liu ZQ, Zhou H, Liu L, Li N. (2018) Qualitative and Quantitative Analysis of Lipo-Alkaloids and Fatty Acids in *Aconitum Carmichaelii* Using LC-MS and GC-MS. *Phytochem Anal* 29(4):398-405.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたって、多くの方々にお世話になりました。この場をお借りして感謝の意を述べさせていただきたいと思います。

本研究は東京電機大学において 2015 年 4 月より 2020 年 8 月にわたり行なったもので、その間終始懇篤な指導を与えられた東京電機大学理工学部細胞生化学研究室の長原礼宗教授に対し、ここに謹んで感謝の意を表します。

なお研究に際し多大の便宜を与えられた東京電機大学理工学部生命理工学系の四宮貴久先生、副査をしていただきました東京電機大学川井悟教授、東京電機大学村松和明教授、東京電機大学安部智子准教授、玉川大学上原歩准教授、また第 4 章で述べた PA の同定を提供して下さった東京理科大学理工学部の菅原二三男教授、麻布大学獣医学部紙透伸治准教授、山口東京理科大学薬学部吉見陽児講師、謝ペイティンさんに深厚なる謝意を表します。

そして私の心からの感謝は、吹田博章博士、Sikandan Abudubari 博士、岩澤卓弥博士、酒井博遥さん、また、東京電機大学理工学部の細胞生化学研究室の他のメンバーの献身的な支援に感謝します。

最後に、研究遂行を支え、応援してくれた家族に心から感謝いたします。