



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1487号
学位記番号	第306号
氏名	趙 伯陽
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	茄蒞の細胞致死活性成分に関する研究
論文審査担当者	主査： 中川 秀彦 副査： 牧野 利明，樋口 恒彦，山村 壽男

氏名	ちょう はくよう 趙 伯陽
学位の種類	博士 (薬学)
学位の番号	薬博第 306 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	茄蒂の細胞致死活性成分に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 中川 秀彦 (副査) 教授 牧野 利明 ・ 教授 樋口 恒彦 ・ 准教授 山村 壽男

論文内容の要旨

ナス (*Solanum melongena* L.) は、ナス科の 1 年生草本植物で、原産地のインドから中国、東南アジア、アラビア、アフリカなどに伝播したとされている。その果実(ナス)は特に中国をはじめ東南アジアで広く野菜として用いられている。日本では、正倉院文書中に記載があり、遅くとも 8 世紀ごろまでには日本に渡来し、食用にされてきたものと考えられている。今日までに、さまざまな品種が開発され、さまざまな料理に用いられている。

ナスの果実のがく片部を乾燥したものは茄蒂という生薬で、中国では、軽く焼いて粉末にしたものを口内炎、歯痛の治療に外用するほか、腫れ物の治療に内服して用いられている。わが国では、イボ(尋常性疣贅)の治療にナスのへたの部分の絞り液を塗布することが古来から民間療法として行われてきた。また、尋常性疣贅と同じくヒトパピローマウィルスの感染によって発生する性感染症である尖圭コンジローマの治療にナスのがく片部の ethanol 抽出物が有効であったことが報告されている。

本研究では、これらの民間伝承、臨床報告に注目して、ナスのがく片部の ethanol 抽出物の細胞致死活性を検討し、その活性成分を単離同定するとともに、その細胞致死活性の機構について検討した。

1. 茄蒂からの細胞致死活性成分の単離と同定

市場で購入したナス(品種:千両ナス)の ethanol 抽出物について、いくつかの腫瘍組織由来の細胞株に対する細胞致死活性を MTT 法を用いて評価した。その結果、ナスの抽出物は、ヒト卵巣がん由来細胞株である HRA 細胞に対して IC₅₀ = 500 µg/ml 程度の活性を示したが、その他の細胞株に対する細胞致死活性は低かった。そこでナスを、調理の際には除去してしまうがく片部を含む上部(以下、がく片部)と、食用とする主要部(以下、食用部)に分けて、それぞれから ethanol 抽出物を作成して、HRA 細胞に対する細胞致死活性を比較したところ、がく片部由来抽出物の IC₅₀ は約 100 µg/ml であるのに対して、食用部抽出物の IC₅₀ は約 500 µg/ml であった。HRA 細胞はヒト卵巣の嚢胞腺ガンによる腹水から得られた細胞で上皮性の細胞であることから、尋常性疣贅に対する作用を検討する上でもモデルとなりうるのではないかと考えられた。そこで、ナスのがく片部に含まれる HRA 細胞に対する細胞致死活性成分の単離を activity-guided fractionation によって行った。

ナスのがく片部抽出物を n-hexane 可溶部、ethyl acetate 可溶部、water 可溶部に分画して HRA 細胞に対する細胞致死活性を評価したところ、活性は ethyl acetate 可溶部に集中した。そこで、ethyl acetate 可溶部を silica gel column

chromatography、ODS column chromatography および preparative HPLC によって分画し、最終的に最も活性の高い分画から4つの化合物(Compound 1~Compound 4)を単離することが出来た。Compound 1とCompound 2は得られた量が少なかつたためにそれ以上解析を進めることが出来なかつた。

Compound 3は、¹H-NMRと¹³C-NMRの結果から2組の共役したオレフィンを持つ直鎖脂肪酸であることが示され、これらNMRデータおよびEI-MSスペクトルを既報のものと比較することによって、9-oxo-(10E, 12Z)-octadecadienoic acid (9-EZ-KODE)であると同定した。Compound 4は、そのNMRおよびEI-MSスペクトルがCompound 3とよく類似し、¹H-¹H COSYによりともにトランス構造を有する2組の共役オレフィンの存在が示されることから、9-oxo-(10E, 12E)-octadecadienoic acid (9-EE-KODE)であると同定した。

9-EZ-KODEと9-EE-KODEのHRAに対する細胞致死活性を比較したところ、9-EE-KODEは、9-EZ-KODEよりも約10倍高い細胞致死活性を示した。そこで、9-EE-KODEの各種の細胞株に対する細胞致死活性を比較した。9-EE-KODEのHRA細胞に対するIC₅₀は約6.5 μMと比較的強い細胞致死活性を示すのに対して、他の細胞株に対するIC₅₀は30~74 μMと約5~10倍高い値を示し、HRA細胞に対する特異性が高いことがわかつた。ポジティブコントロールとして用いたadriamycinにはこのような特異性は認められなかつた。

ナスは、わが国において野菜としての長い利用の歴史があり、古くから栽培されている関係で非常に多くの品種が確立されている。市場で購入した各種のナスについて、そのがく片、がく片を除いた頭部、食用とする可食部の9-EE-KODE含量をHPLCを用いて比較定量した。9-EE-KODE含量に品種間に大きな違いは認められなかつたが、いずれの品種でもがく片の含量が最も高かつた。

9-EE-KODEおよび9-EZ-KODEはいずれもlinoleic acidからlipoxygenaseの働きによって生成される化合物でoxylipinと総称される化合物に属している。一般にoxylipinは高等植物においては防御遺伝子の発現におけるシグナル分子として広く存在している。最近、9-EE-KODEが新鮮なトマトから単離され、peroxysome proliferator-activator receptor α (PPAR α)のアゴニスト活性を示すことが報告されている。また、乳製品などに含まれる共役リノール酸(CLA)が抗腫瘍活性を示すことも良く知られているが、9-EE-KODEがHRA細胞に対して比較的強い細胞致死活性を示すことはこれまで知られていなかつた。

2. 茄蒔に含まれる細部致死活性成分の作用機序

これまでに9-EE-KODEについては、新鮮なトマトに含まれPPAR αのアゴニスト活性を持つこと、そのアゴニスト活性はトマトジュースに含まれる13-oxo-(9E, 11E)-octadecadienoic acidよりも弱いことが報告されているが、その他の生理作用に関する報告はない。そこで、9-EE-KODEのHRA細胞に対する細部致死活性をさらに詳細に検討した。

まず最初に、9-EE-KODEのHRA細胞増殖に対する作用をMTT法とBrdU法を用いて検討した。HRA細胞に9-EE-KODEを1~20 μg/mlの濃度で添加し、24時間後の細胞数とBrdUのDNAへの取り込みを測定したところ、いずれも濃度依存的に抑制されていた。

9-EE-KODEによる細胞増殖の抑制がアポトーシスの誘導によるものかどうかを明らかにするために、DNAの断片化の有無を観察したところ、9-EE-KODEは濃度依存的にDNAの断片化を誘導していた。さらに、ヒストン結合DNAのさらに、モノおよびオリゴヌクレオソームレベルでの断片化をELISAを用いて測定することにより、アポトーシスの誘導を確認した。

フォスファチジルセリンは陰性荷電したリン脂質で、正常時は細胞膜の内側に局在しているが、アポトーシスのごく初期に細胞膜の外側に表出し、アネキシンV染色に対して陽性反応示すようになる。9-EE-KODEで24時間処理した細胞では、濃度依存的にアネキシンVで陽性を示す細胞数が増加していた。

9-EE-KODEによるアポトーシスの誘導にカスパーゼ経路が介するかどうかを検討するために、caspase-3/7活性をキットで測定したところ、カスパーゼ活性は濃度、時間依存的に増加した。以上のことから、9-EE-KODEはHRA細胞に対してカスパーゼ経路を介してアポトーシスを誘導したことが明らかとなった。

HRA細胞に対する9-EE-KODEの作用が、ミトコンドリアを介するアポトーシス誘導経路による可能性について検討した。ミトコンドリアの膜電位の変化を測定するため、JC-10色素を用いて、ミトコンドリアへの作用を検討した。この色素は、膜電位を有する正常細胞のミトコンドリアでは凝集して存在し赤色蛍光を発するが、アポトーシスまたはネクローシスした細胞でミトコンドリア膜電位が消失すると、ミトコンドリア外にモノマー状に拡散して緑色蛍光を発する。9-EE-KODEでHRA細胞を処理することにより、JC-10による緑色蛍光は濃度依存的に増加した。このことから、9-EE-KODEの添加に

より HRA 細胞内のミトコンドリアの膜電位が低下したことが認められた。

アポトーシスに関与するミトコンドリア経路では、ミトコンドリア内のシトクロム c と細胞質内シトクロム c の局在変化が、アポトーシスの鍵となるイベントである。HRA 細胞に 9-*EE*-KODE を添加することによって、ミトコンドリア内のシトクロム c の発現量には変化は認められなかったが、細胞質内シトクロム c 発現量は濃度依存的に有意に増加した。

9-*EE*-KODE によるアポトーシス誘導に、抗アポトーシス分子である Bcl-2 サブファミリータンパク質である Bcl-2、Bcl-xL およびアポトーシス促進性分子である Bax の発現量の変化が関与している可能性を検討した。HRA 細胞に 9-*EE*-KODE を処理することにより、Bcl-2 の発現量は減少し、Bax の発現量が増加したことを確認できた。

ナスのヘタを尋常性疣贅の治療に用いるというわが国の民間伝承と、尋常性疣贅と同じく HPV の感染によって生じるヒト尖圭コンジローマの治療にナスのガク片部の EtOH 抽出物が有効であったという臨床報告をもとに、ナスのガク片部からヒト卵巣がん由来の細胞株である HRA 細胞に対して相対的に強い細胞活性を示すオキソ共役リノール酸である 9-oxo-(10*E*, 12*E*)-octadecadienoic acid (9-*EE*-KODE) を単離・同定した。9-*EE*-KODE は、ミトコンドリアにおけるアポトーシス経路を活性化することにより HRA に細胞死を誘導することが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

ナスのがく片部を原料とした生薬である茄蒂が、ヒトパピローマウィルスの原因とする尖圭コンジローマの治療に有用であった治験を受け、ナスのがく片に含まれる抗腫瘍化合物を探索した。各種腫瘍細胞に対するナスのがく片抽出物の細胞致死活性を検討し、ヒト卵巣がん由来の HRA 細胞に対して特に強い細胞致死効果を示した。そこで、その細胞致死活性を指標として各種クロマトグラフィーにより分画を進め、各種スペクトルを解析することにより、9-oxo-(10*E*, 12*E*)-octadecadienoic acid (9-*E*, *Z*-KODE) を活性成分として同定した。本化合物の KB、HRA、ACC-MESO-1、MCF-7、Mia-PaCa-2、HT-1080、P388 の各種ガン細胞株に対する細胞致死活性を比較したところ、HRA に対する特異性が最も高かった。HRA 細胞に対して主にミトコンドリア経路によりアポトーシスを誘導することで細胞致死活性を示し、一部に他の経路も介することが推測された。

本研究はいぼ取りに使用される民間薬である茄蒂の有効成分を単離し、その腫瘍細胞に対する致死活性およびその作用機序を検討したものであり、学位論文として価値のあることを認める。