



## 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

名古屋市立大学学位論文

# 茄蒂の細胞致死活性成分に関する研究

平成 26 年度 (2015 年 3 月)

名古屋市立大学大学院薬学研究科

趙 伯陽  
名古屋市立大学大学院学位論文

# 茄蒂の細胞致死活性成分に関する研究

趙 伯陽

名古屋市立大学大学院薬学研究科  
生薬学分野  
(指導：牧野 利明 教授)

Ph.D. Dissertation

## Cytotoxic constituents from the calyx of eggplants

Baiyang Zhao

Department of Pharmacognosy,  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Nagoya City University  
(Supervisor: Professor Toshiaki Makino)



1. 本論文は、2015年1月、名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査：中川 秀彦 教授

副査：牧野 利明 教授

副査：樋口 恒彦 教授

副査：山村 壽男 准教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

基礎となる報文

1. Baiyang Zhao, Yohei Sakurai, Kiyosumi Shibata, Humitaka Kikkawa, Yutaka Tomoda, Hajime Mizukami

Cytotoxic keto octadecadienoic acids from eggplants

*Jpn. J. Food Chem, Safety, Vol, 21(1), 42-472 (2014)*

2. Baiyang Zhao, Yutaka Tomoda, Hajime Mizukami, Toshiaki Makino

9-Oxo-10E, 12E-octadecadienoic acid, a cytotoxic fatty acid ketodiene isolated from eggplant calyx, induces apoptosis in human ovary cancer (HRA) cells

*J. Nat. Med.* (in press) doi:10.1007/s11418-015-0892-x

3. 本論文の基礎となる研究は、水上 元 名誉教授、牧野 利明 教授の指導の下に、名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

## 目次

序論	1
本論	2
第一章 茄蒂からの細胞致死活性成分の単離と同定	2
第二章 茄蒂に含まれる細部致死活性成分の作用機序	14
考察	25
実験方法	27
引用文献	32
謝辞	34

## 序論

がんは、肥満、糖尿病、高脂血症、高血圧と同様に生活習慣病の一つであり、1981 年以來、日本における死因の第一位となっている。これに心疾患、脳血管疾患など動脈硬化性疾患が次いでいる。がんに限らず、病気にならないように予防（一次予防）するのが理想であるが、ひとたびがん細胞が生じた場合でもその特性を制御することにより、悪性を阻止しその顕在化を抑制（二次予防）できるかもしれない。もしそのようなことが食品成分で可能であるならば、診断されてから処方される薬品に比べて、日常的に摂取する食品は二次予防の観点から有利であると考えられる<sup>[1]</sup>。

現在、世界の先進国の新薬開発の手順は、基礎研究、前臨床試験、臨床試験、承認申請・製造販売となり、5 年から 18 年の月日を費やし、総費用は 200 億円から 300 億円かかるといわれている<sup>[2]</sup>。そのなかでも基礎研究は、創薬目的によってリードあるいはリード化合物になりうる化合物を発見・合成し、細胞に対しての毒性や薬効の試験を実施するため、労力がかかるのは事実である。がんに対する治療薬の開発では、正常細胞には無いがん細胞の二大特性である無限増殖性と転移性を阻害する薬物が求められ、これらを細胞培養系で再現する系を構築し、がんの顕在化を防ぎ二次予防に有用な成分の探索と作用機構の細胞工学的解析が、これまで行われてきている。

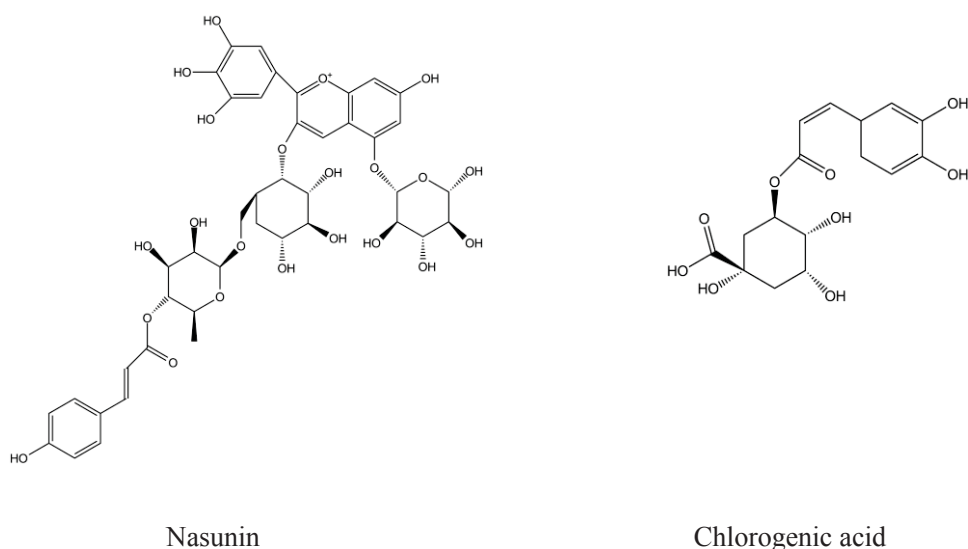
そのような中、我々の毎日の食生活の中で、様々な野菜に含まれる成分に、がん細胞の成長および増殖を抑制する作用があることが注目されてきている。例えば、アブラナ科の野菜に含まれる天然のインドール類やイソチオシアネート類は、ヒト大腸がん細胞に対してアポトーシス（プログラム細胞死）を誘導し、DNA の変異に対する防御力を高める効果がある<sup>[3]</sup>。ミシガン大学総合がんセンターの研究者らの新たな研究によれば、ブロッコリー由来の化合物は、がん幹細胞を標的にすることで、乳がんの予防や治療に役立つ可能性がある<sup>[4]</sup>。

本研究では、古くから食材として世界各国で利用されているナスを取り上げ、ナスに含まれる腫瘍細胞に対する致死活性を持つ物質の探索と、その作用機序の解明を目的とした研究を行った。ナスの原産地はインドの東部で、その後ビルマを経由して中国へ渡り、日本には奈良時代に奈須比（なすび）として伝わったと考えられている。ナスは中国でも日本でも 1000 年以上に渡り栽培されている。また、ナスは世界の各地で独自の品種が育てられており、日本では加賀茄子などの一部の例外もあるものの、南方ほど長実または大長実で、北方ほど小実品種となり、本州の中間地では中間的な中長品種が栽培されてきた。日本で栽培される栽培品種のほとんどは果皮が紫色又は黒紫色であるが、ヨーロッパやアメリカ等では白・黄緑色・明るい紫、さらに縞模様の品種も広く栽培されている。ナスの果肉は密度が低くスポンジ状で、へタの部分には鋭いトゲが生えているが、穫の作業性向上や実に傷がつくという理由からトゲの無い品種も開発されている<sup>[5]</sup>。本研究では、ナスに含まれる細胞致死活性成分のナス品種間の比較も行った。

## 本論

### 第一章 茄蒂からの細胞致死活性成分の単離と同定

日本において代表的な夏野菜のひとつであるナスは、918年に発刊された『本草和名』に収載されている薬用植物でもあり、花、果実のへた、果肉などが薬用として使用されている。ナスは日本の民間薬としては、消炎、止血、解熱などの目的で食あたり、イボ（疣贅）取り、乳腺炎、腫れ物、あかぎれなどに使われる。また腫れ物、霜焼け、歯槽膿漏の予防のためには、ナスのへたを日干しにして乾燥したもの（茄蒂）を煎じた液を塗布することにより治るとされる。ナスの果実の皮には、アントシアニンの一種であるナスニンや、俗にポリフェノールと称されるクロロゲン酸が含まれ、抗酸化作用がある (Figure 1)<sup>[6]</sup>。



**Figure 1** Chemical structure of nasunin and chlorogenic acid

ナス（特になす片部、茄蒂）が疣贅の治療に伝統的に用いられてきたことに着目した友田豊博士（名古屋大学名誉教授、産科婦人科学、友田クリニック院長）は、疣贅と同様にヒトパピローマウィルスを原因とする尖圭コンジロームの治療に、ナスがく片由来の抽出物を用いたところ良好な臨床成績を得ている<sup>[7]</sup>。しかしながら、ナスの有効成分に未だ不明である。

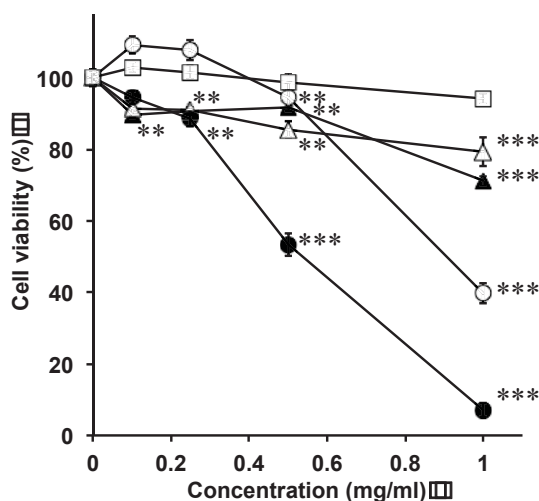
そこで、各種様細胞に対するナス抽出物の致死活性を評価し、有用成分の単離、同定を行った。また、その細胞致死活性の機序についても検討した。



## 1. 茄蒂からの細胞致死活性成分の単離

### 1-1 ナスエタノール抽出エキスの細胞致死活性における各種がん細胞のスクリーニング

茄蒂を加熱乾燥後、エタノールを加えて冷浸抽出して得たエキスのヒト口腔類表皮癌 (KB)、ヒト卵巣がん細胞 (HRA)、ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293)、ヒト肝細胞癌細胞株 (HLE)、ヒト子宮頸癌 (HeLa) に対する細胞致死活性を MTT 法により測定した。その結果、茄蒂エタノールエキスは、HEK293 細胞と HRA 細胞に対して濃度依存的に細胞致死活性を示した一方で、KB 細胞、HLE 細胞と HeLa 細胞には細胞致死活性を示さなかった。HRA 細胞に対する茄蒂エタノール抽出エキスの  $IC_{50}$  は、 $0.5 \mu\text{g/ml}$  で、他の細胞と比較して最も強い細胞増殖抑制活性を示した (Figure 2)。



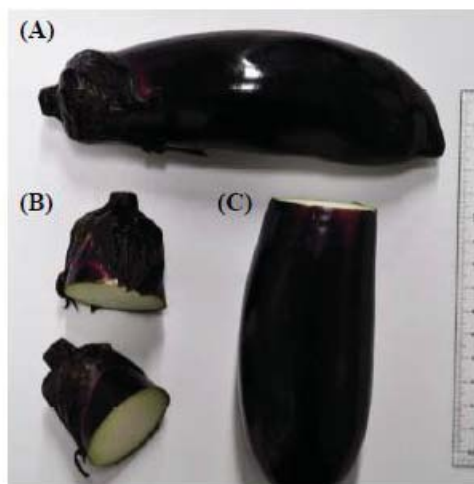
**Figure 2** Cytotoxicity of the ethanol extracts of eggplant calyx against four different cell lines. Closed circles, HRA (human ovarian cancer); open circles, HEK293 (human embryonickidney); closed triangles, HLE, (human hepatoma); open triangles, HeLa (human cervical cancer), KB (open square). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ), and  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs control (0 mg/ml) group evaluated by Bonferroni / Dunnett's multiple  $t$ -test.

卵巣は子宮の両側にある親指大の臓器で、生殖細胞である卵子がそこで成熟し放出されると同時に周期的に女性ホルモンを分泌する働きをしている。HRA はヒト卵巣の嚢胞腺がんによる腹水から得られた細胞で、ヒト卵巣腫瘍組織モデルとして確立された、歴史的には比較的新しい細胞種である。上皮性の腫瘍であることから、疣贅に対する作用を検討する上でも適切なモデルとなりうると考え、以下の実験は HRA を用いて、実験を行うこととした。

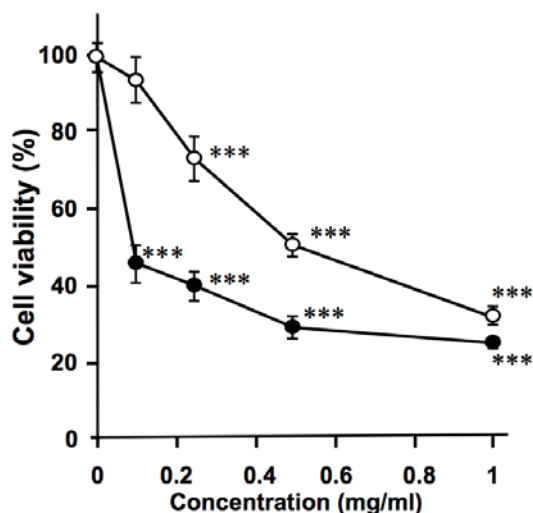
## 1-2 ナス果実各部位のエタノール抽出エキスのがん細胞に対する細胞致死活性

ナス果実のがく片部分とそれ以外の部分の活性を比較するために、Figure 3のように、ナス果実のがく片部と可食部を分離して、それぞれ乾燥後、エタノール抽出エキスを得た。それぞれのエキスのHRA細胞に対する細胞致死活性をMTT法により検討したところ、がく片部分の方に活性が強く見られた (Figure 4)。ナス果実に含まれるHRAに対する細胞致死活性成分は、可食部よりもがく片部分に多く含まれると考えられた。

以上のことから、今後の実験ではナスのがく片である茄蒂を研究材料として使用することとした。



**Figure 3** Eggplants used in the present investigation. Eggplants (Senryo-nasu, A) were cut into the calyx parts (B) and the edible parts (C).



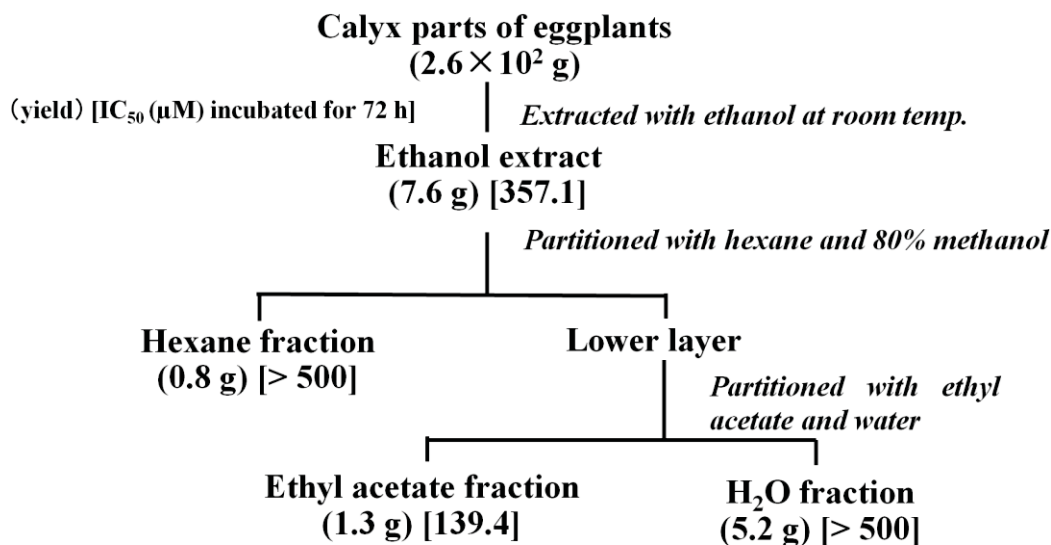
**Figure 4** Cytotoxicity of the ethanol extracts prepared from the calyx parts (closed circles) and from the edible parts (open circles) of eggplants. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 6$ ), and  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs control (0 mg/ml) group evaluated by Bonferroni / Dunnett's multiple  $t$ -test.

## 2. ヒト卵巣がん細胞（HRA）に対する細胞致死活性成分の茄蒂からの単離

### 2.1 HRAに対する細胞致死活性を指標とした茄蒂エタノールエキスの分画

ナス果実にはHRAに対して細胞致死活性があり、その活性成分はがく片部分により多く含まれていることが明らかになった。そこで、その活性を指標として、茄蒂からの活性成分の単離を試みた。

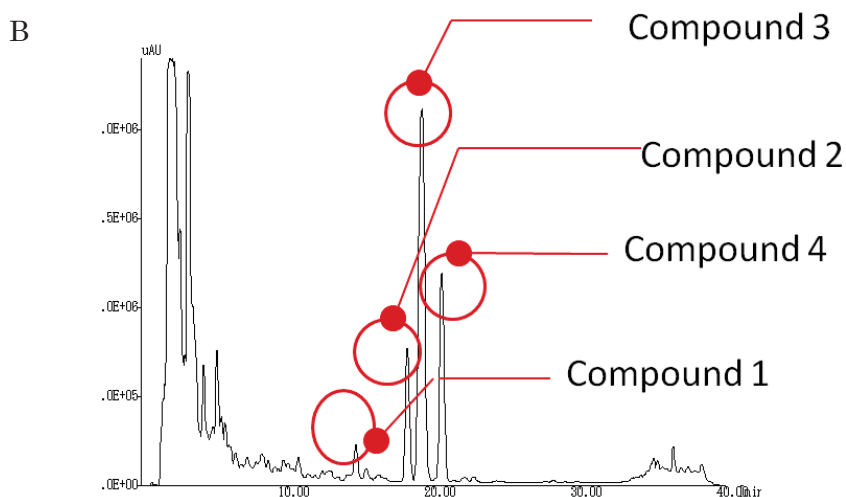
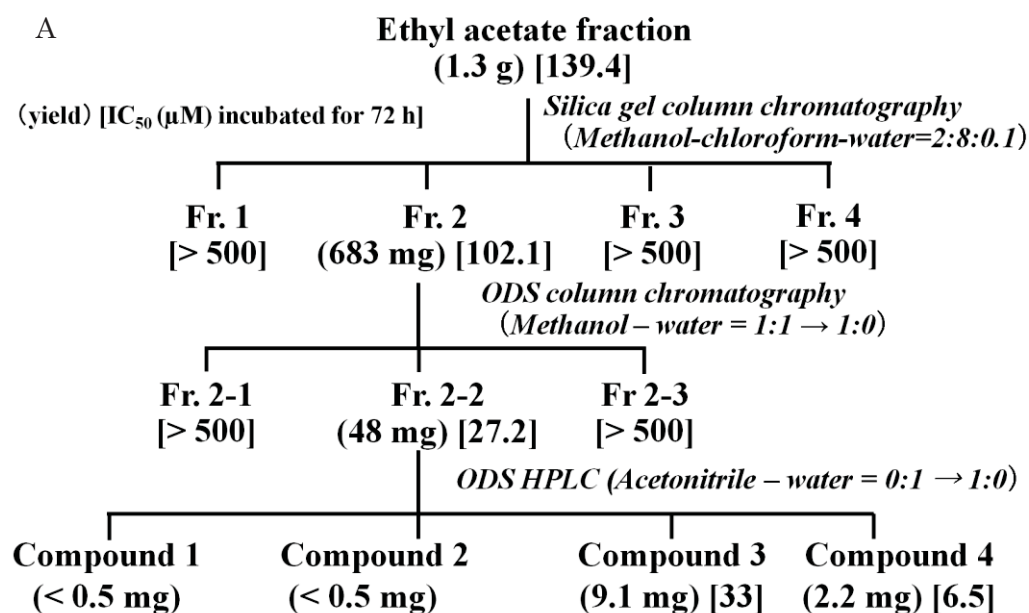
新鮮なナス 10 kg からがく片部 2.8 kg を得て、加熱乾燥し、乾燥物 $2.6 \times 10^2$  g を得た。これを 80%エタノールで冷浸抽出を3回行い、ろ液を合わせ、濃縮乾固した (7.6 g)。これを80%エタノールに溶解し、n-ヘキサンで分配し、n-ヘキサン画分 (0.8 g) を得た。次に80%エタノール画分を濃縮乾固し、水に懸濁後、酢酸エチルで分配し、酢酸エチル画分 (1.3 g) と水画分 (5.2 g) を得た。そして、HRA細胞に対する致死活性を比較したところ、活性はn-ヘキサン画分、水画分には認められず、酢酸エチル画分にはほぼ集中し、その  $IC_{50}$  は  $41 \mu\text{g/ml}$ であった (Figure 5)。



**Figure 5** Activity-guided fractionation of eggplant calyx.  $IC_{50}$ , concentration of the fraction required for 50% inhibition of proliferation of HRA cells.

そこで、酢酸エチル画分について、クロロホルム/メタノール/水 (80 : 20 : 1) を移動相としたシリカゲルクロマトグラフィーを用いて分離し、Fr. 1、Fr. 2、Fr. 3、Fr. 4を得た。細胞致死活性を比較したところ、Fr. 2 (0.68 g) に強い活性が見られた ( $IC_{50}$ ,  $30 \mu\text{g/ml}$ )。Fr. 2をさらにメタノール/水を移動相としたODS逆層クロマトグラフィーによって分離を行ったところ、Fr. 2-1、Fr. 2-2とFr. 2-3を得た (Figure 6)。それらのHRAに対する細胞

致死活性を比較したところ、Fr. 2-2に比較的強い活性が認められた ( $IC_{50}$ , 8.0  $\mu$ g/ml)。そこで Fr. 2-2 をさらに分取HPLCで分画し、compound 1 (< 0.5 mg)、compound 2 (< 0.5 mg)、compound 3 (9.1 mg)、compound 4 (2.2 mg)を得た (Figure 6)。Compound 1と2は、収量が少なかったため、これ以上の解析は出来なかった。Compound 3と4のHRA細胞に対する致死活性 ( $IC_{50}$ ) は、それぞれ 9.7  $\mu$ g/mlと1.9  $\mu$ g/ml であった。



**Figure 6** Activity-guided fractionation of the ethyl acetate fraction of eggplant calyx extract. (A) Cascade of the fractionation.  $IC_{50}$ , concentration of the fraction required for 50% inhibition of proliferation of HRA cells. (B) RP-HPLC chromatograms of Fr. 2-2. Column:  $C_{18}$ -AR-II (10 × 150 mm), solvent: A ( $H_2O$ ) - B ( $CH_3CN$ ), 0 - 100 (0 - 30 min), flow speed: 3 ml/min; wave length: 280 nm.

### 3. 単離した成分の構造解析

#### 3.1 Compound 3 の構造解析

Compound 3 の構造を  $^1\text{H}$ -および  $^{13}\text{C}$ -NMR と EI-MS で解析した。NMR の分析結果を Table 1 に示す。

Compound 3 の  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析では、メチル炭素 1 本、メチレン炭素約 10 本、メチン炭素 4 本のシグナルが観測された。 $^1\text{H}$ -NMR 分析では、オレフィンを示すシグナルが二組 ( $\delta_{\text{H}}$  6.16 ppm, 1H, d, 15.0 Hz,  $\delta_{\text{H}}$  7.48 ppm, 1H, dd, 15.0 Hz /  $\delta_{\text{H}}$  6.11 ppm, 1H, dd, 10.7 Hz,  $\delta_{\text{H}}$  5.90 ppm, 1H, dt, 10.7 Hz, 8.0 Hz) 観測された。また、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY により二組のオレフィンのプロトン間のカップリングが観測されたことから、これらは共役したオレフィンであり、カップリング定数より一組はトランスもう一組はシスの構造であると推測された。

また  $^{13}\text{C}$ -NMR では見られなかったが、二次元 HMBC 分析では、( $\delta_{\text{H}}$  2.34 ppm /  $\delta_{\text{C}}$  176.5 ppm) と ( $\delta_{\text{H}}$  2.54 ppm /  $\delta_{\text{C}}$  200.1 ppm) のシグナルが観測されたことから、カルボニル基が二つ存在することが示唆された。それ以外は  $\delta_{\text{C}}$  20 ~ 30 ppm のシグナルと  $\delta_{\text{H}}$  1.2 ~ 1.6 ppm、16H のシグナルが観測されたことから、compound 3 は直鎖脂肪酸の可能性が高いと考えられた。

さらに EI-MS を測定したところ  $[\text{M}+\text{H}^+]$   $m/z = 294$  の分子イオンピークが観測され、さらに  $m/z = 276, 223, 171, 166, 155, 95$  のフラグメントピークが観測された。また HI-MS の解析から、compound 3 の分子式は  $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$  と予想された。以上のことから、compound 3 は、9-oxo-(10E,12Z)-octadecadienoic acid (9-E,Z-KODE) であると決定した (Figure 7)。

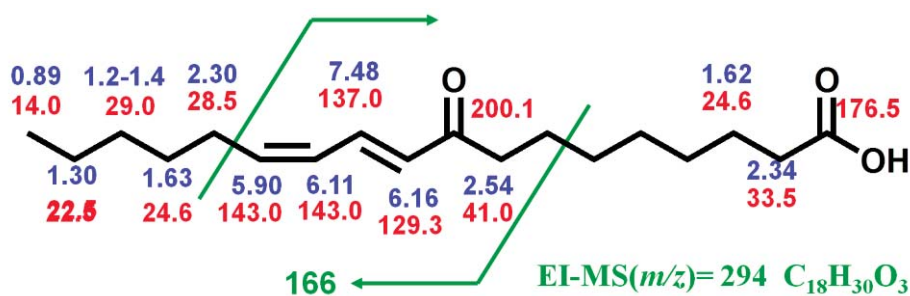


Figure 7 Chemical structure of 9-oxo-(10E,12Z)-octadecadienoic acid (9-E,Z-KODE)

Upper number,  $^1\text{H}$ -NMR (ppm), lower number,  $^{13}\text{C}$ -NMR (ppm)

Table 1.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of compound **3**.

Proton number	$^1\text{H}$ -NMR data (ppm)	$^{13}\text{C}$ -NMR data (ppm)
1	-	176.5
2	2.34 (t, $J = 7.7\text{Hz}$ )	33.5
3	1.62 (m)	24.6
4~7	1.2 - 1.4 (m)	29.0 - 31.5
8	2.54 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$ )	41.0
9	-	200.1
10	6.16 (d, $J = 15.0\text{ Hz}$ )	129.4
11	7.48 (dd, $J = 15.0, 11.4\text{ Hz}$ )	137
12	6.11 (dd, $J = 11.4, 10.7\text{ Hz}$ )	126.9
13	5.90 (dt, $J = 10.7, 8.1\text{ Hz}$ )	143.0
14	2.30 (dt, $J = 7.8\text{ Hz}$ )	28.5
15	1.63 (m)	24.6
16	1.2-1.4 (m)	29.0
17	1.3 (m)	22.5
18	0.89 (t, $J = 6.9\text{ Hz}$ )	14.0

### 3.2 Compound **4** の構造解析

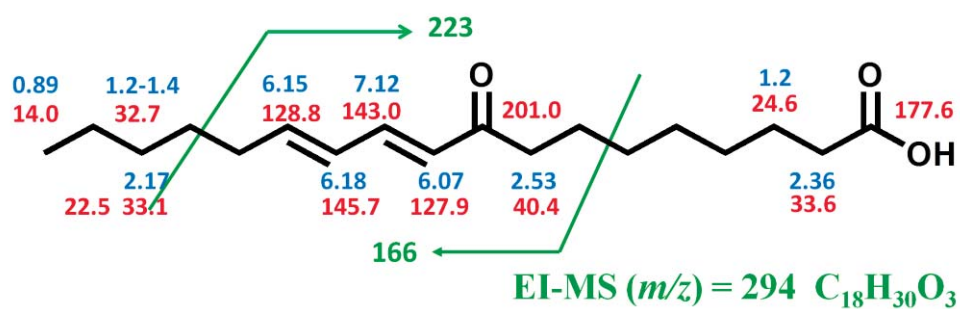
Compound **4** は  $^1\text{H}$ -、 $^{13}\text{C}$ -NMR および EI-MS で測定した。NMR の分析結果を Table 2 に示す。

Compound **4** の  $^{13}\text{C}$ -NMR 分析では、メチル炭素 1 本、メチレン炭素約 10 本、メチン炭素 4 本のシグナルが観測された。 $^1\text{H}$ -NMR 分析では、オレフィンを示すシグナル ( $\delta_{\text{H}} 6.07\text{ ppm}$ , 1H, d, 15.4 Hz、 $\delta_{\text{H}} 7.12\text{ ppm}$ , 1H, dd, 15.4 Hz)、( $\delta_{\text{H}} 6.16 \sim 6.18\text{ ppm}$ , 2H, m) が観測された。また、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY により、二組のオレフィンのプロトン間のカップリングが観測されたことから、これらは共役したオレフィンで、Compound **3** とよく類似し、ともにトランス構造であると推測された。このことから、compound **4** は直鎖脂肪酸の可能性が高いと考えられた。

さらに compound **4** の EI-MS を測定したところ、 $[\text{M}+\text{H}^+]$   $m/z = 294$  の分子イオンピークと、 $m/z = 223, 171, 166, 151, 95$  などのフラグメントピークが観測された。HI-MS の分析結果から、compound **4** の分子式は、 $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$  と予想された。以上のことから、compound **4** は、9-oxo-(10*E*,12*E*)-octadecadienoic acid (9-*E*,*Z*-KODE) であると決定した。

Table 2  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data of compound **4**.

Proton number	$^1\text{H}$ -NMR data (ppm)	$^{13}\text{C}$ -NMR data (ppm)
1	–	177.6
2	2.36 (t, $J = 7.3$ Hz)	33.6
3~7	1.2 - 1.6 (m)	22.5 - 32.7
8	2.53 (t, $J = 7.3$ Hz)	40.4
9	–	201.0
10	6.07 (d, $J = 15.4$ Hz)	127.9
11	7.12 (dd, $J = 15.4, 9.8$ Hz)	143.0
12	6.15 (m)	128.8
13	6.18 (m)	145.7
14	2.17 (m)	33.1
15~17	1.2-1.6 (m)	22.5 - 32.7
18	0.89 (t, $J = 7.0$ Hz)	14.0



**Figure 8** 9-oxo-(10*E*, 12*E*)-octadecadienoic acid (9-*E,Z*-KODE)

Upper number,  $^1\text{H}$ -NMR (ppm), lower number,  $^{13}\text{C}$ -NMR (ppm)

#### 4. 各種がん細胞に対する9-*E,E*-KODE細胞致死活性の比較

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、両方とも炭素骨格の炭素-炭素結合として二重結合のトランスが有する共役オレフィンの直鎖脂肪酸であり、oxylipin と総称される化合物群に属している。Oxylipinは共役リノール酸としては反芻動物から見つかった不飽和脂肪酸で、反芻動物の消化管内で微生物が産生する。Oxylipinはウシの乳や乳製品に含まれる脂質の0.34 – 1.07%、牛肉に含まれる脂質の0.12 – 0.68%を占めるという報告がある<sup>[8]</sup>。また、oxylipinは、運動を行い適切な時間にリノール酸を摂取する事で効率的に体脂肪を燃焼させることや、中性脂肪や悪玉コレステロールを減らし、生活習慣病（肥満・高血圧・脳血管疾患・心臓病・がん等）を予防することなどを目的とした健康食品として使用されている。また、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。

最近では、9-*EE*-KODEについては、新鮮なトマトに含まれ、PPAR $\alpha$ のアゴニスト活性を持つこと<sup>[9]</sup>、そのアゴニスト活性は、トマトジュースから単離された13-*EZ*-KODE よりも弱いことが報告されているが<sup>[10]</sup>、9-*EE*-KODEの細胞致死活性に関する報告はない。9-*EE*-KODEと9-*EZ*-KODEのHRA細胞に対する致死活性は、9-*EE*-KODEのほうが強かったことから、9-*EE*-KODEのHRAに対する細致死活性をさらに詳細に検討することとした。

KB、HRA、ACC-MESO-1（ヒト悪性中皮腫細胞）、MCF-7（ヒト乳がん細胞）、Mia-PaCa-2（ヒト膵臓ガン細胞）、HT-1080（ヒト繊維肉腫細胞）、P388（マウス白血病細胞）に対する9-*EE*-KODEの細胞致死活性を検討したところ、HRAに対するIC<sub>50</sub>は6.5  $\mu$ Mと比較的強い細胞致死活性を示したのに対して、他の細胞株に対するIC<sub>50</sub>は32~74  $\mu$ Mと、約5~10倍高い値を示し、HRAに対する特異性が比較的に高いことがわかった。一方、ポジティブコントロールとして用いた adriamycin（抗悪性腫瘍剤）は、HRA、KB、P388に対して強い細胞致死活性を示した（Table 3）。



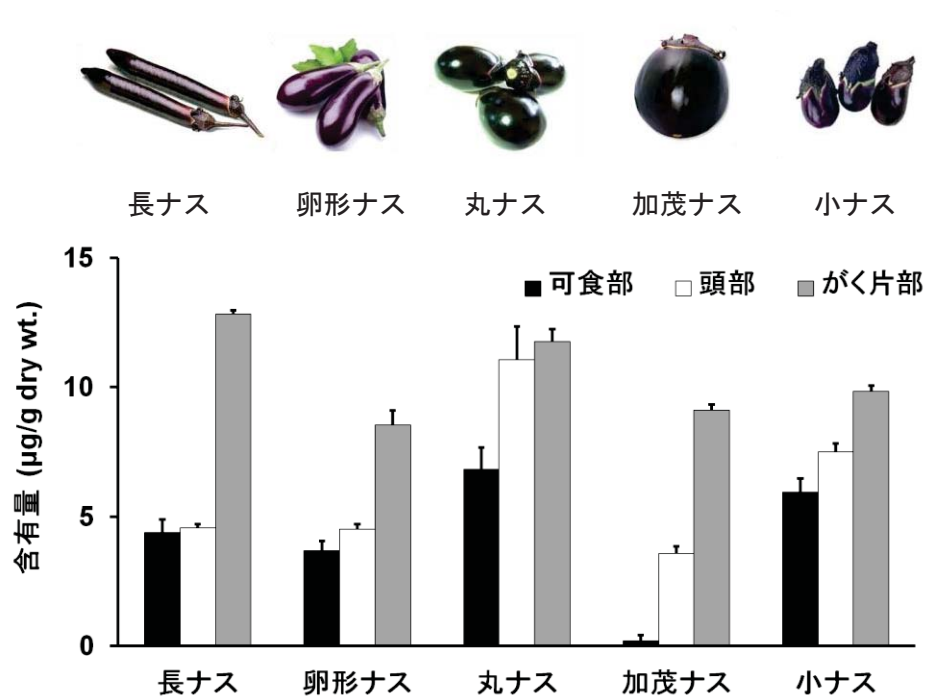
**Table 3** Cytotoxicity of 9-*EE*-KODE against various cancer cells.

Cell line	Origin	IC <sub>50</sub> (μM)	
		9- <i>EE</i> -KODE	Adriamycin
HRA	Human ovarian cancer	6.5 ± 1	0.15 ± 0.01
MIA PaCa-2	Human pancreatic cancer	32 ± 3	1.4 ± 0.1
HT-1080	Human fibrosarcoma	43 ± 2	0.72 ± 0.27
KB	Human cervical carcinoma	54 ± 19	0.18 ± 0.00
ACC-MESO-1	Human malignant mesothelioma	59 ± 8	0.76 ± 0.08
MCF-7	Human breast cancer	74 ± 23	0.57 ± 0.17
P388	Mouse leukemia	48 ± 6	0.18 ± 0.00

Data are expressed as mean ± S.E. ( $n = 3$ ).

## 5. 各種の茄子に含まれる9-*E,E*-KODE量の測定

ナスは、わが国において野菜として利用する長い歴史があり、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。従って、各種ナスに含まれる 9-*EE*-KODE の含量が異なる可能性がある。そこで、市場で販売されている各種ナスを購入し、果実のがく片部、頭部、可食部それぞれを乾燥後、酢酸エチルで抽出し、HPLC で 9-*EE*-KODE の含量を定量した。その結果、可食部においては、加茂ナスにおいて他のナスと比較して 9-*EE*-KODE 含量が低く、またいずれの品種においても可食部と比較してがく片部により高い含量を含むことがわかった。また、いずれの品種においても、がく片部に含まれる 9-*EE*-KODE の含量に、大きな違いは認められなかった (Figure 9)。



**Figure 9** The contents of 9-oxo-(10E, 12E)-octadecadienoic acid (9-EE-KODE) in the eggplants of various cultivars. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ )

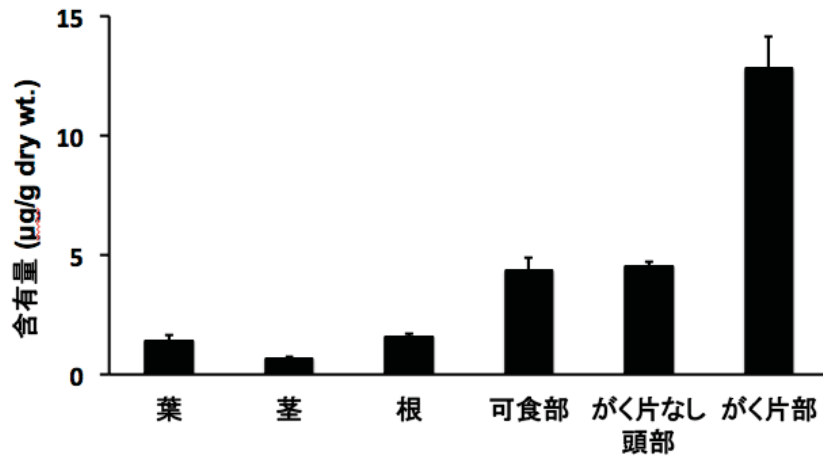
さらに、含量が高いとわかった長ナスの全植物体を用い、各部位に含まれる 9-EE-KODE の含量を定量した。その結果は、ナスの果実と比較して、葉、茎および根の 9-EE-KODE 含有量が少なかった (Fig. 10)。以上のことから、ナスの全植物体における 9-EE-KODE の含量は、がく片部が一番多いことが明らかとなった。



葉

茎

根



**Figure 10** The contents of 9-*E,E*-KODE in the various parts of eggplants (Naga-nasu). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ )

## 第二章 茄蒨に含まれる細部致死活性成分の作用機序

細胞死には、生理的なアポトーシスの他に病的なネクローシスがある。プログラムされた細胞死として1972年にKerrらにより提唱されたアポトーシスは、細胞数を一定に保つ恒常性と発生過程における形態形成や不要な細胞を除去する機能を有する。恒常性維持の例としては、60兆個の細胞から構成されているヒトの体で毎日起こる約3000億個の細胞死が挙げられる。形態形成の例としては、個体の発生過程において扁平な結合組織の塊として存在するヒトの手が、アポトーシスによって指の間に存在していた水かき部分が選択的に死ぬことによりヒトの指を形成することが挙げられる。また、おたまじやくしは、カエルになる際に尻尾が不要になるために、アポトーシスにより退縮する。

アポトーシスでは、まず細胞内膜に存在するホスファチジルセリンの細胞外膜への移動が起こり、細胞が凝縮して細胞体積が減少するとともに、核内ではクロマチンの凝縮が起こる。続いて核が断片化された後、細胞自体が断片化してアポトーシス小体が形成される。最後にアポトーシス小体はマクロファージ等の捕食細胞によって貪食除去される<sup>[11]</sup>。

一方で、ネクローシスでは、細胞の膨化とミトコンドリアの膨化により細胞が水腫状となった後、細胞膜の崩壊が起こる。アポトーシスは周囲の細胞に影響を及ぼさないのに対し、ネクローシスは細胞の内容物が周囲に捲き散らされるため、炎症を伴い周りの細胞に影響を与える。そのため、がん細胞に対するアポトーシス誘導能を持つ化合物は、他の細胞に影響を与えない抗がん剤となりうると考えられる (Figure 11)。

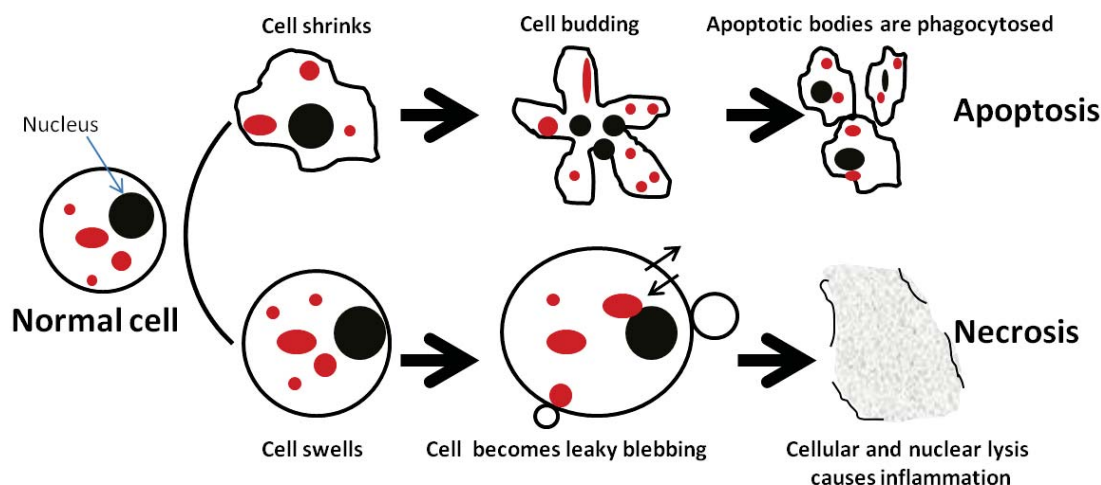


Figure 11 The difference between apoptosis and necrosis.

アポトーシスの過程は、ミトコンドリア内部経路、Fas レセプターからの外部経路および小胞体ストレス経路により誘導される (Figure 12)。アポトーシスのシグナルが伝達されると、cysteine dependent aspartate-directed proteinase、システイン依存性にアスパラギン酸のC末端側を加水分解するプロテアーゼである caspase が次々に活性化される。ミトコンドリアからの経路は、アポトーシスのシグナル伝達により、ミトコンドリア膜の透過性亢進や細胞内でのシトクロム C の放出が引き起こされ、caspase-9 を活性化し、続いて caspase-3 を活性化しアポトーシスを誘導する。

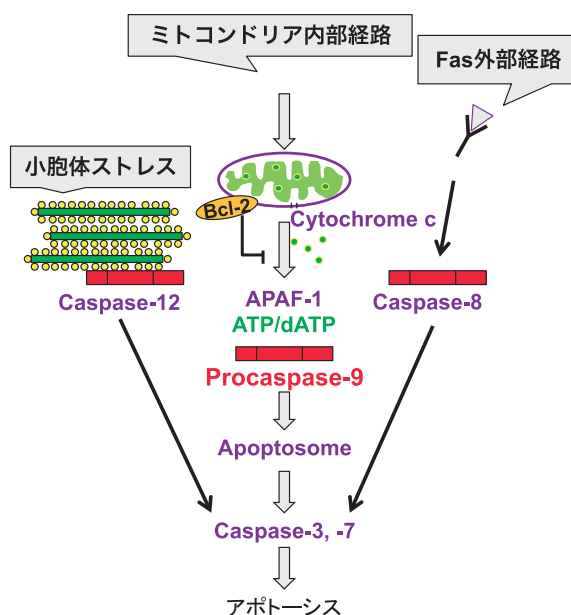


Figure 12 Signal pathways to cause apoptosis

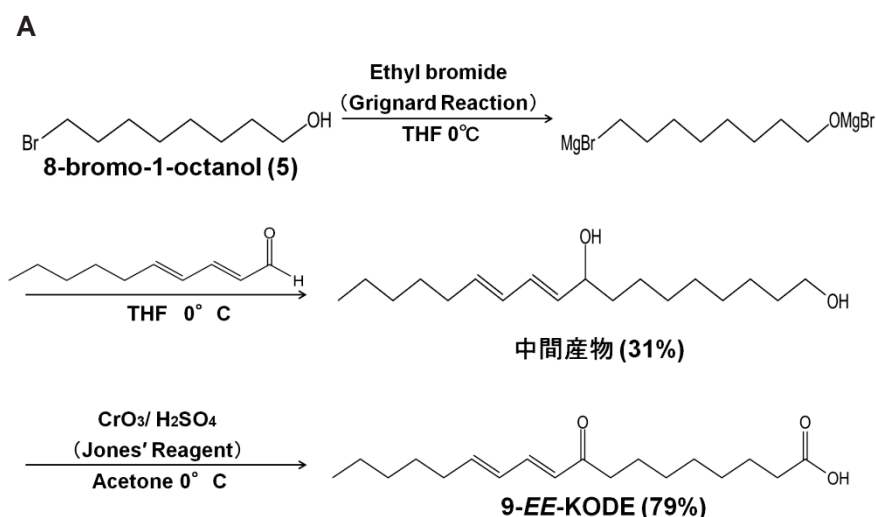
第一章では、ヒト卵巣がん細胞のHRAに対してナスの蒂に最も多く含まれる 9-*EE*-KODEの細胞致死活性を明らかにした。9-*EE*-KODEと化学構造が類似している共役リノール酸の一つであるt10, c12-conjugated linoleic acidは、ミトコンドリア経路にある Bcl-2の発現量を減少させることにより、マウス乳腺腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている<sup>[12]</sup>。そこで本章では、9-*EE*-KODEの細胞致死活性のメカニズムとして、アポトーシスを誘導する可能性について検討した。

## 1. Compound 4 (9-*EE*-KODE) 単離成分の化学合成

第一章で得られた 9-*EE*-KODE は非常にわずかであるため、さらなる作用機序解析のためには化学合成により大量供給を目指すこととした。

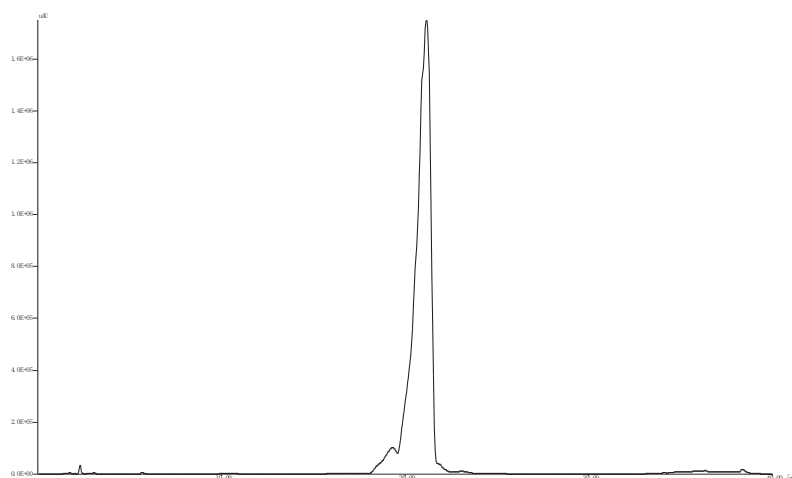
よく乾燥させたマグネシウムにテトラヒドロフラン (THF) を加え、ethyl bromide を入れて反応させ、グリニヤール試薬を合成し<sup>[13]</sup>、これに 8-bromo-1-octanol と反応させた。反応後、(*E,E*)-2,4-decadienal を加えて反応させた後、NH<sub>4</sub>Cl 水溶液とエーテルで分液した。エーテル層を水で 3 回分配し、エーテル層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥した。その後、ヘキサン/酢酸エチル/メタノール (45 : 3 : 1) を移動相とするシリカゲルクロマトグラフィーに供し、中間産物含有画分 (0.89 g) を得た。さらに MeOH/水 (1 : 1) を移動相とする ODS カラムクロマトグラフィーで分離し、中間産物 (0.28 g) を得た。

三酸化クロム水溶液に濃硫酸を加えることにより、Jones 試薬を調製した<sup>[14]</sup>。中間産物 (0.046 g) に Jones 試薬を入れ、室温で 30 min 攪拌し、溶液の色は赤から黄色になった後、NaCl、クロロホルム、アセトンを加え、分配した。クロロホルム層 (0.037 g) に含まれる 9-*EE*-KODE を MeOH/水 (4 : 1) を移動相とする ODS 逆層クロマトグラフィーで精製し、0.029 g を得た。それを HPLC および NMR で同定した (Figure 13)。



**B**

Proton number	合成 9- <i>EE</i> -KODE <sup>1</sup> H-NMR data (ppm)	分離した 9- <i>EE</i> -KODE <sup>1</sup> H-NMR data (ppm)
1	–	–
2	2.35 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz)	2.36 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz)
3~7	1.2 - 1.4 (m)	1.2 - 1.6 (m)
8	2.53 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz)	2.53 (t, <i>J</i> = 7.3 Hz)
9	–	–
10	6.07 (d, <i>J</i> = 15.4 Hz)	6.07 (d, <i>J</i> = 15.4 Hz)
11	7.11 (dd, <i>J</i> = 15.5 Hz)	7.12 (dd, <i>J</i> = 15.4, 9.8 Hz)
12	6.15 (m)	6.15 (m)
13	6.19 (m)	6.18 (m)
14	2.15 (m)	2.17 (m)
15~17	1.2-1.4 (m)	1.2-1.6 (m)
18	0.89 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz)	0.89 (t, <i>J</i> = 7.0 Hz)

**C**

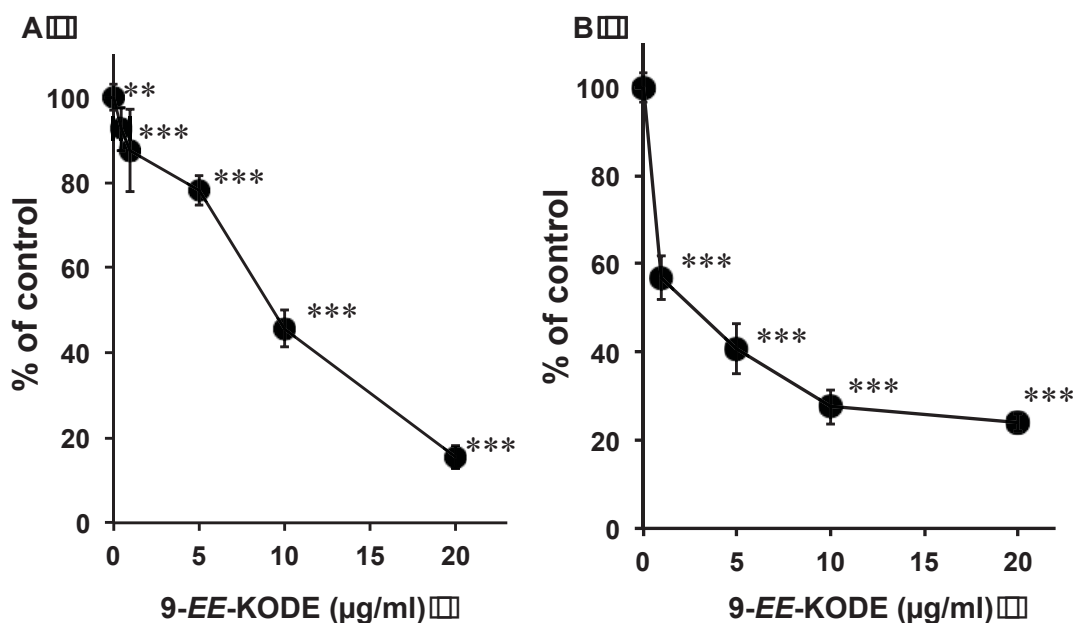
**Figure 13** (A) Scheme of the synthesis of 9-*EE*-KODE. (B) Comparison of synthesized and isolated 9-*EE*-KODE by <sup>1</sup>H-NMR (ppm). Solvent, CDCl<sub>3</sub>. (C) Chromatograms of synthesized 9-*EE*-KODE. Column: Cosmosil 5C18-AR-II (10 × 150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto), solvent: A (H<sub>2</sub>O) - B (CH<sub>3</sub>CN), 0 – 100 (0 – 30 min), flow speed: 1.0 ml/min; wave length: 280 nm.

## 2. 9-EE-KODE の HRA に対する細胞致死作用

第一章では、9-EE-KODEのHRA卵巣がん細胞に対する細胞致死作用をMTT法により検証した。MTT法は生細胞においてMTTを紫色のホルマザンへ還元するという細胞の代謝活性により細胞致死活性を測定できるが、生成したホルマザンが細胞毒性を有する場合があります、生存率測定の結果に誤りが生じる可能性があることが報告されている<sup>[15]</sup>。

そこでMTT法とともにBrdU法により、細胞致死活性を測定した。蛍光標識した抗BrdU抗体を用いて特異的に検出するという方法で、主にDNA合成量を測定する。

HRA細胞に 9-EE-KODE を各濃度で添加し、24時間後にさらに MTT または BrdU を添加して、細胞の代謝量とDNA合成量を測定したところ、いずれも 9-EE-KODE の濃度依存的な細胞致死活性が認められた。それぞれの方法で測定した IC<sub>50</sub> は、9.2 μg/ml (31 μM) および 2.6 μg/ml (8.7 μM) で大きな違いは認められなかった (Figure 14)。以上の結果により、9-EE-KODEはHRA細胞に対して、細胞致死活性があることが追試できた。



**Figure 14** Cytotoxic effect of 9-EE-KODE on HRA cells evaluated by MTT (A) or BrdU assays (B) HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 24 h, and the cell viability was evaluated. Data were expressed as mean ± S.E. ( $n = 3$  for MTT, and  $n = 6$  for BrdU tests). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (0 μg/ml) group evaluated by Bonferroni/Dunnett's multiple  $t$ -test.

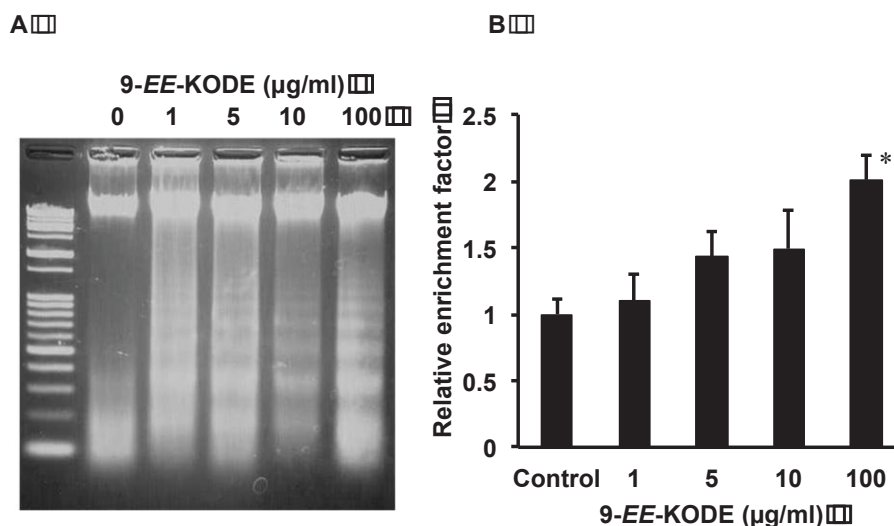


### 3. 9-EE-KODE による DNA 断片化の誘導

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。9-EE-KODE で刺激 24 時間後に、HRA 細胞の DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動で観察した。その結果、9-EE-KODE の濃度で 1  $\mu\text{g/ml}$  から、細胞 DNA の断片化が見られるようになり、濃度が高くなるほどその断片化が顕著に観察されるようになった (Figure 15A)。

次に、アポトーシスの際に細胞質に遊離するヒストン結合 DNA 断片を、分光光度計により検出する ELISA キットを用いて定量した。このキットでは、細胞溶解試料の細胞質フラクション中におけるモノ-およびオリゴヌクレオソームを特異的に検出できる。

9-EE-KODE で HRA 細胞を刺激した後の DNA 断片化のヒストン結合 DNA 断片化の相対な量は、濃度依存的に増加する傾向が見られた (Figure 15B)。このことから、9-EE-KODE はアポトーシスを誘導することが明らかとなった。



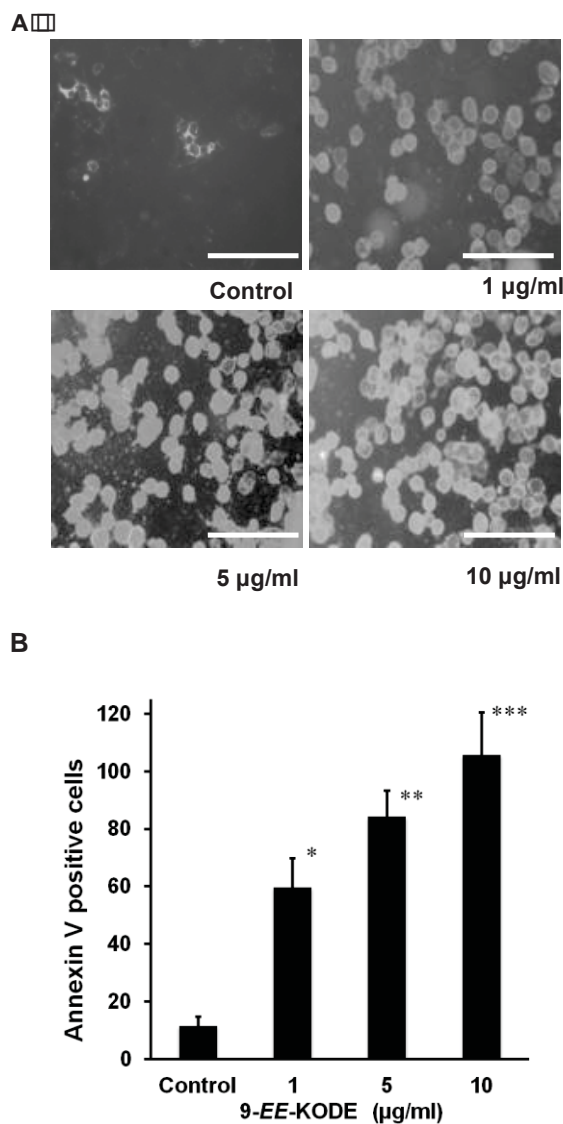
**Figure 15** Effect of 9-EE-KODE on DNA fragmentation in HRA cells. (A) HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 24 h, and DNA in the cells was separated by electrophoresis. (B) HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 4 h, and the amount of DNA-histone complex was evaluated. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$  vs control (0  $\mu\text{g/ml}$ ) group evaluated by Bonferroni/Dunnnett's multiple  $t$ -test.

### 4. 9-EE-KODEによるphosphatidylserineの細胞外膜への露出の誘導

アポトーシスの初期段階では、細胞膜の構造を保ったままで細胞膜リン脂質の非対称性を喪失する。Phosphatidylserine は陰性荷電したリン脂質で、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する。それに対し、Annexin V はカルシウム依存性のリン脂質結合タンパクで、phosphatidylserine とは高い親和性で結合することより、緑色の蛍光を発する。また、正常な細胞はアネキシン V に染色されない。したがって、アポトーシスを起こした細胞は、蛍光顕微鏡でその細胞死がアポト

ーシスかネクローシスかの判定が可能である<sup>[16]</sup>。

そこで蛍光標識された Annexin V を用いて、9-*EE*-KODE で刺激した HRA 細胞を染色したところ、濃度依存的に蛍光標識された細胞数の増加が観察された (Figure 16)。以上のことから、9-*EE*-KODE は、HRA 細胞に対して、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。



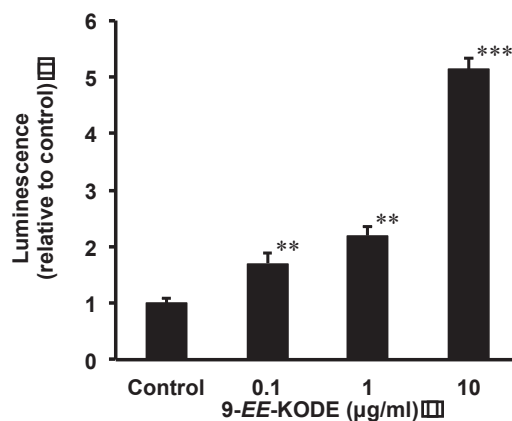
**Figure 16** Effect of 9-*EE*-KODE on phosphatidylserine cell in the outer membrane of HRA cells. HRA cells were treated with 9-*EE*-KODE for 12 h, and phosphatidylserine in outer membrane was detected by Annexin V staining. (A) Representative microscopic photographs. Bar in a photo represents 0.02 mm. (B) Positively stained cells were counted in 4 – 6 different microscopic fields of view of a single culture well, and data were exhibited as mean ± S.E. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (0 µg/ml) group evaluated by Bonferroni/Dunnett's multiple  $t$ -test.

## 5. 9-EE-KODE による HRA 細胞の caspase-3, -7 活性に対する影響

カスパーゼカスケードの活性化は、アポトーシス経路のなかで欠くことのできないイベントである。Caspase-3 は細胞を整然とした崩壊に導く数多くのタンパク質切断の引き金を引く“執行人”の役割を持つ重要なカスパーゼ酵素の 1 つであり、caspase-3 活性の増加はアポトーシスのマーカーとして汎用されている<sup>[17]</sup>。

そこで、9-EE-KODE を HRA 細胞に添加してから 24 時間の細胞における caspase-3, -7 の活性を、キットを用いて測定した。その結果、9-EE-KODE は HRA 細胞の caspase-3, -7 の活性を濃度依存的に増加させ、0.1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で有意差が認められた (Figure 17)。

以上のことから、9-EE-KODE の HRA 細胞に対する、アポトーシスの誘導がカスパーゼカスケードを介することがわかった。



**Figure 17** Effect of 9-EE-KODE on the activity of caspase-3/7 in HRA cells. HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 24 h, and the activities of caspase-3/7 were measured. Data were exhibited as mean  $\pm$  S.E ( $n = 3$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (0  $\mu\text{g/ml}$ ) group evaluated by Bonferroni/Dunnett's multiple  $t$ -test.

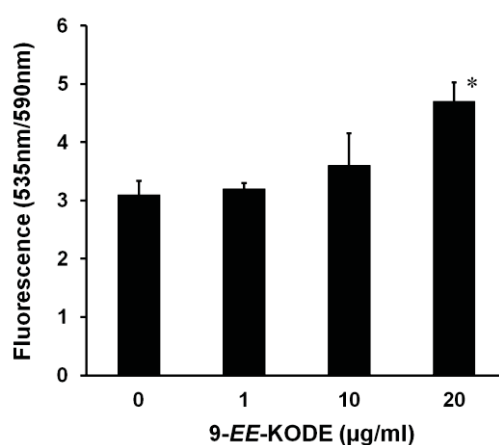
## 6. 9-EE-KODE の HRA 細胞ミトコンドリア膜電位差に対する作用

HRA 卵巣がん細胞に対する 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は、DNA 損傷などのストレスにより、アポトーシス誘導分子 p53 やアポトーシスを調節する Bcl-2 ファミリータンパク質を介して変化し、その結果、ミトコンドリアから cytochrome c が漏出し、アポトーシスが誘導される。

そこで、アポトーシスに関係するミトコンドリア内部経路で見られる、ミトコンドリア膜電位の変化を観察した。ミトコンドリアの膜電位の消失は、アポトーシスの誘導に

よって引き起こされる初期の現象の一つである。この変化を、JC-10 と呼ばれる色素を用いて評価した。この色素は、正常細胞のミトコンドリアの膜電位るときには凝集して存在し赤色の蛍光を発するが、アポトーシスした細胞ではミトコンドリア膜電位が消失し、ミトコンドリア外にモノマー状に拡散して、緑色の蛍光を発する<sup>[18]</sup>。HRA 細胞を 9-EE-KODE で処理して 3 時間後に JC-10 を添加し、ミトコンドリア膜電位の変化を測定したところ、緑色の蛍光を示した HRA 細胞の割合は、9-EE-KODE の濃度依存的に増加し、20 µg/mL の濃度で有意差が認められた (Figure 18)。

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減少していることが明らかになった。



**Figure 18** Effect of 9-EE-KODE on mitochondrial membrane potential in HRA cells.

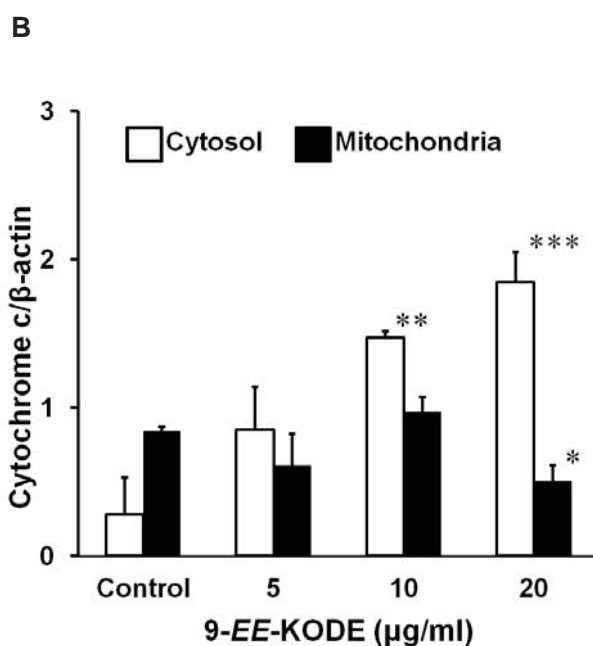
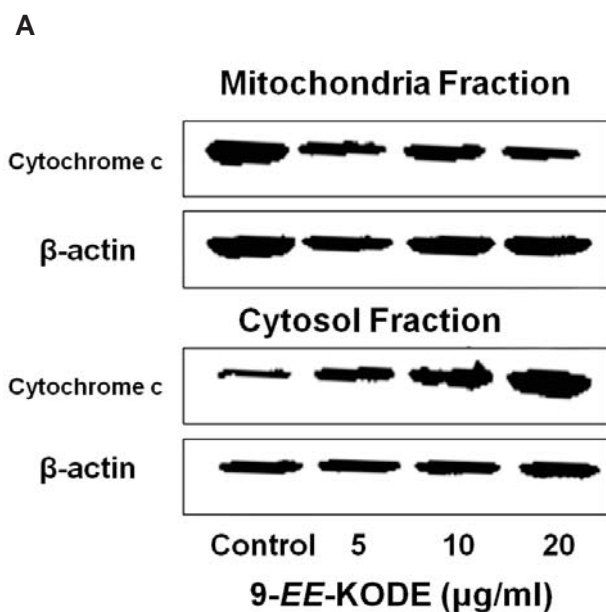
HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 3 h, and the mitochondrial membrane potential was evaluated by JC-10 staining. Data were exhibited as mean ± S.E. ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  control (0 µg/ml) group evaluated by Bonferroni/Dunnett's multiple  $t$ -test.

## 7. 9-EE-KODEのHRA細胞ミトコンドリアからのcytochrome cの放出への作用

細胞質内へ放出されたcytochrome c は、Apaf-1 (apoptic protease activating factor 1) と結合してApaf-1の多量体化を促し、caspaseがリクルートされ、アポトソームと呼ばれる巨大な複合体が形成される。アポトソームはcytochrome c、Apaf-1および caspase-9 を含んだ複合体で、caspase-9はこの複合体中で活性化する。活性化された caspase-9 は、デスレセプターを介する経路と同様に、caspase-3 などの下流の caspase を活性化し、アポトーシスが誘導される。

ミトコンドリア内のcytochrome cと細胞質内cytochrome cの発現の変化は、細胞アポトーシスの鍵となるイベントである。そこで、9-EE-KODEの添加によって、ミトコンドリア内と細胞質内のcytochrome cのタンパク発現を、ウェスタンブロット法により検討した。

その結果、9-*EE*-KODE で処理した HRA 細胞では、濃度依存的にミトコンドリアの cytochrome c の発現量が減少し、細胞質の cytochrome c の発現量の増加が認められた。このことから、9-*EE*-KODE の添加により、cytochrome c がミトコンドリアから細胞質への放出が促進することが明らかになった (Figure 19)。



**Figure 19** Effect of 9-*EE*-KODE on cytochrome c localization in mitochondrial and cytosol fractions in HRA cells. HRA cells were treated with 9-*EE*-KODE for 24 h, and the cell lysate was separated into mitochondrial and cytosolic fractions. The content of cytochrome c was evaluated by western blot analysis. (A) Representative photographs of the membrane. (B) Area of the band was measured by image analyzer, and data were exhibited as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs each control (0  $\mu\text{g/ml}$ ) group evaluated by Bonferroni/Dunnett's multiple  $t$ -test.

## 8. 9-EE-KODE の HRA 細胞における Bcl-2 ファミリータンパク質発現量への作用

Bcl-2 ファミリータンパク質は、ミトコンドリアの透過性をコントロールすることによってアポトーシスを制御している。抗アポトーシスタンパク質の Bcl-2、Bcl-xL はミトコンドリア外膜に存在し、cytochrome c の放出を抑制する。プロアポトーシスタンパク質の Bad、Bid、Bax、Bim は細胞質に存在するが、death シグナルに従ってミトコンドリアへと移動し、そこでは cytochrome c の放出を促進する。Bad はミトコンドリアへと移動し、Bcl-xL とプロアポトーシス複合体を形成する。この移動は、Bad のリン酸化を引き起こす生存因子によって抑制され、細胞質に引き止められる。細胞質内の Bid は Fas を介したシグナルにしたがって caspase-8 によって消化され、その活性型フラグメント (tBid) はミトコンドリアへと移動する。Bax と Bim は生存因子の除去などの death 刺激に応答してミトコンドリアへと移動する。DNA 損傷によって caspase が活性化されると、p53 は Bax と Noxa の転写を亢進する。アポトーシス時のミトコンドリア透過性と cytochrome c 放出の制御メカニズムは完全には分かっていないが、Bcl-xL、Bcl-2、Bax は電位依存性陰イオンチャネル (VDAC) に影響を与え、それが cytochrome c の放出制御の一端を担っていると考えられている<sup>[19]</sup> (Figure 20)。

9-EE-KODEで処理したHRA細胞では、ミトコンドリアの膜電位は濃度依存性で低下していたので、9-EE-KODEはBcl-2 ファミリータンパク質に作用している可能性がある。そこで、そのようなタンパク質のうち、抗アポトーシスタンパク質であるBcl-2とBcl-xL、プロアポトーシスタンパク質であるBaxのタンパクの発現量に対する9-EE-KODEの影響を検討した。9-EE-KODEで各時間処理したHRA細胞では、Bcl-2の発現量が経時的に減少、Baxの発現量が経時的に増加し、24時間後において有意な変化が認められたが、Bcl-xL発現量には変化が認められなかった (Figure 21)。また、9-EE-KODEで24時間処理したHRA細胞では、Bcl-2の発現量が濃度依存的に減少、Baxの発現量が増加し、20 µg/mlの濃度で有意な変化が認められたが、Bcl-xL発現量には変化が認められなかった (Figure 22)。

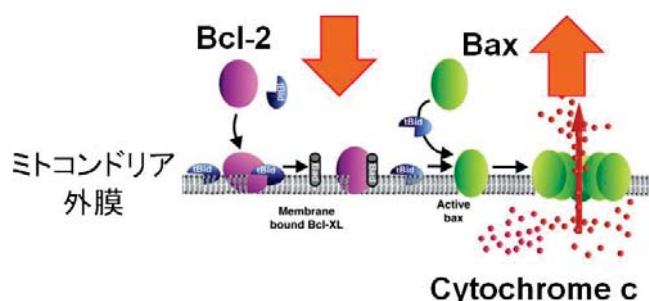
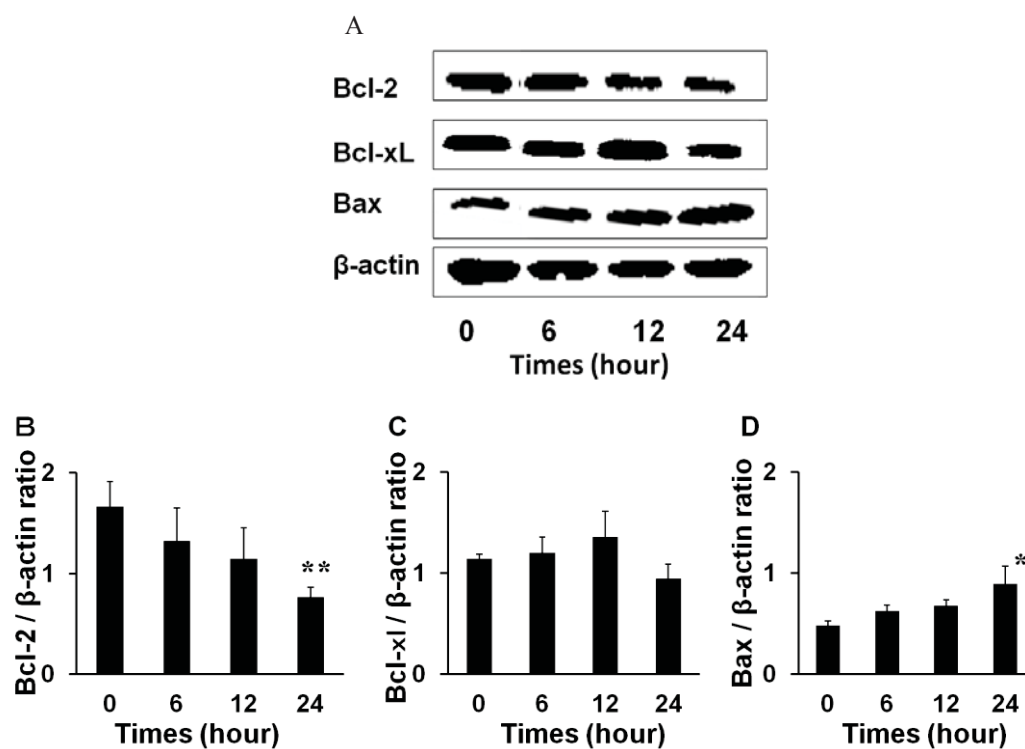
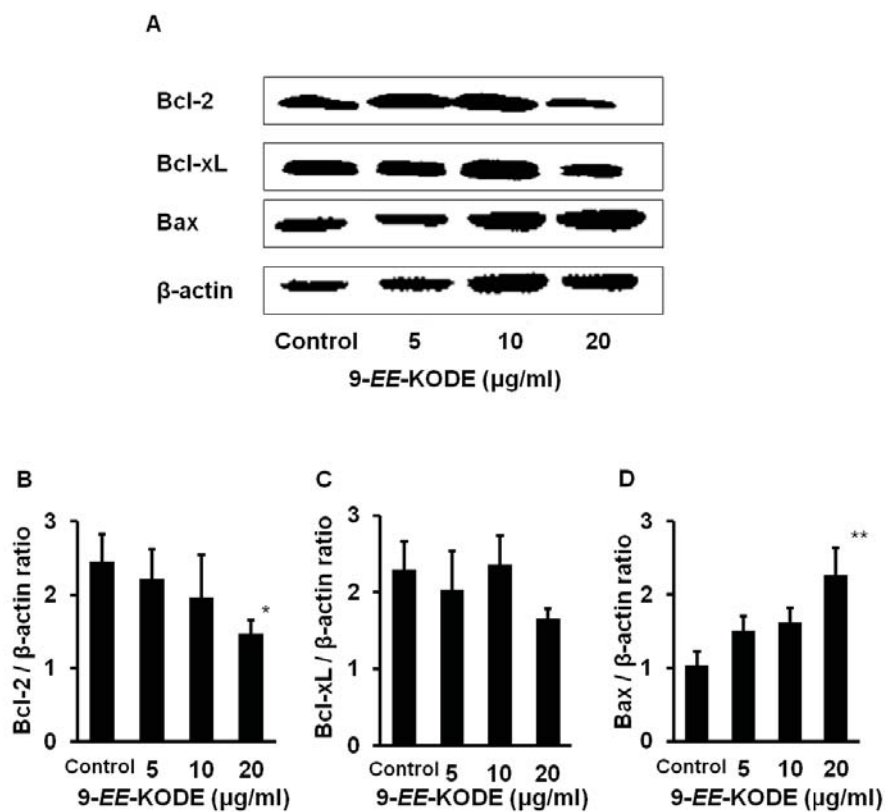


Figure 20 The Bcl-2 gene family exerts their pro- or anti-apoptotic effect<sup>[20]</sup>



**Figure 21** Effect of 9-EE-KODE on the expression levels of Bcl-2 subfamily proteins in HRA cells. HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 0, 6, 12 and 24 h, and the proteins levels of Bcl-2, Bcl-xL and Bax were evaluated by western blot analysis. (A) Representative photographs of the membrane. (B – D) Area of each band was measured by an image analyzer and the data were exhibited as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs each control (0  $\mu$ g/ml) group evaluated by Bonferroni/Dunnet's multiple  $t$ -test.



**Figure 22** Effect of 9-EE-KODE on the expression levels of Bcl-2 subfamily proteins in HRA cells. HRA cells were treated with 9-EE-KODE for 24 h, and the proteins levels of Bcl-2, Bcl-xL and Bax were evaluated by western blot analysis. (A) Representative photographs of the membrane. (B – D) Area of each band was measured by an image analyzer and the data were exhibited as mean  $\pm$  S.E. ( $n = 3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs each control (0  $\mu\text{g/ml}$ ) group evaluated by Bonferroni/Dunnet's multiple  $t$ -test.



## 考 察

本研究では、ナスがく片部エタノール抽出液を用いて 5 種類の癌細胞に対する細胞致死活性を検討した。その結果、ヒト卵巣癌由来 HRA 細胞に対して最も高い致死活性を示した。ナスがく片部エタノール抽出物が尖形コンジローマの治療に有効であったことから<sup>[5]</sup>、ナスがく片部抽出液が他のがん細胞と比較して、ヒトの生殖器官由来の癌細胞に対する有効性を推測し致死活性が最も高かった。以上のことから、ナスがく片部に含まれる細胞致死活性成分は、性ホルモンとは無関係に、何らかの HRA 細胞特有の機能に反応して細胞死を誘導する可能性が高いと考えられた。

この抽出物から活性に基づく分画を行うことにより、2 つの細胞致死活性成分 9-oxo-(10E, 12Z)-octadecadienoic acid (9-EZ-KODE) および 9-oxo-(10E, 12E)-octadecadienoic acid (9-EE-KODE) を単離・同定した。9-EE-KODE および 9-EZ-KODE の含量をナス果実の部位別に定量したところ、可食部よりもがく片部に多く含むことを認めたことから、それらの化合物は民間療法でナスの可食部ではなく蒂を利用する科学的根拠となるものと考えられる。また、各種ナスの果実がく片部におけるそれらの化合物の含量に大きな差は見られなかったことから、民間薬としてナスがく片部を利用するときには特にナスの種類は問わないことが推測された。9-EE-KODE および 9-EZ-KODE は、linoleic acid から lipoxygenase により酸化されることによって生成される化合物と考えられるが、9-EE-KODE については同じナス科に属するトマトにも含まれる報告というがある<sup>[7]</sup>。それらの化合物は、linoleic acid が自然に酸化された後で分解されることにより生成する可能性もあるが、リノール酸をビーカーに入れて蓋なしで 2 週間放置した後で HPLC で測定しても、この 2 つ化合物は生成しなかった。このことから、それらの化合物はナス科植物に特有の酸化酵素が linoleic acid からそれらの化合物を生合成した代謝産物である可能性が高いと考えられた。

9-EE-KODE および 9-EZ-KODE は、ナスがく片抽出物にそれぞれ 0.03% および 0.12% 含まれ、それぞれの HRA 細胞に対する IC<sub>50</sub> は 1.9 および 9.7 μg/ml であった。ナスがく片抽出物の細胞致死活性の IC<sub>50</sub> は、0.5 mg/ml であることから、それぞれの化合物の含量と比活性を求めたところ、9-EE-KODE と 9-EZ-KODE はそれぞれ 0.08% および 0.1% しか貢献していなかった。従って、ナスがく片抽出物にはその他の細胞致死活性成分を多く含むことが推測された。

細胞傷害活性と細胞選択性は、さまざまな因子により影響を受ける。化合物側の因子としては、同一分子における親水性基と疎水性基の共存や、イソプレニル基など疎水性部の存在、ハロゲンの存在などが挙げられる。近年の研究により、ケトン基がある  $\alpha, \beta$ -unsaturated ketones は口腔内がんに対する選択性が強いことが報告されている<sup>[21]</sup>。また、環状  $\alpha, \beta$  不飽和ケトン類の 3-arylidene-1-(4-nitrophenylmethylene)-3,4-dihydro-1H-

naphthalen-2-ones は非常に高い腫瘍選択性を示している<sup>[22]</sup>。9-*EE*-KODE は HRA 細胞に対する細胞の選択性があった理由として、その構造内にあるケトン基の関与が推測される。

本研究では、9-*EE*-KODE の HRA 細胞に対する致死活性は、少なくともミトコンドリア内部経路を介するアポトーシスを誘導することを機序とすることを明らかにした。しかし、1 µg/ml の濃度で 9-*EE*-KODE を処理した HRA 細胞では、有意な DNA 合成量の低下、phosphatidylserine の細胞外膜への露出、caspase-3 活性の促進が認められたが、ミトコンドリア膜電位差の亢進、cytochrome c の細胞質への放出、Bcl-2 発現量の低下と Bax 発現量の増加は、1 µg/ml の濃度では有意な変化は認められず、10~20 µg/ml 以上の濃度が必要であった。9-*EE*-KODE は求電子反応しやすい化学構造を持つので、細胞内にあるタンパク質と反応しやすく、またラジカルを含む代謝産物を形成しやすいと考えられる。このことから、9-*EE*-KODE の HRA 細胞に対するアポトーシスの誘導はミトコンドリア内部経路だけでなく、9-*EE*-KODE 自身あるいは他のタンパク質と結合した状態で小胞体ストレスなどを誘導し、他の経路を介することも十分に推測された。

ナスがく片部の民間療法における科学的なエビデンスや抗癌食物として開発するためには、本研究のような *in vitro* の実験だけではなく *in vivo* 実験も行うことが求められる。本研究で得られた知見に基づき、共役リノール酸化合物をリード化合物とした新規生物活性物質の創製、9-*EE*-KODE の標的分子の解明などが期待される。

## 実験の部

### 第一章

#### 【細胞】

KB (Human cervical carcinoma)、ACC-MESO-1 (Human malignant mesothelioma)、MCF-7 (Human breast cancer)、Mia-PaCa-2 (Human pancreatic cancer)、HT-1080 (Human fibrosarcoma) は、愛知学院大学薬学部生体有機化学講座 田中 基欲 教授より、HRA (Human ovarian cancer) は、名古屋大学大学院医学研究科産婦人科学分野 柴田 清澄 先生より分与されたものを使用した。それらの細胞は、に 10%分のウシ胎児血清 (FBS、Sigma Aldrich、St. Louis、MO、USA)、ペニシリン (100 unit/ml)、ストレプトマイシン (100 mg/ml) (ナカライテスク、京都) を添加した RPMI 1640 培地 (ナカライ) で、5% CO<sub>2</sub> 下 37°C で培養した。

継代には、0.25%トリプシン in 0.53 mM EDTA 溶液 (ナカライ) で細胞を 3 分間処理することで剥離しることにより行った。細胞数の測定は、血球計算板を用いて 0.5% トリパンブルー染色液 (ナカライ) で染色することにより行った。

#### 【細胞致死活性の測定】

各種細胞を 96 穴平底プレート (日本ジェネティクス) に  $5 \times 10^4$  cell / 198  $\mu$ l / well ずつ播種し、24 h 培養した。その後、DMSO で 10 mg/ml、1 mg/ml、100  $\mu$ g/ml、10  $\mu$ g/ml に調製したサンプルを 2  $\mu$ l ずつ添加し (最終濃度 : 100、10、1、0.1  $\mu$ g/ml)、さらに 72 h 培養した。コントロールには DMSO を、陽性コントロールとして adriamycin (協和発酵・ファイザー、東京) を随時希釈して使用した。MTT (ナカライ) を 3 mg/ml の濃度で 20  $\mu$ l ずつ添加し、さらに 4 h 培養した。培地を除去後、DMSO 170  $\mu$ l を添加して生成した formazan を溶解し、570 nm での吸光度を ARVO MX 1420 multilabel counter (Perkin Elmer、Winter Street Waltham、MA、USA)、または iMark Microplate Reader (Bio-Rad、Philadelphia、Pa、USA) により測定した。各薬物の濃度における細胞増殖抑制率 (%) を吸光度より算出し、50% を含む 3 つの異なる濃度の対数に対する細胞生存率をプロットしたときの近似直線を用い、50% を示す濃度を IC<sub>50</sub> とした。

#### 【ナスがく片エキスの調製と分画】

実験に使用したナス果実は、名古屋市内の市場で購入した。新鮮な卵形ナス果実 14 kg を、がく片部分 2.8 kg とそれ以外の部分に分け、がく片部分は凍結乾燥し、凍結乾燥物  $2.6 \times 10^2$  g を得た。これにエタノール 2 l を加えて一晩冷浸抽出を 3 回行い、抽出液を合わせて濃縮乾固することにより、抽出エキス 7.6 g を得た。これを 80% メタノール 3.6 l に懸濁し、ヘキサン 1.2 l で 3 回で分配し、それぞれの画分を濃縮乾固した。次に 80%メ

タノール画分を水 3.61 に懸濁し、酢酸エチル 1.21 で 3 回分配し、さらに水画分を水 1.21 で 3 回分配し、それぞれの画分を濃縮乾固した。得られた各画分の重量は、ヘキサン画分 (0.8 g)、酢酸エチル画分 (1.3 g)、水画分 (5.2 g) であった。

別にナス果実のがく片分以外の部分 200 g を、エタノール 2 l で同様に抽出し、抽出エキス 12.5 g を得た。

それぞれのナスがく片エタノール抽出エキスおよびその各画分は、10 mg/ml となるように DMSO に溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

酢酸エチル画分 1.3 g を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 60N、関東化学、東京、4 cm  $\times$  20 cm) に供し、メタノール : クロロホルム : 水 (2 : 8 : 0.1) <sup>[13]</sup> で溶出させた。カラムの中に顕著的な四つのバンドを取って、Fr. 1 ~ Fr. 4 を得た (それぞれ 7.2 mg、683 mg、142 mg、258 mg)。Fr. 2 (683 mg) を ODS シリカゲルクロマトグラフィー (コスモシル 140C<sub>18</sub>-OPN、ナカライ、4 cm  $\times$  20 cm) に供し、メタノール / 水 (1:1、4:1、1:0、300 ml ずつ段階的) で溶出させた。Fr. 2-1 ~ 2-3 (それぞれ 225.1 g、48 mg、176 mg) を得た。Fr. 2-2 (48 mg) を分取 HPLC (コスモシル C<sub>18</sub>-AR-II column 10  $\times$  150 mm、ナカライ) に供し、流速 3 ml/min、水 / アセトニトリル (50:50、0 min ; 30:70、30 min ; 0 : 100、32 min) で溶出させ、280 nm の UV 吸収から、Compound **1** (19 min、0.13 mg)、**2** (20 min、0.25 mg)、**3** (24 min、9.1 mg)、**4** (26 min、2.2 mg) を得た。Compound **3** と **4** の化学構造は、NMR (Bruker ABANCE 600、MA、USA) と EI-MS (日本電子、東京) を測定した。

Compound **3** と **4** のナス抽出液中の含量の測定は、以下の条件の HPLC により行った : カラム、コスモシル 5C<sub>18</sub>-AR-II column 4.6  $\times$  150 mm (ナカライ) ; 移動相、水 / アセトニトリル (50:50、0 min ; 30:70、20 min ; 0 : 100、22 min) ; 流速、1 ml/min ; 検出、UV 280 nm、溶出時間、compound **3** (19 min)、compound **4** (20 min)。

#### 【各種ナスがく片部、頭部、果実エキスの調製】

実験に使用した各種のナス果実は、日本市場品で購入した。

各種新鮮なナス果実をがく片部、頭部及び果実それぞれ分けて、一晩加熱乾燥し、それぞれ 1 g を実験材料として、酢酸エチル 10 ml を加えて 30 min のソニケーションによる抽出を 3 回行い、抽出液を合わせて濃縮乾固することにより、各抽出エキスを得た。全ての抽出エキスをメタノールで 10 mg/ml に調製した。その後、各濃度 (6.25、12.5、25、50  $\mu\text{g/ml}$ ) の 9-EE-KODE を用いて検量線を作成した。それぞれのナスの各部位の抽出エキスを HPLC で 9-EE-KODE の含有量を測定した。

## 第二章

### 【9-EE-KODEの合成】

合成および確認方法については、本文に記載した。

#### 【MTT法による9-EE-KODEの細胞致死作用の測定】

9-EE-KODE添加後、24 h後にMTT溶液を添加した事を除き、第一章に準じて行った。

#### 【BrdU法による9-EE-KODEの細胞致死作用の測定】

5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling & Detection Kit III (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を使用した。MTT法と同様に操作し、MTT溶液の代わりに10  $\mu$ lのBrdU標識溶液を添加し、37°Cで2 h インキュベートして、新たに合成されるDNAに取り込ませた。培地を吸引除去後、細胞に200  $\mu$ l/well の FixDenat を添加して30 min、25°Cで処理することにより固定した。その後、100  $\mu$ l/well のPOD標識抗BrdU 抗体反応液を添加して、15°C、90 min処理した。洗浄液で洗浄後、ペルオキシダーゼの基質を加え、25°Cで3 min インキュベート後、405/490nmの吸光度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した

#### 【アガロースゲル電気泳動によるアポトーシスの検出】

培養フラスコ (50 ml、日本ジェネティクス、日本) に $2 \times 10^6$  個のHRA細胞を播種し、24 h 培養後、培地をDMSO (Control) または9-EE-KODEを1、5、10、100  $\mu$ g/ml 含む培地と交換し、さらに24 h培養した。細胞を回収し、溶解バッファー (100 mM Tris-HCl、pH 8.5 ; 5 mM EDTA、0.2 M NaCl、0.2% SDS、0.2 mg/ml proteinase K) を330  $\mu$ l加えて37°Cで一晩インキュベートすることにより、細胞を溶解した。遠心分離 (1.5 x 10<sup>4</sup> rpm、10 min) 後、沈殿に5 M NaCl 141  $\mu$ lを加え、軽く攪拌した後、さらに遠心分離した (1.5 x 10<sup>4</sup> rpm、20 min) 。上清を新たなチューブに移して、エタノール470  $\mu$ lを加え、軽く攪拌した後、遠心分離した (1.5 x 10<sup>4</sup> rpm、20 min) 。上清を吸引除去し、沈殿に70%エタノール 400  $\mu$ lを加えた後、軽く攪拌して、遠心分離した (1.5 x 10<sup>4</sup> rpm、20 min) 。上清を吸引除去し、沈殿に水を15  $\mu$ l添加して溶解し、RNase A (10 mg/mL in Tris-EDTA buffer) を1  $\mu$ l添加し、37°C水浴で一晩でインキュベートした。その後、遠心 (3 x 10<sup>3</sup> rpm、20 min) させて、上清を除去し、沈殿をTris-EDTA buffer 20  $\mu$ lで溶解し、2%アガロースゲルを用いて電気泳動した。分離したDNA は、エチジウムブロミドでゲルを染色した後、UV トランスイルミネーターにより可視化した。

#### 【ヌクレオソームによる DNA 断片の検出】

Cell death detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) を用いて測定した。96穴プレートにHRA細胞を $1.5 \times 10^4$  cells/well播種し、24 h培養後、9-EE-KODEを添加してさらに24 hを培養した。その後、キットの説明書に従って測定した。結果は、未処理 (対照) 細胞と9-EE-KODEで処理した細胞からの吸光度の比から、以下の式により計算したenrichment factorとして表した。

$$\text{enrichment factor} = \frac{\text{mU of the sample (dying/dead cells)}}{\text{mU of the corresponding control (viable cells)}}$$

#### 【アネキシン V 染色】

培養フラスコ (50 ml) に HRA 細胞を  $1.5 \times 10^4$  cells/well の HRA 細胞を播種し、6 h 培養した後、各濃度の 9-EE-KODE を添加した。24 h 培養後、PBS で洗浄し、細胞にアネキシン V-フルオレセリン (Medical & Biological Laboratories、名古屋) を 10  $\mu$ l 添加した。暗所室温で 15 min インキュベートした後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 【Caspase-3/-7 の測定】

96 穴プレートに HRA 細胞を  $2 \times 10^4$  cells/well 播種し、24 h 培養後、9-EE-KODE を添加して 24 h 培養した。培地を吸引除去後、Caspase-3/7 reagent (Promega、Madison、WI、USA) を 100  $\mu$ l 添加して室温で 1 h 培養した後、励起波長 498 nm、吸収波長 521 nm の蛍光をルミノメーター (Perkin Elmer、Winter Street Waltham、MA、USA) で測定した。

#### 【ミトコンドリア膜電位の測定】

96穴黒色プレートにHRA細胞を $1.5 \times 10^4$  cells/well播種し、24 h培養後、9-EE-KODE を添加して12 h培養した。その後、Cell Meter™ JC-10 Mitochondrial Membrane Potentialキット (Biomol、Hamburg、Germany) を使用して、励起波長490 nm、吸収波長535(緑)/590(赤)の蛍光を測定した。

#### 【ミトコンドリアの Bcl-2 サブファミリータンパク質の検出】

6穴プレートにHRA細胞を $1.5 \times 10^4$  cells/well播種し、9-EE-KODEを添加して、24 h培養した。細胞をトリプシン処理により採取し、遠心分離 ( $2 \times 10^3$  rpm、20 min) 後、沈殿に lysis buffer (50 M Tris-HCl、pH8.0、0.15 M NaCl、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、1.0 % NP-40 substitute) を100  $\mu$ l添加し、超音波で細胞を破砕した。タンパク質濃度は、BCA プロテインアッセイキット (Thermo Scientific、Rockford、IL、USA) で測定した。25  $\mu$ gの各サンプルを12%アクリルアミドゲルを使用したSDS-PAGEに供した。分子量マーカーとして、Precision Plus Protein™ Standards Dual Color (Bio-Rad) を用いた。電気泳動後のゲルは、セミドライ式ブロッティング装置 (ATTO AE-6687 HorizBLOT 2M、ATTO、東京) を用いて、Immobilon™-P Transfer Membrane (Millipore、Billerica、MA、USA) に転写した。膜を洗浄液 (20 mM Tris-HCl、pH 7.5、170 mM NaCl、0.05% Tween20) にて洗浄し、10%ブロッッキングエース (DS ファーマバイオメディカル、大阪) 中で室温で2 hインキュベートした。次に10%ブロッッキングエースで希釈した以下の一次抗体液でメンブレンを4°Cで一



晩反応させ、洗浄液で3回洗浄後、10%ブロッカーで希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG (1:1 x 10<sup>4</sup>, Jackson Immuno Research, Reston, VA, USA) を用いて室温で1 h反応させた。洗浄液で3回洗浄し、Luminate™ Forte Western HRP Substrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 液に5 min浸し、化学発光検出器 (LAS3000、富士フイルム、東京) を使用して発光を検出した。発光画像の解析はIMAGE J1.46 (富士フイルム) を用いた。撮影後のメンブレンは、WB-stripping solution (ナカライ) で37°C、9分間洗浄し、再びブロッキングを行うことで別のタンパク質の検出に用いた。

#### 【ミトコンドリア内と細胞質内の Cytochrome c の測定】

6 穴プレートに HRA 細胞を 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/well 播種して 24 h 培養し、9-EE-KODE で 24 h 培養した。細胞をトリプシン処理により採取し、Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit (Abcam, Cambridge, UK) でミトコンドリアと細胞質を分離し、前節と同様の方法で検出した。

#### 【使用した抗体】

分子種	メーカー	希釈比率	kDa
Bcl-2	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)	1:1000	26
Bcl-xL	Cell Signaling	1:1000	30
Bax	Cell Signaling	1:1000	20
Cytochrome c	Abcam	1:500	12
β-actin	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	1:500	43

## 参考文献

1. Yagasaki K., Miura Y.: Food components with potentialities to suppress proliferation and invasion of cancer cells. *Anim. Cell Technol. Basic Appl. Asp.* 10: 107–111 (1999).
2. DiMasi J., Hansen R., Grabowski H.: The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Eco.* 22: 151–185 (2003).
3. Bonnesen C., Eggleston I., Hayes J.: Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 61: 6120–6130 (2001).
4. Yanyan L., Tao Z., Hasan K., et al.: Sulforaphane, a dietary component of broccoli/broccoli sprouts, inhibits breast cancer stem cells. *Clinical Cancer Res.* 16: 2580–2590 (2010).
5. 「なすの栽培育て方」 <http://www.ktf-ririka-2.net/11-nasu.html.html> (2015/01/19アクセス)
6. Kiminori M., Takao K., Tsuyoshi M., Masaharu M.: Antiangiogenic activity of nasunin, an antioxidant anthocyanin, in eggplant peels. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6272–6275 (2005).
7. Tomoda, Y., Tomoda, K., Horio, H., Mano, N., Mano, S., Morikawa, Y., Ito, T., Sugiyama, M.: Treatment results of the eggplant extract against condyloma acuminatum. 18th Annual Meeting of Japanese Society of Sexually Transmitted Infections, Kokura, Japan (2007).
8. Dhiman TR, Nam SH, Ure AL.: Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45: 463–482 (2005).
9. Kim, Y., Hirai S., Takahashi, H., Goto T., Ohyan C., Tsugane T., Konishi C., Fujii T., Imai S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Takahashi N., Kawada T.: 9-Oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid derived from tomato is a potent PPAR $\alpha$  agonist to decrease triglyceride accumulation in mouse primary hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 55: 585–593 (2011).
10. Kim Y., Hirai S., Goto T., Ohyan C., Takahashi H., Tsugane T., Konishi C., Fujii T., Inai S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Takahashi N., Kawada T.: Potent PPAR $\alpha$  activator derived from tomato juice, 13-oxo-9,11-octadecadienoic acid, decreases plasma and hepatic triglyceride in obese diabetic mice. *PLoS One.* 7: e31317 (2012).
11. Degterev A., Yuan J.: Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 378–390 (2008).
12. Ou L., Ip C., Lisafeld B., Ip M.: Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356: 1044–1049 (2007).
13. Harding K., May L., Dick K.: Selective oxidation of allylic alcohols with chromic acid. *J.*



- Org. Chem.* 40: 1664–1665 (1975).
14. Tsuboi S., Maeda S., Takeda A.: A convenient synthesis of  $\pm$ -dimorphecolic acid and its analogs. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 59: 2050–2052 (1986).
  15. Cory A., Owen T., Barltrop J., Cory J.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 3: 207–212 (1991).
  16. Koopman G., Reutelingsperger CP., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van Oers M.H.: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 84: 1415–1520 (1994).
  17. Mazumder S., Plesca D., Almasan A.: Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol.* 414: 13–21 (2008).
  18. Reers M., Smiley S.T., Mottola-Hartshorn C., Chen A., Lin M., Chen L.B.: Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. *Methods Enzymol.* 260: 406–1417 (1995).
  19. Tsujimoto Y.: Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria. *Genes Cells.* 3: 697–707 (1998).
  20. Bogner C., Leber B., Andrews D.W.: Apoptosis: embedded in membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22: 845-851 (2010).
  21. Nakayachi T., Yasumoto E., Nakano K., Morshed S.R., Hashimoto K., Kikuchi H., Nishikawa H., Kawase M., Sakagami H.: Structure-activity relationships of  $\alpha,\beta$ -unsaturated ketones as assessed by their cytotoxicity against oral tumor cells. *Anticancer Rec.* 24:737-742 (2004).
  22. Dimmock JR., Das U., Gul H.I., Kawase M., Sakagami H., Baráth Z., Ocsovsky I., Molnár J.: 3-Arylidene-1-(4-nitrophenylmethylene)-3,4-dihydro-1H-naphthalen-2-ones and related compounds displaying selective toxicity and reversal of multidrug resistance in neoplastic cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 15:1633-1636 (2005).

## 謝辞

本研究を遂行するに当たって、終始御指導、御鞭撻を賜りました高知県立牧野植物園 水上 元 園長（名古屋市立大学名誉教授）に心より深謝いたします。

本論文を執筆するに当たって、御指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究生 薬学分野 牧野 利明 教授に深謝いたします。

本論文を発表するに当たって、御指導を賜りました名古屋市立大学大学院薬学研究生 薬学分野 寺坂 和祥 講師に深謝いたします。

本研究を遂行するに当たって、終始有益な御助言、御指導を賜りました名古屋大学名誉教授（産科婦人科学）、友田クリニック院長 友田 豊 博士、名古屋大学大学院医学研究科 吉川 史隆 教授、柴田 清澄 准教授、愛知学院大学薬学部 薬用資源学講座 田邊 宏 樹 講師、トヨタ記念病院 桜井 陽平 修士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たって、様々な御助言、実験の一部を協力していただきました名古屋市立大学大学院薬学研究生薬学分野 梶田 梨恵 修士、南 安依里 修士に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するに当たって、終始有益な御助言、御協力をして頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究生薬学分野の皆様へ深く感謝いたします。