

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22659093

研究課題名（和文）：アフリカ薬草抽出物の抗腫瘍細胞作用

研究課題名（英文）：Effect of the extracts of African plants on ATL cells

研究代表者：栄鶴 義人（EIZURU YOSHITO）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00041351

研究成果の概要（和文）：アフリカの伝統医薬に用いられる薬草抽出物に抗 ATL 細胞効果を示すものを見出した。この抽出物は、HTLV-1 感染細胞には細胞障害性を示したが、健康人由来の末梢リンパ球には細胞障害性を示さず Selective Index(SI)は、>1000 倍以上であった。抗 ATL 細胞活性物質を同定したところ、toosendanin であり、2つの異性体が混在していることが判明した。最終的には、この抽出物で処理した HTLV-1 感染リンパ球はアポトーシスを起こした。

研究成果の概要（英文）：The cytotoxic substance was found in African traditional medicine. This substance is cytotoxic for HTLV-1-infected lymphocyte (ATL cells), but not for normal lymphocytes. The selective index is more than 1000-fold. This substance is toosendanin, consisted of the mixture of two isomers, 12-acetoxymoorastatin and 29-deacetylSENDANIN. Finally, this substance causes apoptosis of HTLV-1-infected lymphocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合 計 |
|---------|-------------|----------|-------------|
| 2010 年度 | 1, 100, 000 | 0 | 1, 100, 000 |
| 2011 年度 | 1, 000, 000 | 300, 000 | 1, 300, 000 |
| 年度 | | | |
| 総 計 | 2, 100, 000 | 300, 000 | 2, 400, 000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、薬理学一般

キーワード：アフリカの伝統医薬、抗 ATL 細胞作用、toosendanin、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）は、ヒトに腫瘍性の成人T細胞白血病(ATL)と神経疾患の HTLV-1 関連/熱帯性痙性麻痺(HAM/TSP)を起こす。鹿児島県を含む西南地方には HTLV-1 が浸淫しており、多数に ATL 患者や HAM 患者が存在する。通常の白血病では化学療法が施行されそれなりの効果を

期待できるが、ATL の場合効果の期待できる薬物療法が未だ確立されていない。

2. 研究の目的

アフリカでは薬剤の入手が困難なこともあり、章句物の抽出液を用いた伝統医療が行われている。しかし、これら伝統医薬として用いられている植物の抽出液の抗腫瘍効果

等の薬理作用は未だ充分には調べられていない。そこで、抗 ATL 細胞活性を持つ植物抽出液の探索、有効成分の同定、及び、作用機序を明らかにする目的で実験を行った。

3. 研究の方法

(1) アフリカの各種薬草の水抽出液あるいはエタノール抽出液存在下に、ATL 細胞である S1T 細胞および健康人末梢血リンパ球の増殖を比較し、ATL 細胞にのみ増殖抑制を示す薬草を選び出した。

(2) 液相-液相分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィ、逆相カラムクロマトグラフィ、HPLC を用いた抗 ATL 活性物質の精製と分取、および NMR を用いて構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 抗 ATL 細胞活性を持つ抽出物の探索

アフリカの植物抽出物の抗 ATL 細胞活性を探索する為に各種抽出液存在下に ATL 細胞株 (S1T、K3T)、HTLV-1 非感染細胞 (HL60)、および、健康人末梢リンパ球を 72 時間培養し、MTT 法で細胞増殖抑制効果を比較した。その結果、数種類の温水抽出物やメタノール抽出物に抗 ATL 細胞活性を認めたが、特にセンダン茎メタノール抽出液に強い細胞抑制効果を認めた。その ATL 細胞株および HL60 細胞株に対する 50% 増殖抑制効果 (IC₅₀) は、0.303-2.79 $\mu\text{g/ml}$ の範囲であった (図 1)。

一方、健康人の末梢リンパ球に対する IC₅₀ は、>1000 $\mu\text{g/ml}$ であり、Selective Index (SI) は、>1000 倍であった。

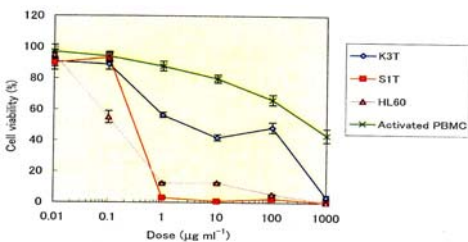


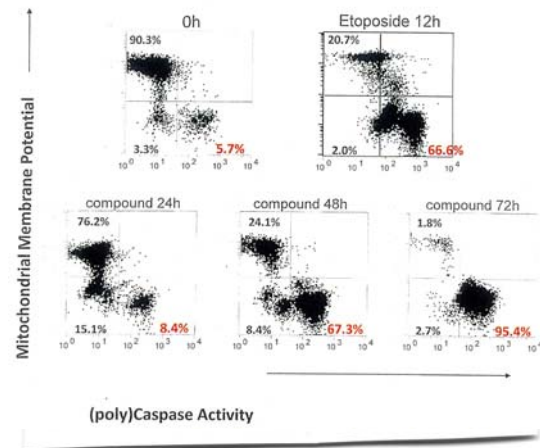
図 1. センダン茎メタノール抽出液の抗 ATL 活性
ATL 細胞株 (K3T、S1T)、HTLV-1 非感染細胞株 (HL60) をセンダン樹皮抽出液の存在下で 72 時間培養し、MTT 法で生細胞を測定した。

(2) 抗 ATL 細胞活性物質の同定

最初、液相-液相分配を行い、どの有機溶媒に抗 ATL 細胞活性が認められるかを S1T 細胞に対する増殖抑制効果で検討した。ヘキサン分画および水分画には抗 ATL 細胞効果は認められず、エチル酢酸分画に強い活性が認められた (表 2)。

ゲルクロマトグラフィーでメタノール濃度 10%、20%、30%、50%、および、100% で抽出したところ、メタノール 30%、50%、

図 5. センダン茎メタノール抽出物による S1T 細胞のアポトーシス



100% の分画に強い抗 ATL 細胞活性が認められた。抗 ATL 細胞活性分画を Reverse Chromatography で分画したところ、5 番目と 6 番目の分画に強い抗 ATL 細胞活性が認められ、4 番目と 7 番目の分画にも活性を認めた (図 2)。

表 3. シリカゲルクロマトグラフィー

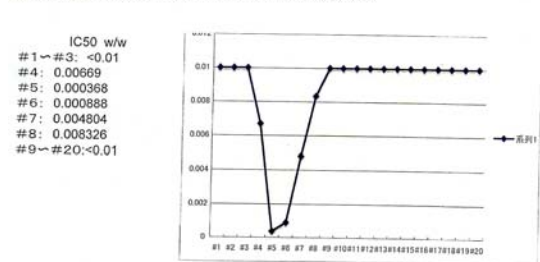
Silica Gel Column Chromatography

| | IC ₅₀ v/v |
|-----------|----------------------|
| 0% Fr. | >0.01 |
| 10% | >0.01 |
| 20% | >0.01 |
| 30% | 0.0003 |
| 50% | 0.000044 |
| 100% | 0.00041 |
| MeOH (回収) | >0.01 |

* 抗 ATL 活性は希釈倍数の逆数であらわした。

さらに、抗 ATL 細胞活性を Reverse Chromatography で分画したところ 5 番目と 6 番目に強い抗 ATL 細胞活性を認め、4 番目と 7 番目の分画でも活性を認めた (図 2)

図 2. Reverse Chromatography による抗 ATL 活性物質の分画

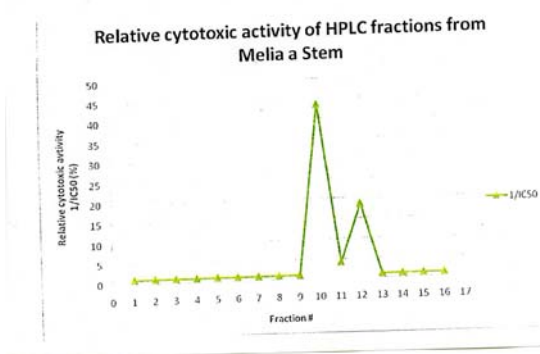


* 抗 ATL 活性は希釈倍数の逆数で表した。

最終的に、HPLC で分画し、10 番目と 12

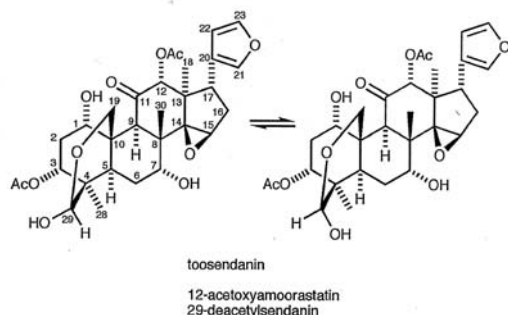
番目に強い抗 ATL 細胞活性を認めた (図 3) この 2 本のピークをそれぞれ HPLC で分画したが、どちらのピークからも、結果的に 2 つの活性ピークが生じた (図 3)。

図 3. HPLC による抗 ATL 活性物質の分画



この分画を NMR で分析した結果、抗 ATL 細胞活性物質は toosendanin であり、異性体である 12-acetoxymoorastatin と 29-deacetylSENDANIN の双方が混在していることが判明した (図 4)。

図 4. Toosendanin の構造



(3) 抗 ATL 細胞活性のメカニズム

S1T 細胞をセンダン茎メタノール抽出液存在下で培養し、細胞のミトコンドリア膜電位の低下と活性化カスパーゼを flow cytometry で検討した。対照として用いたエトポシドは、処理後 1 2 時間で 66.6% の細胞でアポトーシスを起こした。一方、センダン茎メタノール抽出液では、2 4 時間で 8.4%、4 8 時間で 67.3%、7 2 時間で 95.4% の細胞がアポトーシスを起こした (図 5)。従って、エトポシドと異なり、時間依存性にゆっくりとアポトーシスを誘導することがわかった。

(4) HTLV-1 キャリアの末梢リンパ球へ影響

HTLV-1 キャリアより末梢リンパ球を分離し、精製した toosendanin 存在下に培養し MTT 法で増殖抑制を調べた。ATL 細胞である S1T 細胞では 100ng/ml でほとんどすべての細胞が死滅したが、キャリア由来の末梢血リンパ球は約 10% が生き残っていた。

(5) 考察

今回、アフリカの伝統医薬のなかで、抗 ATL 細胞活性を示すものを探索し、数種類の薬草抽出物が抗 ATL 細胞活性を示すものを見出した。この中で最も活性の強かったセンダン茎メタノール抽出液で活性物質を同定したところ、toosendanin であることが判明した。SENDANIN は既に同定されており、上皮性の各種腫瘍細胞の増殖抑制が報告されている。しかしながら健常人末梢リンパ球にはほとんど細胞障害を示さず S I は > 1000 倍であった。また、分子量も小さく今後、合成できれば、有力な抗 ATL 剤の開発に繋がるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Oronez P, Koriyama C, Eizuru Y.: identification of the distinctive type i/Xho I+ strain of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Peru. *Anticancer Res.*10:3607 (2011) (査読有)

2. Wang J, Ja X, Eizuru Y. et al.: Enhanced autophagy and reduced expression of Cathepsin d are related to autophagic cell death in Epstein-Barr virus-associated nasal natural killer/T-cell lymphoma: an immunohistochemical analysis of Beclin-1, LC3, Mitochondria(AIF-1) and Cathepsin D in nasopharyngeal lymphomas. *Acta Histochem Cytochem*44:117 (2011)(査読有)

3. Aguayo F, Khan N, Eizuru Y.: Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in breast cancer from Chile. *Infect Agent Cancer* 6:7 (2011)(査読有)

4. Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, Eizuru Y.: Determinant of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer* 105:438 (2011) (査読有)

5. Aguayo F, Anwar M, Eizuru Y et al.: Human papillomavirus-16 presence and physical status in lung carcinoma from Asia. *Infect Agent Cancer* **5**:20 (2010) (査読有)

6. Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, et al.: Frequent expression of thymidine phosphorylase in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas of diffuse type. *Anticancer Res.* **30**:1196 (2010) (査読有)

7. Kusano S, Eizuru Y: Human I-mfa domain proteins specifically interact with KSHV LANA and affect its regulation of Wnt signaling-dependent transcription. *Biochem Biophys Res Commun* **396**:608 (2010) (査読有)

8. Kuramoto T, Daikoku T, Eizuru Y et al. Novel anticytomegalovirus activity of immunosuppressant mizoribine and its synergism with ganciclovir. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **333**:608 (2010) (査読有)

9. Baba M, Castilo A, Eizuru Y, et al.: Human papillomavirus is frequently detected in gefitinib-responsive lung adenocarcinoma. *Oncol. Rep.* **23**:1085 (2010) (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 櫻本 幸成、草野 秀一、鮫島 浩介、榮鶴 義人: アフリカ伝統医薬の抗ガン作用の解析。日本抗ウイルス療法研究会、平成 22 年 5 月 21 日、熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榮鶴 義人 (EIZURU YOSHITO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 00041351