

学位論文
Doctoral Thesis

沖縄生物資源の PAK1 阻害に関する研究

Studies on PAK1 inhibition of Okinawan bioresources

鹿児島大学大学院連合農学研究科応用生命科学専攻

平良 望

Nozomi Taira

2017 年 9 月

目次

略語一覧	- 4 -
要約	- 5 -
第 1 章 序論	- 9 -
1-1. 本研究の背景	- 9 -
1-2. PAK1 [p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1]	- 10 -
1-3. 線虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	- 10 -
1-4. 沖縄県の亜熱帯植物	- 11 -
1-5. 本研究の目的	- 12 -
図 1	- 13 -
第 2 章 ゲットウ (<i>Alpinia zerumbet</i>) 由来成分の新たな機能性の探索	- 15 -
2-1. ゲットウの多様な機能性	- 15 -
2-2. ゲットウ Leaf に含まれる寿命延長効果物質の構造解析	- 16 -
2-2-1. 抽出物の作製および主要成分の単離・同定	- 16 -
2-2-2. 構造解析	- 17 -
2-2-3. 考察	- 18 -
2-3. 線虫の寿命延長メカニズム	- 18 -
2-4. ゲットウ由来化合物の PAK1 阻害活性	- 19 -
2-4-1. 試験方法	- 19 -
2-4-2. 試験結果	- 20 -
2-5. ゲットウ由来化合物の抗ガン活性	- 20 -
2-5-1. 試験方法	- 21 -
2-5-2. 試験結果	- 21 -
2-5-3. 考察	- 22 -
2-7. ゲットウ由来化合物の毛細胞増殖効果	- 23 -
2-7-1. 試験方法	- 23 -
2-7-2. 試験結果	- 24 -
2-7-3. 考察	- 25 -
2-8. 本章のまとめ	- 26 -

2-9. 統計分析.....	- 26 -
図 2.....	- 27 -
表 2.....	- 35 -
第 3 章 沖縄産プロポリス (OP) の PAK1 阻害による寿命延長効果	- 37 -
3-1. 様々なプロポリスに含まれる生理活性物質	- 37 -
3-2. OP の特色	- 37 -
3-3. OP の抽出	- 38 -
3-4. 実験に使用した線虫株	- 39 -
3-5. OP の線虫に対する HSP-16.2 遺伝子発現量増加効果	- 39 -
3-5-1. 試験方法	- 40 -
3-5-2. 試験結果	- 40 -
3-6. OP の線虫に対する寿命延長効果	- 40 -
3-6-1. 試験方法	- 41 -
3-6-2. 試験結果	- 41 -
3-5. OP の PAK1 阻害活性および抗ガン活性	- 42 -
3-5-1. 試験方法	- 42 -
3-5-2. 試験結果	- 43 -
3-5-3. 考察	- 44 -
3-6. OP の B16F10 細胞に対する抗メラニン産生効果	- 44 -
3-6-1. 試験方法	- 45 -
3-6-2. 試験結果	- 47 -
3-7. PAK1 阻害の <i>in vivo</i> 試験の検討	- 47 -
3-7-1. 試験方法	- 47 -
3-7-2. 試験結果	- 48 -
3-8. OP に含まれる成分の構造解析	- 48 -
3-9. プレニルフラボノイドの機能性	- 49 -
3-10. 本章のまとめ	- 50 -
3-11. 統計分析	- 51 -
図 3.....	- 52 -
表 3.....	- 62 -
総論	- 63 -

謝辭	- 65 -
引用文獻	- 66 -

略語一覧

PAK1…[p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1]

沖縄産プロポリス…OP

dihydro-5,6-dehydrokawain…DDK

5,6-dehydrokawain…DK

8(17),12-labdadiene-15,16-diol…labdadiene

ゲットウ Leaf 抽出物…ALP

quercetin-3-*O*- β -D-glucuronide…QOG

kaempferol-3-*O*- β -D-glucuronide…KOG

ヒートショックプロテイン…HSP

ニュージーランド産プロポリス…Bio 30

caffeic acid phenethyl ester…CAPE

ブラジル産グリーンプロポリス…GP

artepillin C…ARC

Median Survival Time…MST

Caenorhabditis Genetics Center…CGC

要約

高齢化が進む日本では、日常的・継続的な医療や介護に依存せず自立した生活ができる期間、すなわち健康寿命を延ばすことが必要である。そのために、副作用が無く様々な病態に有効な天然化合物が注目されている。PAK1 [p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1] はガン、二型糖尿病、アルツハイマー病、肥満、高血圧、脱毛、そしていくつかの炎症および感染症を含む、多様な病態に関与すると報告されている。そこで本研究では、沖縄県に由来する亜熱帯生物資源に着目し、健康寿命の延長が期待される新規天然 PAK1 阻害剤を探索し、ゲットウ (*Alpinia zerumbet*) と沖縄産プロポリス (OP) がその有力な候補であることを発見した。

第 1 章は、本研究の背景を示したものであり、沖縄県の亜熱帯生物資源とその生理活性、およびこれらと PAK1 の阻害の関連を議論した。

第 2 章では、ゲットウから単離された生理活性物質が毛細胞の成長を促進し、ガン細胞の増殖を阻害することを発見した。単離した化合物である kaempferol-3-O-β-D-glucuronide (KOG) および labdadiene は PAK1 阻害効果を示し ($IC_{50} = 39.3 \mu M$ および $52.1 \mu M$)、ヒト濾胞毛乳頭細胞の増殖を促進させた (118-181% および 132-227%、 $10-100 \mu M$)。これらの化合物によって刺激された毛細胞の増殖率は、脱毛に対する治療で一般的に使用される minoxidil よりも有意に高い値であった。更にこれらは A549 肺ガン細胞に対して抗ガン作用を示した ($IC_{50} = 81.4 \mu M$ および $67.1 \mu M$)。これらのゲットウ由来生理活性物質の抗脱毛および抗ガン作用は、PAK1 の阻害に起因すると考えられた。

第 3 章では、OP の PAK1 阻害活性を検討し、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) をモデル生物として、その寿命延長効果と産卵数に与える影響、さらにメラニン産生阻害および抗ガン作用を調査した。その結果、OP は PAK1 を阻害し、A549

肺ガン細胞の抗ガン活性を示すことが分かった ($IC_{50} = 5.2 \mu\text{g/mL}$, $12 \mu\text{g/mL}$)。また OP は線虫の産卵数を減少させ、線虫の寿命を有意に延長させた。これらの効果は線虫の HSP16.2 遺伝子の活性化によると考えられた。更に、OP は細胞内チロシナーゼ活性を下方制御することによって、メラノーマ細胞株 (B16F10) 内でのメラニン産生を阻害した ($IC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$)。これらの結果は OP が PAK1 を不活性化して線虫の寿命延長効果、抗ガンおよびメラニン産生阻害活性を示した事を示唆している。従って、OP は PAK1 を標的分子とした様々な病態治療のための、副作用のない天然医薬品または栄養補助食品等の候補になると期待される。

Abstract

In Japan where aged generation is taking considerable part of the population, it should be necessary to prolong the period of the healthy life independent on consecutive therapy and care for the aged people. PAK1 [p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1] has been reported to be responsible for many diseases including cancer, type 2 diabetes, Alzheimer's disease, obesity, hypertension, hair loss, and a number of inflammatory and infectious diseases. Thus, I focused on bioresources derived from Okinawa and searched for novel natural PAK1 inhibitors that expected prolong healthy life expectancy. In this study, I found that two subtropical bioresources, *Alpinia zerumbet* (Alpinia) and Okinawa propolis (OP), have effects of PAK1 inhibition and some various PAK1-dependent disorders.

In the first study, PAK1-inhibiting bioactive compounds isolated from *Alpinia* were found to markedly promote hair cell growth. Two of the isolated compounds, kaempferol-3-O- β -D-glucuronide (KOG) and labdadiene, increased the proliferation of human follicle dermal papilla cells by approximately 117%–180% and 132%–226%, respectively, at 10–100 μ M. The hair cell proliferation induced by these compounds was significantly higher than that of minoxidil, a commercially available treatment for hair loss. Furthermore, the isolated compounds derived from *Alpinia* exhibited anticancer activity against A549 cell line (human lung cancer cell) with IC₅₀ in the range of 67–99 μ M. Regarding the mechanism underlying their action, I hypothesized that the anti-alopecia and anticancer activities of these compounds could be attributed to the inhibition of the PAK1.

In the second study, OP was shown to exhibit PAK1 inhibition, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) longevity, anti-melanogenesis, and anticancer activities. I found that OP blocked PAK1 and exhibited anticancer activity in the A549 cell line with IC₅₀ values of 6 µg/mL and 12µg/mL, respectively. Most interestingly, OP significantly reduced reproduction and prolonged the lifespan of *C. elegans* by activating the HSP-16.2 gene. Furthermore, OP inhibited melanogenesis in a melanoma cell line (B16F10) by downregulating intracellular tyrosinase activity with an IC₅₀ of 30 µg/mL. Our results suggest that OP demonstrated a life span extending effect of *C. elegans*, anticancer, and anti-melanogenic effects via PAK1 inactivation. Therefore, OP could be a potent natural medicinal supplement against PAK1-dependent diseases without harmful effects.

第 1 章 序論

1-1. 本研究の背景

高齢化が進む日本では、日常的・継続的な医療や介護に依存せず自立した生活ができる期間、いわゆる健康寿命を延ばすことが必要である。2013 年の調査では、男性の寿命は 80.21 年、女性の平均寿命は 86.61 年であり、2003 年と比較して、男性は 1.85 年、女性は 1.28 年上回っている（厚生労働省, 2015）。この上昇傾向は 2015 年まで続いており、2017 年以降も上昇するとみられる。このように日本は今や世界でも有数の長寿国であるが、2015 年の日本人の死因別死亡確率は、老衰による死亡確率は男性が 13.21%、女性が 22.44%であり、悪性新生物・心疾患および脳血管疾患の合計が 90 歳の時点で男性が 39.49%、女性が 38.50%と、老衰を大きく上回っている（図 1-1）（厚生労働省, 2015）。すなわちこの長寿はガンや心臓病、糖尿病や認知症などの慢性疾患の医療や薬物による延命の結果にすぎないとも見える。事実「日常生活に制限のない期間の平均」は 2013 年で男性が 71.19 年、女性が 74.21 年であるのに対し、「日常生活に制限のある期間の平均」は男性が 9.01 年、女性は 12.40 年である（厚生労働科学研究, 2015）。そこで「日常生活に制限のない期間の平均」すなわち健康寿命を延ばすため、慢性疾患に対する治療薬・予防薬が強く望まれている。

医薬には合成化合物と天然化合物があるが、Harvey によれば、薬剤開発のソースまたはリード化合物の割合は、およそ 5 割が天然化合物およびその誘導体、または天然化合物に関連した化合物であり、現在においても天然化合物は、新たな医薬品または医薬品の原料として利用できる資源である（Harvey, 2008）。一方、副作用のある治療薬は寿命を延ばす効果はあるが、日常生活に制限のある副作用の場合、健康寿命を延ばすことはできない。天然化合物は合成化合物と比較

して副作用が少ない場合が多く、化合物の多様性が合成化合物と比較して優れている (Feher and Schmidt, 2003) と考えられており、例えば Omura らは微生物が作り出す有用な天然化合物を多数発見し、またそれらの天然化合物の発見が、抗ガン剤などの医薬品の開発に結びついている (Omura, 2011)。これらのことより、健康寿命を延ばすためには、副作用が無く様々な病態に有効な天然化合物が期待される。

1-2. PAK1 [p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1]

近年、様々な病態に対する鍵となる役割を果たすことで知られている PAK1 が注目されている。PAK1 とは、[p21 (RAC/CDC42)-activated kinase 1] の略称であり、ガン、二型糖尿病、アルツハイマー病、肥満、高血圧、いくつかの炎症および感染症を含む多様な病態に関与する発ガン/老化キナーゼであると報告されている (図 1-2) (Maruta, 2014)。過去 20 年間の生化学的および遺伝学的研究の報告では、ガン遺伝子 RAS を介した正常細胞の悪性化に、PAK1 が不可欠な役割を持つと証明されている (He et al., 2001; Huynh et al., 2010)。また、PAK1 は神経線維腫症、乳房や前立腺のガン、RAS-誘導膀胱癌や結腸ガンを含む人体内の 70%ものガンの悪性化に関与している (Messerli et al., 2009)。

1-3. 線虫 (*Caenorhabditis elegans*)

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) は 20 °C で生育可能、短い孵化～成虫～産卵期間、平均寿命 20～30 日、変異体も購入可能で神経系統を持つ、といったことなどから実験生物として非常に優れた性質を持つ。老化、酸化ストレスなどの遺

伝的な部分でヒトとの共通点があることから、これらの研究にモデル生物として用いられている。その寿命の変化を観察することで、アンチエイジング作用などを細胞レベルで検討することができる。加えて、生体内で寿命調節に関与する遺伝子が同定されている (Mihaylova et al., 1999; Murphy et al., 2003; Walker and Lithgow, 2003)。このモデル生物である線虫を用いることによって、PAK1 の下方制御が寿命延長、熱ストレス耐性上昇、繁殖減少を導くことが示されている (Yanase, 2013)。

1-4. 沖縄県の亜熱帯植物

本研究では PAK1 阻害活性を有する新たな天然化合物を発見するため、沖縄県に由来する天然資源に着目した。沖縄県は国内唯一の亜熱帯地域であり、多種多様な植物が存在することから亜熱帯天然化合物の宝庫とも呼ばれている。沖縄県の植物相をみると、琉球列島に自生する維管束植物は約 1,600 種であり、本州の植物相と比較すると、10km² 当たりの種数で琉球列島が 4.5 に対し本州が 0.1 である。単位面積当たりで琉球列島は日本本土の 45 倍も種数が多く、琉球列島は日本でも有数の天然化合物の資源庫であるといえる (Shimabukuro, 1984)。沖縄県の亜熱帯植物には、人の健康に良いと古くから伝えられ食されてきた植物が約 300 種以上も存在し、薬草として利用されていた (Tawata et al, 1998)。そのうち幾つかの植物は、県内外の企業等によって商品化がなされ、地域経済に寄与している。

1-5. 本研究の目的

上記の議論より、PAK1 阻害活性を有する物質はヒトの健康寿命を延ばすための医薬品・健康食品の素材として有望であると考えられ、新たな PAK1 阻害活性化合物を探索することで、将来、副作用の無い医薬・健康食品の開発へと繋がる事が期待される。本研究では、新規天然 PAK1 阻害剤の探索の結果、沖縄県の亜熱帯生物資源である、ゲットウ (*Alpinia zerumbet*) と沖縄産プロポリス (OP) がその有力な候補であることを発見した。

第 2 章では、寿命延長効果を有するゲットウ Leaf 抽出物から、主要な生理活性物質を単離・同定した。それらの化合物およびゲットウの様々な部位に含まれる化合物を、PAK1 阻害活性試験、抗ガン活性試験、毛細胞増殖効果試験に供し、ゲットウの新たな機能性を見出すことを目的とした。

第 3 章では、将来有望な沖縄生物資源として沖縄産プロポリス (OP) を選定し、線虫の寿命延長効果試験、PAK1 阻害活性試験、抗ガン活性試験、メラニン産生阻害活性試験に供した。PAK1 阻害物質が線虫の産卵数を減少させる事に注目し、OP を用いて PAK1 阻害の *in vivo* 試験の検討を行った。これらの結果から、OP が地域経済に寄与できる新たな資源として利用できるかを検証した。

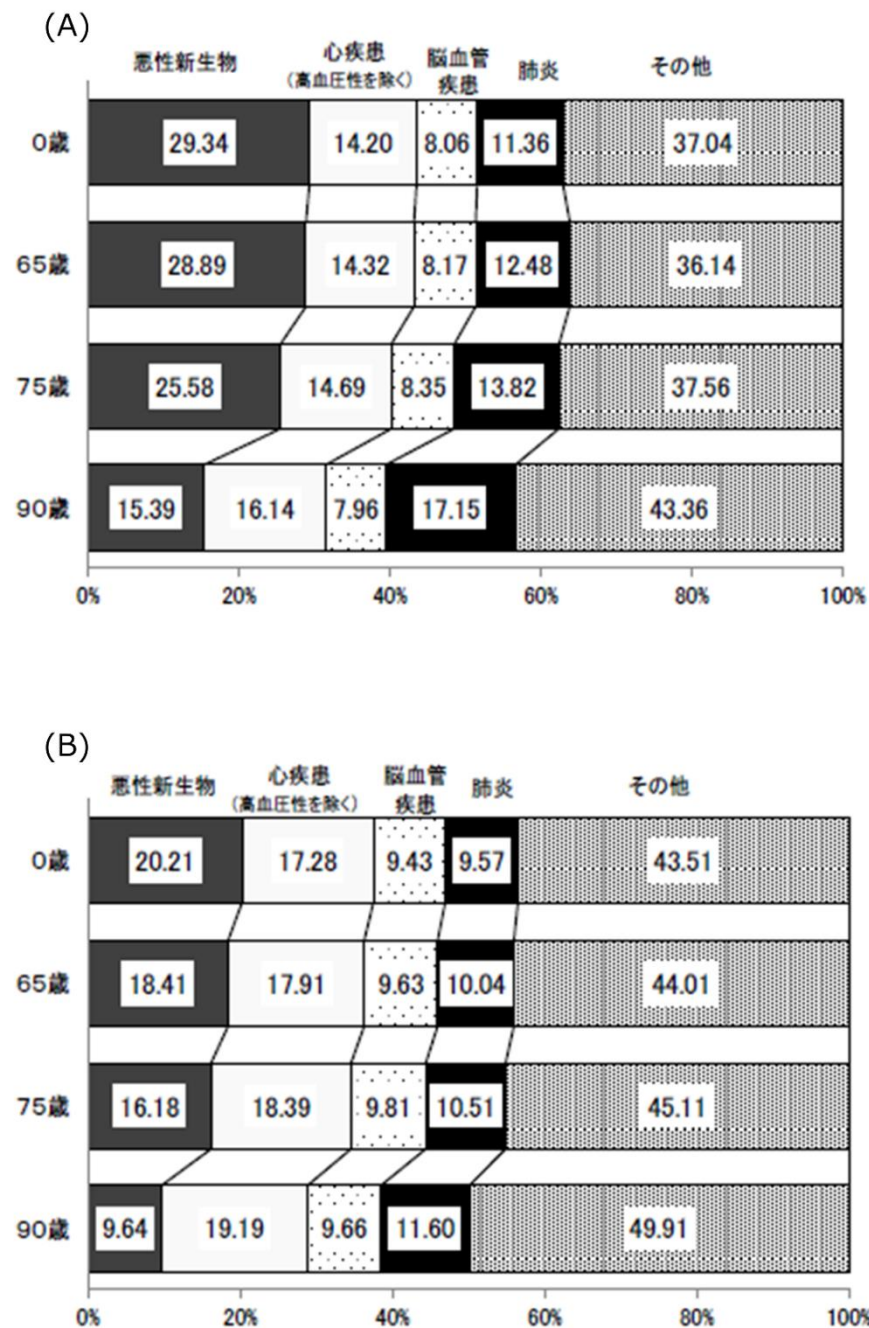


図 1-1. 日本の死因別死亡確率（主要死因）（平成 27 年）

(A)：男性の死因別死亡確率 (B)：女性の死因別死亡確率

出典：厚生労働省，平成 27 年簡易生命表の概況，結果の概要 4 死因分析

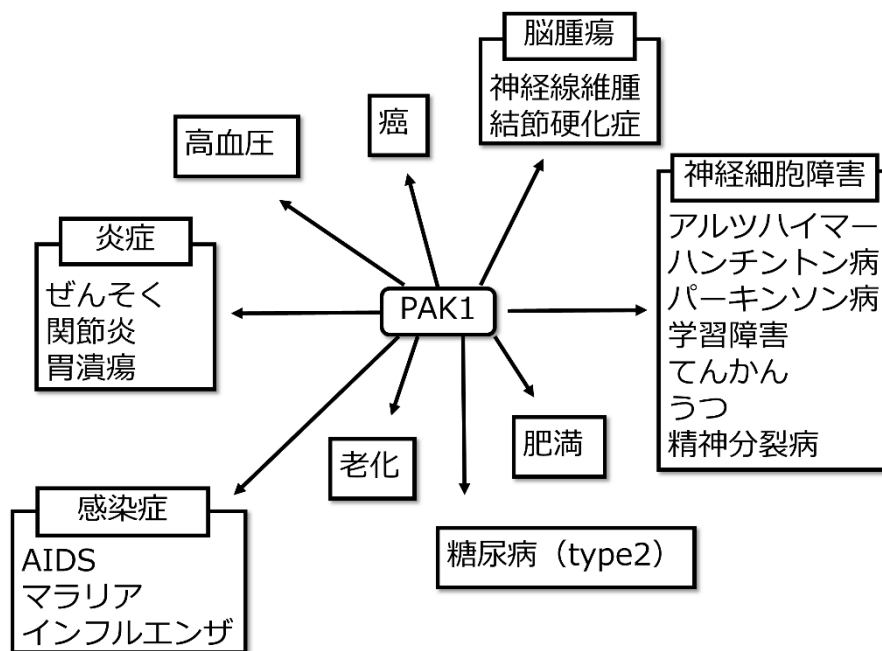


図 1-2. 多様な病態の鍵となる発ガン/老化キナーゼ PAK1 (p21-activated kinase)

PAK1 が鍵となる様々な病気の治療・予防のために、副作用の無い PAK1 阻害剤の開発や天然化合物の発見が望まれている。

第2章 ゲットウ (*Alpinia zerumbet*) 由来成分の新たな機能性の探索

2-1. ゲットウの多様な機能性

ゲットウは多年生のショウガ科植物であり、南アメリカ、オセアニアやアジアなどの熱帯、亜熱帯地方に広く分布している。日本では、九州南部から沖縄県にかけて分布しており、沖縄本島では至る所で見かけることができる。沖縄県では方言でサンニンと呼ばれ、この植物が古くから利用されている。主に風邪に対して効能があると言い伝えられており、抗炎症、抗菌、抗カビ作用を有する (Zoghbi et al., 1999)。また、ゲットウの葉が沖縄県の伝統的な料理である「ムーチー」の包みとして使用されているのは、ゲットウの葉に抗菌作用および風邪の予防効果があるとされているためである (Tawata et al., 2008)。茎は繊維や障子紙、かりゆしウェアなどの衣服に加工され、根茎は香辛料や飲料として利用されている。

この植物について、多くの研究者が様々な生理活性物質の発見を目的として調査を行った結果、ゲットウの葉には、フラボノイド類が豊富に含まれることが報告されており、これまでに (+)-catechin、(-)-epicatechin、rutin, quercetin, kaempferol, dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK)、および 5,6-dehydrokawain (DK) などが同定されている (Elzaawely et al., 2007; Mpalantinos et al., 1998)。また、ゲットウの根茎から methyl *trans*-cinnamate、DK、DDK、flavokawin-B、cardamonin、alpinetin、8(17),12-labdadiene-15,16-diol (labdadiene) およびセスキテルペン類が同定されている (Itokawa et al., 1981; Morita et al., 1996)。ゲットウの種からは、(*E*)-15,16-bisnorlabda-8(17)-11-diene-13-one、coronarin E、および labdane 型ジテルペンである zerumin A と zerumin B が同定されている (Hong-Xi Xu et al., 1996)。このように、ゲット

ウには多種多様な化合物が含まれており、それら生物活性物質の多様な機能性の調査が現在に至るまで続けられている。

さらにゲットウには抗菌、殺虫、抗カビ作用を有する生物活性物質が数多く含まれていることが明らかとなっており (Tawata et al., 1996)、DK、DDK は HIV-1 インテグラーゼ阻害活性およびノイラミニダーゼ阻害活性 (Upadhyay et al., 2011)、labdadiene は終末糖化産物の生成阻害 (Chompoo et al., 2012) や皮膚関連酵素阻害活性を有することが報告された (図 2-1) (Chompoo et al., 2011)。

また、ゲットウの機能性先行研究では、ゲットウの各部位の抽出物や、ゲットウに含まれる様々な成分を対象として、線虫に対する寿命延長効果が、ゲットウ Leaf 抽出物 (ALP) の寿命延長効果、熱ストレス耐性効果が明らかにされている (Upadhyay et al., 2013)。

本章では、先行研究で寿命延長効果が見いだされた ALP から、活性本体と思われる 2 種類の化合物を単離・同定した。そしてゲットウに含まれる成分の PAK1 阻害活性、抗ガン活性、毛細胞増殖活性を測定し、ゲットウの新たな機能性を検証することを目的とした。

2-2. ゲットウ Leaf に含まれる寿命延長効果物質の構造解析

2-2-1. 抽出物の作製および主要成分の単離・同定

ゲットウの新鮮な葉 (50 g) を 50% ethanol (500 mL) で 48h 抽出した。ろ過した粗抽出物を 40 °C の減圧ろ過で蒸発乾固した。粗抽出物を水に再溶解させ (10 mg/mL)、Hexane および Ethyl acetate で分配クロマトグラフィーを行った。

水溶性画分をゲットウLeaf抽出物 (ALP) とし、高速液体クロマトグラフィーを用いて単離した。移動相は溶媒Aをdistilled water、溶媒Bをmethanolとし、以下の条件で溶出した (0 – 27 min, 10 % solvent B; 27 – 30 min, 90 % solvent B) (図2-2)。単離した化合物AとBをNMRおよびLC/MSで構造解析し同定した。データは以下の通り。

化合物A… $\{^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4): δ 3.30–3.68 (m, 1H, sugar), 5.33 (d, 1H, CH, $J = 6.0$ Hz), 6.21 (s, 1H, CH), 6.39 (s, 1H, CH), 6.83 (d, 2H, CH $J = 9.1$ Hz), 7.53 (d, 2H, CH $J = 10.5$ Hz) 7.81 (s, 1H, CH). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 71.8, 74.2, 76.3, 76.5, 94.0, 99.1, 101.5, 104.3, 115.6, 116.5, 121.3, 122.2, 133.5, 145.4, 149.1, 156.7, 161.6, 164.7, 170.2, 177.6. MS (ESI): m/z 479 $[\text{M} + \text{H}]^+$ }。

化合物B… $\{^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOD- d_4): δ 3.32–3.78 (m, 1H, sugar), 5.38 (d, 1H, CH, $J = 7.5$ Hz), 6.22 (s, 1H, CH), 6.42 (s, 1H, CH), 6.89 (d, 2H, CH, $J = 8.8$ Hz), 8.10 (d, 2H, CH, $J = 8.8$ Hz). $^{13}\text{C-NMR}$: δ 71.9, 74.4, 76.1, 76.3, 94.1, 99.2, 101.5, 104.3, 115.5, 121.1, 131.4, 133.5, 156.8, 160.5, 161.6, 164.7, 169.9, 177.7. MS (ESI): m/z 463 $[\text{M} + \text{H}]^+$ }。

2-2-2. 構造解析

$^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルおよび MS スペクトルから、化合物 A はグルクロン酸とフラボノイド類が結合したフラボノイド配糖体と推定した。グルクロン酸部分ならびにアグリコン部分の構造の完全な同定は、過去の文献ならびに $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC などの二次元 NMR 分析によって行った。その結果、化合物 A は、quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide (QOG) と同定された。化合物 B は化合物 A と類似したスペクトルパターンで、構造が類似していると考えられ、かつ

分子量が 16 少ない。よって化合物 B は化合物 A よりヒドロキシ基が一つ少ない類縁体だと推定し、NMR スペクトルの結果から Kaempferol 3-*O*-β-D-glucuronide (KOG) と同定した (図 2-3)。ゲットウからの KOG の発見は、本報告が初である。

2-2-3. 考察

フラボノイドは植物起源の食物中に遍在して存在するポリフェノール化合物である。これらの食事の成分は、特に心臓血管系の健全性を維持するために、健康の維持において重要であると考えられている。quercetin は、野菜、果物、紅茶、ワインなどの食品中で最も広く分布している食物中のポリフェノール化合物の 1 つであり、主に QOG のようなグリコシドの形態で存在する。大腸内の腸内細菌のグリコシダーゼ活性によって、食物グリコシドがそれぞれのアグリコンに変換され、さらに腸管粘膜でグルクロン酸化または硫酸化誘導体に代謝されることが考えられており、QOG が心臓血管疾患の進行に関連する血管平滑筋細胞 (VSMC) 障害に対して予防効果を発揮することも明らかになっている (Ishizawa et al., 2011)。KOG に関する知見は少ないが、類縁体である QOG と近い効果を有していると考えられる。よって ALP に含まれる QOG と KOG が寿命延長メカニズムに関与していると想定した。

2-3. 線虫の寿命延長メカニズム

線虫の寿命延長やヒートショックプロテイン (HSP16.2) 遺伝子の発現は、上流の FOXO によって制御されている (図 2-4)。FOXO は AMPK (AMP-activated protein kinase) によって正に制御され、PAK1 {RAC/CDC42(p21)-

activated kinases 1}によって負に制御される。また、FOXO はインスリン / IGF-1 を出発点とするシグナル伝達系から PI3 キナーゼを経て活性化されるプロテインキナーゼ (AKT) によっても負に制御される。インスリン / IGF-1 シグナル経路は生体内で重要な経路であるため、これを阻害すると重大な副作用がみられるはずだが、ゲットウ Leaf 抽出物 (ALP) を線虫に摂食させても副作用を示さなかった。そこで、ALP の寿命延長効果や熱ストレス耐性上昇効果は PAK1 阻害による FOXO の活性化に基づくという機構を以下に検討した。

2-4. ゲットウ由来化合物の PAK1 阻害活性

前述のとおり、線虫の寿命延長メカニズムには FOXO が関与しており、PAK1 はこれを下方制御する。事実、PAK1 が欠損した線虫変異体 (RB689) の寿命は野生型 (N2) より 60% も高いと報告されたことから、PAK1 の阻害が寿命延長効果の鍵であることを示唆している (Yanase, 2013)。ゲットウ由来化合物が PAK1 を阻害することによって ALP が寿命延長効果を有したと想定し、ゲットウ Leaf から単離した化合物を含む、ゲットウの様々な部位から単離した化合物を PAK1 阻害試験に供した。

2-4-1. 試験方法

ゲットウに含まれる labdadiene、DK、DDK は Chompoo らの方法に基づいてゲットウ根茎から単離した (Chompoo et al., 2012)。

PAK1 キナーゼ活性は ADP-Glo™ キナーゼアッセイキット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定し、ヒト PAK1 (25 ng/reaction) を試験用化合物 (5 μ l) と共に 10 min 培養した。キナーゼ反応を 2.5 x adenosine

triphosphate (ATP)/substrate mix (10 μ l) で開始し、40 min後、25 μ L ADP-Glo™ 試薬を用いて反応を終了した。さらにキナーゼ検出試薬 (50 μ l) を添加し30 min反応させた後、蛍光量をMTP-800Labマイクロプレートリーダー (Corona, Ibaraki, Japan) で測定した (積分刻み時間 : 0.5s/well) 。結果はコントロールの値と比較してパーセンテージで算出した。

2-4-2. 試験結果

KOG の寿命延長メカニズムの解明のために、PAK1 の阻害活性を測定した。その結果、KOG は PAK1 阻害効果を示した ($IC_{50} = 39.3 \mu M$) (表 2-1) 。更にゲットウ根茎に含まれる DK および DDK も高い PAK1 阻害活性を示した ($IC_{50} = 17.1 \mu M$ and $10.3 \mu M$) 。ポジティブコントロールであるブルーベリー由来 resveratrol や、ウコン由来 curcumin およびゴーヤー由来 cucurbitacin I も高い PAK1 阻害活性を示した ($IC_{50} = 15.0 \mu M$, $12.9 \mu M$ and $19.0 \mu M$) 。resveratrol や curcumin は寿命延長効果物質として知られており、PAK1 阻害が寿命延長の一助となっている (Maruta, 2014) 。KOG もこれらの PAK1 阻害剤と同様に、ゲットウ Leaf 抽出物の寿命延長に寄与していると思われる。

2-5 ゲットウ由来化合物の抗ガン活性

ガンによって世界中で毎年 100 万人が発症し、循環器系の病気により死に至っている (Naresh Kumar et al., 2016) 。正常細胞を傷つけずにガン細胞のみを除去する抗ガン剤の開発は、今日においても重要な課題である (El-Ansary et al., 2014) 。

PAK1 阻害剤である cucurbitacin I は肺腺ガン由来細胞に対して非常に強い

抗ガン活性を有している (Nguyen et al., 2016) 。これは発ガン性 RAS-PAK1 経路によるものと考えられている (図 2-5) (Maruta, 2014) 。RAS は下流のターゲットとの相互作用により、下流のシグナル (PI-3 kinase) PI3 キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase) および RAC / CDC42 を介して PAK1 を活性化し、PAK1 は β カテニン / RAF、LIM キナーゼおよび VEGF を活性化することで、固形腫瘍の悪性増殖、ガン転移および血管新生をもたらす。そこで、PAK1 阻害活性を有するゲットウ由来化合物の抗ガン活性を検討するため、肺腺ガン細胞 (A549) を用いた抗ガン活性試験を行った。

2-5-1. 試験方法

A549細胞の増殖試験はZhouらの実験に基づいた (Zhou et al., 2013) 。肺腺ガン細胞 (A549) は96ウェルプレートに播種し (1×10^4 cells/well) 、24 h培養後に化合物を添加した。細胞は5 % CO₂インキュベーターで37 °Cにて72 h培養した。各ウェルにMTT溶液 (0.5 mg/mL) 20 μ lを添加し、プレートを3h培養した。培地を除去した後、ホルマズン結晶をDMSO 200 μ lで溶解した。プレートを10 min攪拌した後、マイクロプレートリーダー (Corona, Ibaraki, Japan) を用いて490 nmで測定し細胞生存率を評価した。DMSOをブランクとし、結果はコントロールの値と比較してパーセンテージで算出した。

2-5-2. 試験結果

単離した化合物の抗ガン活性を MTT アッセイによって測定した結果、ゲットウ由来化合物では labdadiene が肺腺ガン細胞 (A549) の増殖に対して最も強い阻害効果を示し、次いで KOG が高い抗ガン活性を示した ($IC_{50} = 67.1 \mu M$ and $81.4 \mu M$) (表 2-2) 。ポジティブコントロールであるブルーベリー由来

resveratrol や、ウコン由来 curcumin およびゴーヤー由来 cucurbitacin I も高い抗ガン活性を示した ($IC_{50} = 22.6 \mu M, 30.3 \mu M$ and $0.14 \mu M$)。

2-5-3. 考察

合成による新奇化合物および新薬開発の分野の急成長にも関わらず、ガン予防と治療においては、天然由来合成物は現在においても価値ある原料である。例えば、現在承認されている化学療法ガン薬品の 60%は天然由来合成物である (Srivastava et al., 2015)。同様に本章で議論したゲットウ由来の天然化合物は、A549 細胞の増殖に不可欠な PAK1 の阻害に寄与することで抗ガン作用を示したが、その分子メカニズムと構造活性の関係は今後の研究課題である。またこれに加え、臨床的・化学的な観点から、抗ガン活性の改良を目指した更なる効果を持つこれらの化合物の誘導体の開発も期待される。

2-6. PAK1 の毛細胞抑圧

脱毛は毛が生えない傾向をいい、男女の肉体的・精神的ストレスに影響される (Junlatat and Sripanidkulchai, 2014; Kawano et al., 2009)。脱毛は病気では無く遺伝的要因であると考えられ、さらに栄養不足・ホルモンのバランス異常・老化・およびストレスの結果であると考えられている (McElwee and Sinclair, 2008; Sun et al., 2013)。脱毛の治療はコストがかかり、ウィッグや増毛移植などのシンプルな治療法が一般的である。近年までの薬物治療は一時的な解決にすぎず、治療を止めると再び脱毛が始まってしまう (Dong et al., 2014)。脱毛に対する新薬開発の多大な努力にも関わらず、ここ数年で実用化されたものは、米国 FDA が開発した finasteride および minoxidil の 2 つしかない (Kang et

al., 2012)。さらに不運にも、この2つの治療薬にはそう痒症・スケーリング・局所刺激・皮膚炎・および生殖不全といった副作用がある (Vera H. Price, 1999; Zhang et al., 2013)。

薬草の化合物は脱毛の処置に対応できると期待されており、プロポリスなどは副作用が無い事が報告されている (Kim et al., 2007; Patel et al., 2015)。したがって、天然化合物の育毛・発毛促進効果は、脱毛に対する新たな治療薬の指標であり、その探索が新薬開発にとって有望であると考えられる。いくつかの薬草成分である、curcumin、apigenin、プロポリス由来 artepillin C などの PAK1 阻害剤が育毛・発毛促進効果を示すことはこの観点から興味深く、PAK1 は毛細胞の抑圧を引き起こしている可能性が示唆されている (Huh et al., 2009; Miyata et al., 2014; Nguyen et al., 2016)。

2-7. ゲットウ由来化合物の毛細胞増殖効果

前述のとおり、PAK1 阻害剤が毛細胞増力効果をもたらすと考え、ゲットウ Leaf 抽出物、ゲットウ由来化合物の labdadiene および KOG を毛細胞増殖試験に供した。

2-7-1. 試験方法

ヒト毛乳頭細胞 (Human Follicle Dermal Papilla Cells: HFDPC) (TOYOBO, Tokyo, Japan) の増殖試験はNguyenらの実験に基づいて行った (Nguyen et al., 2016)。細胞は乳頭細胞増殖培地 (PCGM) 50 mL、0.5 mL FCS、0.5 mL BPE、0.25 mL Cyp、0.25 mL ITT (total 51.5mL) を含む培地で培養した。細胞生存率はトリパンプルー染色によるMTTアッセイによって評価した。細胞を

採集しD-MEMおよび10 % FBSによって希釈 (1×10^4 cells/mL) した後、細胞懸濁液 (200 μ l) をコラーゲンコートされた96ウェルマイクロプレートに2,000 cells/wellの濃度で移植した。72 hの培養後、DMEMと混合したサンプル (単離した化合物) 200 μ lを添加し、更に96 hの培養後、D-MEMで希釈したMTT溶液 (0.4 mg/mL) を添加し、2 h培養した。これよりMTT溶液を除去し、2-propanol 100 μ lを各ウェルに添加しホルマザン結晶を溶解させ、吸光度をマイクロプレートリーダーにより570 nmおよび650 nmで測定した。細胞生存率はコントロールの値と比較してパーセンテージで算出した。

2-7-2. 試験結果

ゲットウLeaf抽出物 (ALP) と単離した化合物のHFDPC増殖促進効果をMTTアッセイにより評価した結果、ALPの毛細胞の増殖率は10-200 μ g/mLで111-180 %と濃度依存的に増加した (図2-6)。

過去の研究ならびに本研究により、ゲットウの葉には様々な生物活性成分、中でもフラボノイド類が含まれると報告されている (Mpalantinos et al., 1998)。また、いくつかのフラボノイド、baicalin、apigenin、およびquercetinなどはモデル生物マウスや細胞培養による実験で毛細胞の増殖が促進したと報告されているので (Huh et al., 2009; Shin et al., 2014; Wikramanayake et al., 2012)、ゲットウ抽出物の毛細胞増殖促進効果にはフラボノイド類であるKOGが関与していると考えた。

KOG の HFDPC 増殖促進効果を ALP と同様に評価したところ、KOG の系では毛細胞の増殖率が 10-100 μ M で 118-181 %と濃度依存的に増加した (図 2-7)。更に labdadiene も同様に毛細胞の増殖率が 10-100 μ M で 133-227 %と濃度依存的に増加した (図 2-8)。これらの化合物は、ポジティブコントロールで

ある minoxidil (10 μ M) に匹敵する効果を示した。

2-7-3. 考察

ヒトの毛髪はひたすら成長するわけではなく、発毛・育毛・脱毛という一連の期間を繰り返している。この毛周期（ヘアサイクル）には3段階あり、成長期（anagen）、退行期（catagen）および休止期（telogen）に分類されている（Kwon et al., 2007）。このサイクルでは、毛細胞の底に位置する毛乳頭が最も重要な要素であり、新たな毛包の構成と髪成長の調節の主な役割を持つ（Rho et al., 2005）。最も実行可能かつ便利な方法で育毛・発毛促進効果を評価するには、毛乳頭の増殖率に様々な化合物によって影響を与える事である。過去の研究によると、様々な経路によっていくつかの物質が発毛を促進すると報告されている。例えば Steroid-5 α -reductase による発毛の単純な刺激は、dihydrotestosterone への testosterone の変換を引き起こす（Wright et al., 1996）。minoxidil は β -カテニンシグナル伝達の活性化、および毛乳頭細胞内の ATP-感受性カリウムチャネルの開放によって anagen を拡大する（Kwack et al., 2011; Shorter et al., 2008）。また、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の上方制御を経由した発毛の刺激も発見されている（Lachgar et al., 1996）。しかし curcumin、apigenin、および artemisinin C（プロポリス由来）のような PAK1 阻害剤は、実際は毛細胞の成長を抑圧している可能性が高い（Miyata et al., 2014）。以上を総合すると、KOG および labdadiene は PAK1 を阻害する事によって毛細胞の増殖効果を示したと考えられる。

2-8. 本章のまとめ

本研究では、沖縄産のゲットウ Leaf 抽出物が、線虫の寿命を延長させる効果を有している事を発見し、それらの主要成分が QOG および KOG であることを明らかにした。KOG がゲットウに含まれていることは初の知見であった。

また、ゲットウに含まれる成分である labdadiene、DK、DDK、KOG が PAK1 を阻害し、また、抗ガン作用を有することが明らかとなった。更に labdadiene と KOG が毛細胞増殖効果を有することを明らかにした。これらの発見により、ゲットウは健康長寿に役立てられる、有望な素材であることが期待される。

2-9. 統計分析

本研究でのデータの計算にはMicrosoft Excel 2003を使用した。データの有意差はStatistical Analysis System (SAS) ソフトウェア (version 9.1.3) (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いてone-way ANOVA分析によって評価した。 $p < 0.05$ であるとき有意差があるとした。

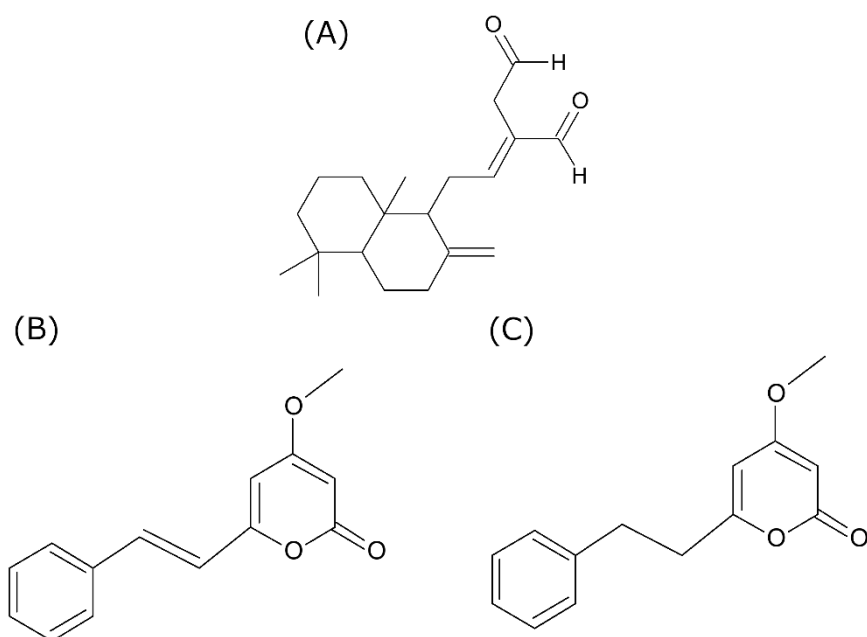


図2-1. ゲットウに含まれる様々な成分の構造

(A) : 8(17),12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene)

(B) : 5,6-Dehydrokawain (DK)

(C) : Dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK)

labdadieneはAGEs生成経路の様々な部位に対する阻害活性を、DKおよびDDKはノイラミニダーゼの阻害活性を有する。

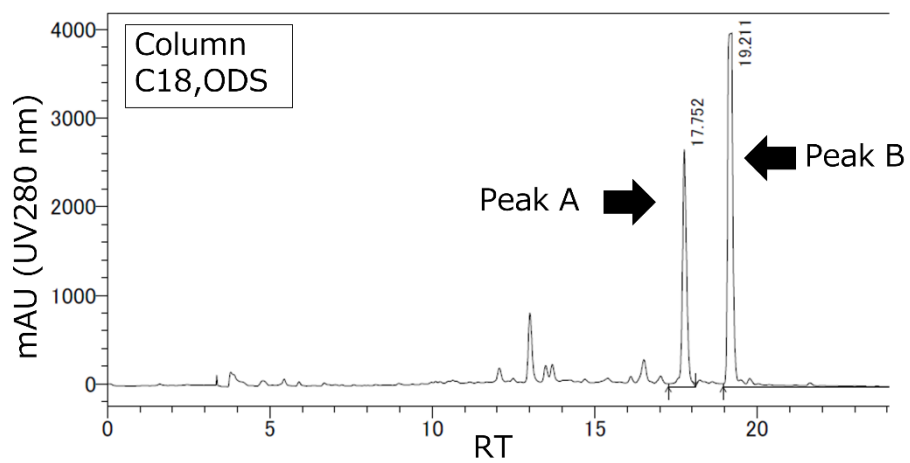


図2-2. ゲットウLeaf抽出物 (ALP) のHPLCクロマトグラム

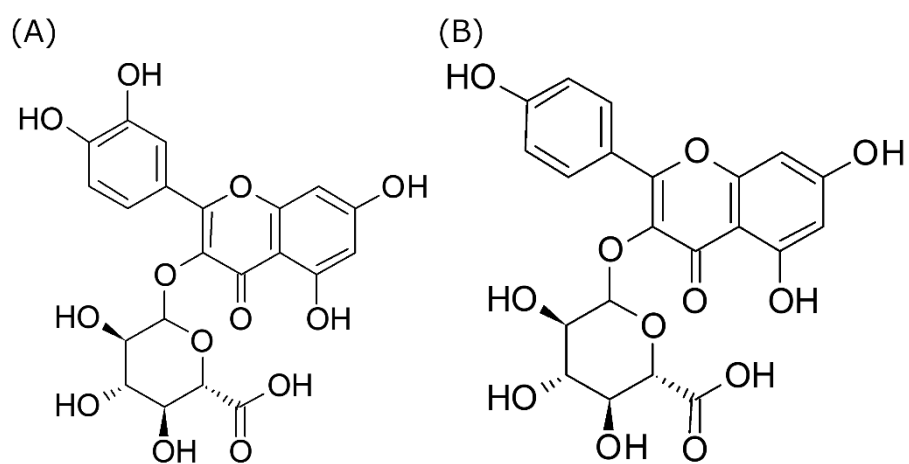


図2-3. ゲットウLeafから単離した化合物の構造

(A) : quercetin 3-*O*- β -D-glucuronide (QOG)

(B) : kaempferol 3-*O*- β -D-glucuronide (KOG)

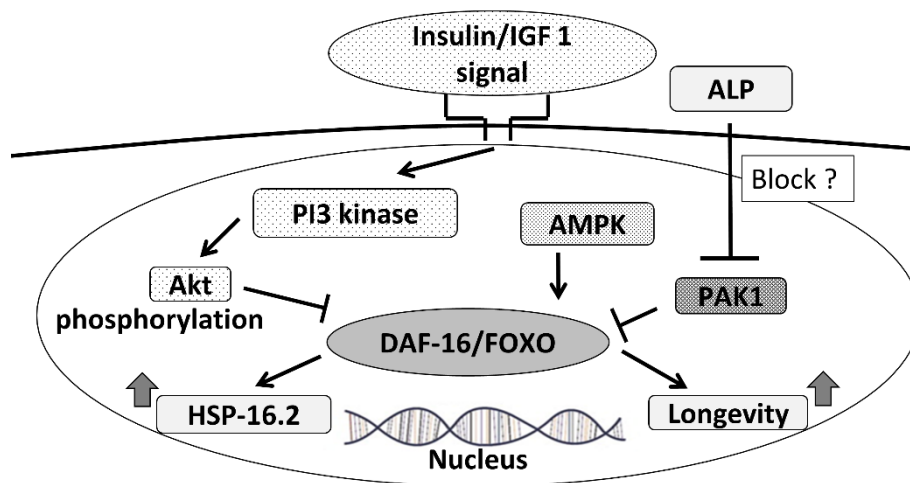


図2-4. 線虫の寿命メカニズム

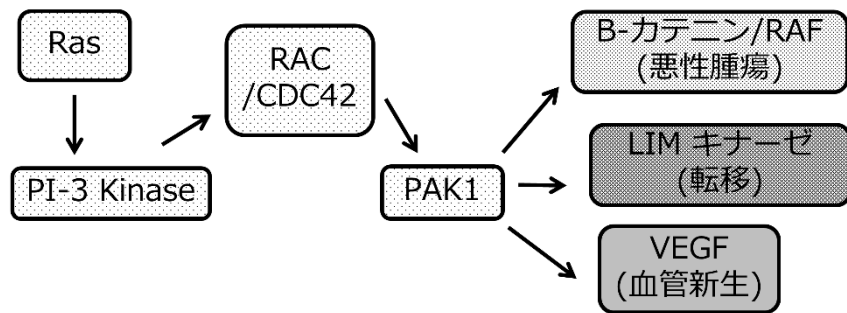


図2-5. 発ガン性RAS-PAK1経路（一部抜粋）

出典：Maruta, H., 2014. *Phytother. Res.* 28, 656–72. doi:10.1002/ptr.5054

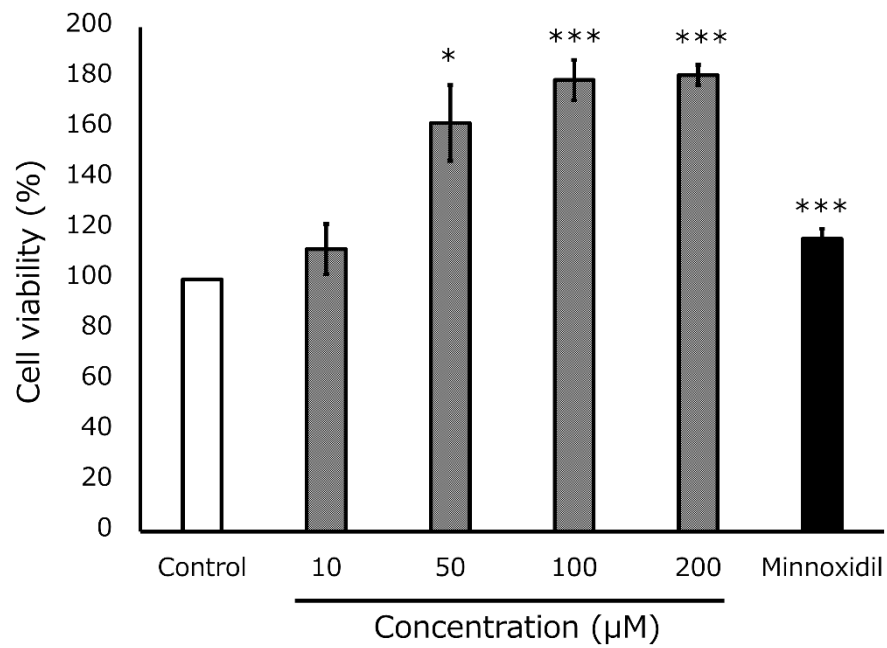


図2-6. ゲットウLeaf抽出物のヒト毛乳頭細胞の増殖に対する影響

毛乳頭細胞の細胞生存率。minoxidil (10 μM) はポジティブコントロール。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

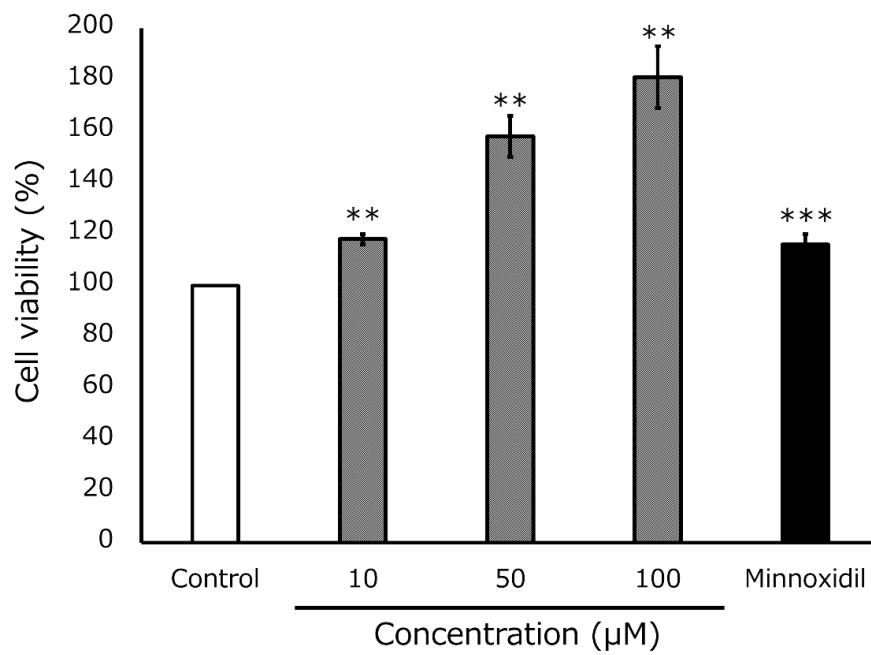


図2-7. KOGのヒト毛乳頭細胞の増殖に対する影響

毛乳頭細胞の細胞生存率。minoxidil (10 μM) はポジティブコントロール。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

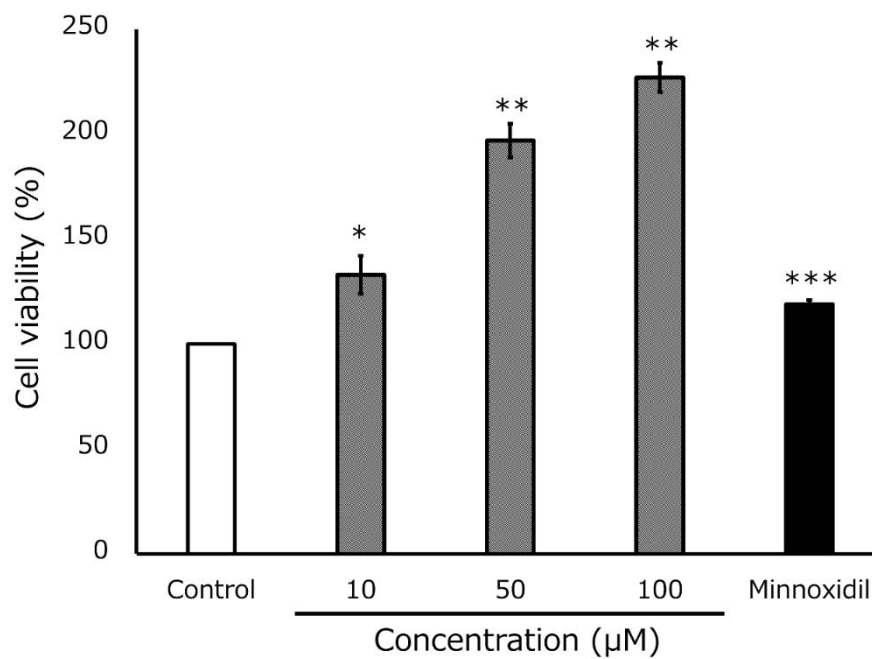


図2-8. labdadieneのヒト毛乳頭細胞の増殖に対する影響

毛乳頭細胞の細胞生存率。minoxidil (10 μM) はポジティブコントロール。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

表 2-1. ゲットウから単離した化合物の *in vitro* PAK1 阻害活性

由来	Compound	IC ₅₀ (μM)
ゲットウ (根茎)	labdadiene	52.1
ゲットウ (根茎)	DK	17.1
ゲットウ (根茎)	DDK	10.3
ゲットウ (葉)	KOG	39.3
ゲットウ (葉)	QOG	-
ウコン	curcumin	12.9
ゴーヤー	cucurbitacin I	19.0
ブルーベリー	resveratrol	15.0

これらデータの有意差は $p < 0.05$

表 2-2. ゲットウから単離した化合物の A549 細胞に対する抗ガン活性

由来	Compound	IC ₅₀ (μM)
ゲットウ (根茎)	labdadiene	67.1
ゲットウ (根茎)	DK	125
ゲットウ (根茎)	DDK	139
ゲットウ (葉)	KOG	81.4
ゲットウ (葉)	QOG	-
ウコン	curcumin	30.3
ゴーヤー	cucurbitacin I	0.14
ブルーベリー	resveratrol	22.6

これらデータの有意差は $p < 0.05$

第3章 沖縄産プロポリス (OP) の PAK1 阻害による寿命延長効果

3-1. 様々なプロポリスに含まれる生理活性物質

ミツバチによって植物の様々な部位から採集されたプロポリスは、エジプト時代から伝統的な薬としていくつかの病態に使用されてきたことより天然の抗生物質とも呼ばれ、過去の研究により抗ガン、抗炎症、抗酸化活性を有することが報告されている (Borges et al., 2011; Chen et al., 2004; Huang et al., 2007; Kumazawa et al., 2004; Machado et al., 2012)。また、ブラジル産、ニュージーランド産、およびヨーロッパ産のプロポリスは、マウスに対して毒性が認められなかったと報告されている (Burdock, 1998)。これらのプロポリスの有効成分の一部は既に決定されており、例えばポプラ (*Populus* 属) を採集源とするニュージーランド産プロポリス (Bio 30) は、カフェイン酸フェネチルエステル (Caffeic acid phenethyl ester : CAPE) を含み、これが Rac-PAK1 シグナリング経路を下方制御して主に抗ガン作用を現すと報告されている (Xu et al., 2005)。またアレクリン (*Baccharis dracunculifolia*) を採集源とするブラジル産グリーンプロポリス (GP) は artemillin C (ARC) を含み、その化合物は PAK1 阻害剤として肺ガン細胞 A549 の成長を阻害する (図 3-1) (Demestre et al., 2009)。

3-2. OP の特色

沖縄、台湾、およびハワイのプロポリスはこれらと異なって CAPE や ARC を含まず、オオバギ (*Macaranga tanarius*) を採集源とするプレニルフラボノイド類、すなわち nymphaeol とその誘導体を含んでいる。沖縄で採集されるプロポリス (OP) の場合、主な成分として nymphaeol A, B, C などを含み、それら

は強い抗酸化、抗真菌活性を有している (Kumazawa et al., 2014, 2007)。更に、nymphaeol A は HUVEC 細胞における血管新生を阻害すると報告されている (Tsuchiya et al., 2013)。その他のプレニルフラボノイドも OP から単離され、それらは強い抗酸化、抗真菌活性、抗血管新生を有している。しかし、PAK1 活性、寿命延長、メラニン産生、およびガン細胞増殖に対する OP の効果は明らかとなっていない。

本章では、将来有望な沖縄生物資源として沖縄産プロポリス (OP) を選定し、線虫の寿命延長効果試験、PAK1 阻害活性試験、抗ガン活性試験、メラニン産生阻害活性試験に供した。また、PAK1 阻害物質が線虫の産卵数を減少させる事に注目し、これを用いて OP の PAK1 阻害の *in vivo* 試験を行った。これらの結果から、OP が地域経済に寄与できる新たな資源であると示すことを目的とした。

3-3. OP の抽出

沖縄産プロポリス (OP) は (株) 沖縄養蜂より提供して頂いた (採集日: 2015 年 6 月 30 日)。乾燥したプロポリスは乳鉢ですりつぶして粉末状にした。プロポリス 1 g に 100 % ethanol 50 mL を加え、ソニケーター (AS ONE, Tokyo, Japan) で室温・3 h 超音波破碎を行い、その後スターラー (Bio-Shaker, BR-300LF, TAITEX CORPORATION, Tokyo, Japan) で 25 °C・21 h 攪拌した。攪拌で得られた溶液は、ろ紙を用いてろ過し、更に遠心分離機を用いて室温にて 14,000 *g*・5 min で上清を得た。得られた沖縄産プロポリス抽出物 (収量 320 mg) をエバポレーターで減圧濃縮し、100 % ethanol で 10 mg/mL の濃度に調整した抽出液 (OP) を得た。OP は -20 °C で保存し、実験に応じて希釈して使用した。

3-4. 実験に使用した線虫株

本研究では、野生株 N2 (*C. elegans* wild type) および GFP 導入変異体 CL2070 を CGC (Caenorhabditis Genetics Center) より購入し実験に使用した。また、PAK1 欠損株 RB689 株は築瀬研究室 (大東文化大学) より提供して頂いた。線虫は NGM プレートを用いて、20°C インキュベーターで培養した。線虫の同調培養には S-basal バッファーを、線虫の移植や洗浄には M9 バッファーを、線虫の餌には大腸菌株 OP50 を用いた。線虫の培養・評価実験に使用したプレートおよびバッファーの組成は以下の通り。

- NGM (nematode growth medium) プレート

NaCl 3 g/L、Agar 15 g/L、ポリペプトン 2.5 g/L、25 mM リン酸カリウムバッファー (pH6.0)、1 mM MgSO₄、1 mM CaCl₂、コレステロール 5 mg/L

- M9 バッファー

KH₂SO₄ 3 g/L、Na₂HPO₄ 6 g/L、NaCl 5 g/L、1mM MgSO₄

- S-basal バッファー

NaCl 5.85 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、KH₂PO₄ 6 g/L、コレステロール 5mg/L

3-5. OP の線虫に対する HSP-16.2 遺伝子発現量増加効果

ストレス感受性のヒートショックプロテイン (HSP) 16.2 遺伝子は、寿命を予測する指標として働くことから、寿命とストレス/熱ショック耐性においてキーとなる制御因子群の中心に位置すると考えられる (Rea et al., 2005)。そこで本研究では、まず HSP16.2::GFP の発現に対する OP の効果を調査した。

3-5-1. 試験方法

Yanase らの方法に基づいて、線虫 HSP-16.2-GFP 遺伝子導入変異体 (HSP-16.2::GFP) CL2070 を本実験に使用した (Yanase et al., 2013)。線虫は NGM プレートで培養し、大腸菌株 OP50 を餌として与えた。1 グループで約 30 匹の線虫を OP (0.5, 1, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が添加された新鮮な NGM プレートに移植し、48h・20 °C 培養した。その後線虫に 2h・35 °C のヒートショックを与え、更に 4h・20 °C で培養し線虫を回復させた。各個体は白金線を用いてスライドガラスに移植し、0.5 M sodium azide を 1 μL 滴下して麻痺させ、プレパラートに固定した。蛍光測定のため、蛍光顕微鏡 (KEYENCE BZ-X700) を用いて線虫の GFP 蛍光を観察した。

3-5-2. 試験結果

OP は HSP16.2::GFP 発現を有意に増加させ、その発現量はコントロールと比較して 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で $31 \pm 0.7\%$ も上昇し、ポジティブコントロールの resveratrol の場合よりも強い値であった (図 3-2)。OP が HSP16.2 遺伝子の発現を活性化させることから、OP は上流の FOXO や PAK1 阻害にも関与していると考えられる。

3-6. OP の線虫に対する寿命延長効果

前述のとおり、OP は HSP16.2 遺伝子の発現を活性化させる。また、ポジティブコントロールとして用いた resveratrol は線虫の寿命延長効果を有する物質であることが知られている。そこで OP の寿命延長効果に注目し、線虫の寿命測

定試験に供した。

3-6-1. 試験方法

同調培養した線虫の L1 幼虫 (60 – 100 worms) を NGM プレートに移植し、48 h 培養した。線虫が成虫に近づいた段階 (day 3) で、産卵を防ぐために FUdR (2'-Deoxy-5-fluorouridine, 0.5 mg/mL) 400 μ L を添加し、その後 OP (1 μ g/mL) または resveratrol (10 μ g/mL) を添加した。線虫は 2 日ごとに大腸菌 (OP50) を餌として適量与え、Upadhyay らの方法に基づいて生存数をカウントし、全ての線虫が死亡した後に生存期間中央値 (Median Survival Time, MST) を算出した (Upadhyay et al., 2013)。

3-4-2. 試験結果

PAK1 ブロッカーである CAPE および Bio 30 由来の apigenin の他、沖縄由来の植物であるゲットウの PAK1 阻害性の葉抽出物は線虫の寿命を延長させる影響を示すと報告されている (Yanase, 2013)。そこで OP の線虫に対する寿命延長効果能力を決定するため、OP (1 μ g/mL) と resveratrol (10 μ g/mL) で線虫を処理し MST で評価したところ、OP 摂食群の MST (24 ± 0.2 days) はコントロール群の MST (18 ± 1.1 days) と比較して 33 % も有意に増加した。これは resveratrol 群 (22 ± 1 days) よりも高い結果であった (図 3-4)。これら知見は本研究が初の報告となる。

本実験の結果は、OP が低濃度においても線虫の寿命延長に対して有意な効果を持ち、更にそれが PAK1 阻害により引き起こされる事を示唆するものである。線虫の HSP-16.2 遺伝子が PAK1 によって不活性化されることから、OP が PAK1 阻害活性を有している可能性が高い (Yanase, 2013)。

3-5. OP の PAK1 阻害活性および抗ガン活性

OP が PAK1 阻害を有することを明らかにするため、PAK1 阻害活性試験に供した。第 2 章で示した通り、PAK1 阻害は抗ガン活性にも関与しているため、同時に抗ガン活性試験にも供した。

3-5-1. 試験方法

OP の PAK1 阻害活性は、“Macaroni-Western” キナーゼ試験で評価した (Nguyen et al., 2015) 。A549 細胞 (2×10^5 cells/well) を D-MEM 液体培地で 24 h 前培養した後、様々な濃度の OP (1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$) を加え、24 h 培養した。細胞に溶解バッファー (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100) を加え氷上で 30 min 静置した。細胞溶解物を遠心分離し (100 g , 5 min, 4°C)、免疫沈降法のために上清の一方に希釈バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 100 $\mu\text{g/mL}$ BSA) 50 μL を加え、もう一方は更に anti-PAK1 IgG (1 : 50 dilution) を加えた後 1 h $\cdot$ 4°C インキュベートした。サンプルにプロテイン A-アガロース 10 μL を加え、ロータリーミキサー (Nissin, Tokyo, Japan) で適度に攪拌しながら更に 1 h $\cdot$ 4°C インキュベートした。その後遠心分離を行い、PAK1 を含んだ沈殿物を洗浄バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) 500 μL で 2 回洗浄した。免疫沈降した (IP)-PAK1 沈殿物をキナーゼバッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl_2 , 0.1 mg/mL BSA) 35 μL で懸濁した。キナーゼ反応は 2 μM ATP 10 μL (in distilled water) および MBP 基質 (bovine myelin basic protein, 1 mg/mL in distilled water) を加えて実行した。インキュベートは 1 h $\cdot$ 37°C、適度に攪拌して行っ

た。その後、等量のキナーゼ Glo reagent (50 μ L) を各ウェルに加え、更に 30 min インキュベートした。上清を 96 ウェルプレートに移し、分析を行った。蛍光は integration time : 0.5 s/well で MTP-880 マイクロプレートリーダー (Corona, Ibaraki, Japan) で測定した。OP の PAK1 活性はコントロールと比較し、パーセンテージで評価した。

抗ガン活性試験に用いたヒト肺ガン細胞 (A549) の培養条件を以下に示す。

- ・ 6 ウェルプレート (Iwaki, Tokyo, Japan)
- ・ 密度 2×10^5 cells/well in D-MEM (10% FBS)

前培養を 24 h 行った後、様々な濃度の OP (10, 20, 40 μ g/mL) を加え 72 h 培養した。その後、Wu らの方法に基づいてトリパンブルー染色を行った (Wu et al., 2002)。細胞の生死のカウントは血球計算版 (OneCell, Hiroshima, Japan) を用いた。OP の抗ガン活性はコントロールの細胞数と比較して、パーセンテージで評価した。

3-5-2. 試験結果

ARC 含有ブラジル産グリーンプロポリス (GP) と CAPE 含有ニュージーランド産プロポリス (Bio 30) は PAK1 を阻害し、PAK1 に関連するガンやその他の病気の治療を目的として利用されているが、OP の抗ガン性や PAK1 阻害活性は未だ明らかとなっていなかった。そこで OP の抗ガン性および PAK1 阻害活性を検証するために A549 細胞 (ヒト肺ガン細胞) を用いたところ、OP が細胞の増殖を濃度依存的に阻害する事を発見した ($IC_{50} = 12 \mu$ g/mL) (表 3-1)。また、OP は PAK1 を強く阻害した ($IC_{50} = 6 \mu$ g/mL)。OP の PAK1 阻害活性が同じ細胞系の抗ガン活性より強いため、ニュージーランド産プロポリスと GP と同

様、OP が直接 PAK1 を妨げられると思われる。OP はその他の 2 つのプロポリスと比較して最も強い PAK1 阻害活性を有しているように見える (Bio 30 の $IC_{50} = 60 \mu\text{g/mL}$ 、GP の $IC_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$)。その上、OP の抗ガン活性は ARC を主剤とする GP より強力であり (GP の $IC_{50} = 100 \mu\text{g/mL}$)、CAPE を主剤とする Bio 30 に匹敵する値であった (Bio 30 の $IC_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$)。

3-5-3. 考察

PAK1 は人体内の 70%ものガンの悪性化に関与しており、扁平上皮の非小細胞肺癌 (NSCLC) の約 64%の「アキレス腱」として示された (Ong et al., 2011; Rettig et al., 2012)。KRAS 遺伝子変異型である A549 細胞の増殖は、PAK1 に強く依存している。そこで有力で安全な PAK1 阻害剤をスクリーニングするための効果的なシステムである Macaroni-Western キナーゼ分析法 (Nguyen et al., 2015) を用いて、この NSCLC 細胞株で PAK1 に対する OP の効果を明らかにした。この OP による PAK1 直接阻害仮説を証明するためには更なる研究が必要であるが、Bio 30 と GP が PAK1 の自己リン酸化を阻害することにより、PAK1 のシグナリングを阻害するという報告と同様、前記の Macaroni-Western キナーゼ分析法による結果は、OP が PAK1 シグナリングに影響を及ぼすことを示唆する。これらは標準的なガン細胞 (A549) に基づく定量的なデータであり、市場で販売されている様々なプロポリスやその他の PAK1 阻害剤 (ハーブなど) の製品の品質管理に役立てられると考えられる。

3-6. OP の B16F10 細胞に対する抗メラニン産生効果

メラノサイトがガン化するとメラノーマ細胞となり、メラニン産生が止まら

ず黒色腫瘍を生み出す。メラニン産生の阻害は美白・スキンケアだけでなく、色素沈着症の治療にも貢献する。これに関し、プロポリス Bio 30 が PAK1 依存性のメラニン産生を阻害する事が報告されている (Nguyen et al., 2015)。メラニン生産のための重要な酵素はチロシナーゼだけでなく、近年メラニン細胞内のメラニン産生が 50 %以上も PAK1 に依存することが明らかになった (図 3-4) (Be Tu et al., 2016)。皮細胞や内皮細胞など様々な細胞によって産生される血小板由来成長因子 (Platelet-Derived Growth Factor、PDGF) は、PDGF 受容体を介してその生理作用を発現し、表皮増殖因子 (EGF) を活性化させる。この EGF の受容体 (EGFR) の遺伝子の変異は細胞の異常増殖を引き起こす。また EGF は RAS-AC/CDC42-PAK1 経路を介してメラニンを産生するとともに、ホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX やメラニン細胞刺激ホルモン (MSH) の刺激を出発点とする JAX2-PAK1 経路を介してメラニン産生を促進させる。更にメラニン産生は PIX (PAK-interacting exchange factor)-PAK 複合体によっても直接促進される。これらより、PAK1 阻害剤がメラニン産生を阻害すると想定されたので、OP を B16F10 メラノーマ細胞に添加し、細胞生存率、メラニン含有量、細胞内チロシナーゼ活性を測定することで、OP のメラニン生産阻害活性を検証した。

3-6-1. 試験方法

B16F10 メラノーマ細胞は D-MEM (supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 1% penicillin / streptomycin) を培養液とし (10,000 U/mL and 100 µg/mL)、5% CO₂ インキュベーターで 37 °C で培養した。細胞生存率 (または増殖率) はトリパンブルー染色によって、Nguyen らの方法に基づいて行った (Nguyen et al., 2015)。B16F10 細胞 (2 x 10⁴ cells/well) は 24 ウェル

プレートで 24 h 前培養した。その後様々な濃度の OP (10, 20 40 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、72 h $\cdot$ 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。リン酸バッファーで 2 回洗浄した後、Accutase で細胞を剥がしトリパンブルー染色を行った。細胞の生死のカウントは血球計算版 (OneCell, Hiroshima, Japan) を用いた。OP はコントロールの細胞数と比較して、パーセンテージで評価した。

メラニン含量の測定は Yoon らの方法に基づいて行われた (Yoon et al., 2009) 。B16F10 細胞 (2×10^4 cells/well) は 24 ウェルプレートで 24h 前培養した後培地を通常培地 (supplemented with 10% FBS, serum-free) と交換し、様々な OP (5 -40 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。1h 後、IBMX (melanogenic hormone; 100 μM) を培地に添加し、72h $\cdot$ 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。細胞をリン酸バッファーで洗浄した後に NaOH (1N) containing 10% DMSO 500 μL で溶かした。メラニンの溶解を促進させるため、サンプルを 1h $\cdot$ 80 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 490 nm を測定した。

細胞内チロシナーゼ活性の測定は Be Tu らの方法をいくつか修正して行った (Be Tu et al., 2016) 。B16F10 細胞 (2×10^4 cells/well) を 24 ウェルプレートで 24 h 前培養した後、培地を通常培地 (supplemented with 10% FBS , serum-free) に交換し、様々な濃度の OP (10 -40 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。1 h 後、IBMX (3-Isobutyl 1-methylxanthine, a melanogenic hormone; 100 μM) を培地に添加し、72 h $\cdot$ 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。細胞は氷冷したリン酸バッファーで洗浄し、リン酸バッファー (pH 6.8) containing 1 % Triton X-100 を各ウェルに 500 μL 添加した。プレートを 30 min $\cdot$ 80 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし氷結させた。これを解凍し混合した後、1% L-DOPA 100 μL を各ウェルに添加し 2 h $\cdot$ 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキ

ュベートした後、吸光度 490 nm で測定した。

3-6-2. 試験結果

OP が PAK1 を阻害することから（表 3-1）、OP は細胞内チロシナーゼ活性も阻害し、細胞のメラニン含量も減少させると想定された。そこで B16F10 細胞を用いた系で OP の活性を評価したところ、図 3-5 および図 3-6 のように、OP は B16F10 細胞内で強いメラニン産生阻害活性 ($IC_{50} = 37 \mu\text{g/mL}$) を示した。更に図 3-7 に示すように、OP は細胞内チロシナーゼを下方制御した ($IC_{50} = 30 \mu\text{g/mL}$)。これらの結果は、OP は B16F10 メラノーマ細胞内のメラニン産生を効果的に阻害している事を示すものである。

3-7. PAK1 阻害の *in vivo* 試験の検討

ニュージーランド産プロポリス (Bio 30) 由来 CPAE とブラジル産グリーンプロポリス (GP) 由来 ARC が、トランスジェニック線虫 CL2070 のヒートショックプロテイン (HSP-16.2) の発現を上方制御し、線虫野生株 (N2) の PAK1 に依存した卵再生産を阻害したと報告されている (Yanase, 2013)。この報告より、PAK1 阻害活性試験は、従来もっぱら“Macaroni-Western” キナーゼ試験などの *in vitro* 試験で行われているが、線虫の産卵数がこれに代わる PAK1 阻害の指標として、その *in vivo* 表現型試験に成り得ると考え、OP 摂食による線虫の産卵数を測定した。

3-7-1. 試験方法

約 20 匹の野生株 (N2) および RB6789 株から卵を取り出し、ふ化させた後、

L1 幼虫を大腸菌株 OP50 および OP (0.5-1 $\mu\text{g/mL}$) を添加した NGM プレートに移植した。約 64 h 後、線虫が卵を産み始めたのを確認して更に 8 h 後に産卵数をカウントした。母体毎の卵数は Yanase らの方法に基づいて算出した (Yanase et al., 2013)。

3-7-2. 試験結果

本研究では線虫の産卵数に対する OP の効果を調査した。産卵数はコントロールと比較して 0.5 および 1.0 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において 19 % および 52 % 低下し、resveratrol の場合よりも高い低下率であった (図 3-8)。また PAK1 欠損株 (RB689) の産卵数は野生株よりも少ないため、前述の通り、PAK1 が線虫野生株 (N2) の卵再生産を促進していること (Yanase, 2013) が確認された。この試験は試験期間が 4 日を要するなどの課題があるが、ADP-Glo™ キナーゼアッセイキットや“Macaroni-Western” キナーゼ試験よりも安価で行えるため、線虫に対する毒性試験と併せて行うなどの工夫により、PAK1 阻害物質を探索するためのスクリーニングや、PAK1 阻害の *in vivo* 表現型試験として応用できると期待される。

3-8. OP に含まれる成分の構造解析

OP の主要成分の調査は Kumazawa らの方法に基づいて行った (Kumazawa et al., 2014)。沖縄産プロポリスを 5 $\mu\text{g/mL}$ に希釈し、フィルターに通した後、島津 LC-MS を用いて測定した (LC-20AD XR, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)。分離カラムには COSMOSIL 5C18-AR-II (150 mm x 2 mm I.D.; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用した。移動相は 0.5 % acetic acid (in water, v/v) を溶媒

A、acetonitrile を溶媒 B とした。流速は 0.2 mL/min、波長 280 nm で検出した。グラジエントは以下の通り (0 - 30 min / 0 - 80% solvent B、30 - 35 min / 80 - 100% solvent B、35 - 40 min / 100% solvent B) (図 3-9) 。全ての MS データはネガティブモードで行った。検出したピーク、MS による分子量、¹H-NMR および ¹³C-NMR スペクトルと Tsuchiya らの報告に基づいて、主要成分を決定した (Tsuchiya et al., 2013) (図 3-10) 。

3-9. プレニルフラボノイドの機能性

プレニルフラボノイドはフラボノイドの基本骨格である **diphenylpropane** に一つ以上の **C5 isoprene group** (プレニル基) が結合した構造を有する化合物群である。quercetin や kaempferol などのフラボノイドは糖が結合した配糖体として存在するが、プレニルフラボノイドは糖の結合は見られずアグリコンとして存在する場合がほとんどである。これは、植物内の代謝経路がプレニル化あるいは糖鎖付加の、どちらか一方に制限されることに由来するためだと考えられている。ある種のフラボノイドについては、プレニル基を有することで抗酸化作用やエストロゲン様作用が高まることが明らかにされており、それはプレニル基がフラボノイドの疎水性を上昇させ、生体膜脂質との親和性を高めることから細胞への取り込みに有利に働くためと考えられている (Kretzschmar et al., 2010; Rodriguez et al., 2001) 。OP のプレニルフラボノイド類による寿命延長メカニズムを証明するためには更なる研究が必要であるが、それらが効率的に細胞に取り込まれて PAK1 を阻害した結果、OP が resveratrol よりも強い寿命延長効果を示した可能性が高い。

活性本体の含有量を比較した場合、CAPE はニュージーランド産プロポリス

(Bio 30) に 1.2%、ARC はブラジル産プロポリス (GP) に 8%しか含まれていない (Demestre et al., 2009; Messerli et al., 2009) 。それらと比較すると、本章で OP から単離したプレニルフラボノイド類の収量は nymphaeol-B が 19%、isonymphaeol-B が 9%、nymphaeol-A が 22%、3'-geranyl-naringenin が 9%、nymphaeol-C が 12%と、合計すると 71%もの割合でプレニルフラボノイドが含まれていた。また、含有量の多い nymphaeol-A や nymphaeol-C が PAK1 阻害活性を有することも明らかになった (Nguyen et al., 2017) 。

以上の結果から、OP の主要成分は上記の 5 つのプレニルフラボノイド類であり、それらが線虫の寿命延長効果、メラニン産生阻害効果、抗ガン活性および PAK1 阻害活性の活性本体である可能性が非常に高い。

3-10. 本章のまとめ

本研究では、沖縄産プロポリス (OP) が線虫の寿命を延長させる効果を有していることを発見した。沖縄産プロポリスが高い PAK1 阻害活性を示したため、PAK1 阻害が寿命延長に大きく関与していると考えられる。また OP は、PAK1 阻害によると思われる、抗ガン活性や抗メラニン産生効果を有していた。さらに OP や resveratrol は線虫の寿命延長効果を有し、同時に線虫の産卵数を減少させることが見いだされた。その因果関係については更なる検証が必要であるが、この産卵数減少も PAK1 の阻害に関連すると考えられた。これらの新たな知見により、OP は将来有望な亜熱帯天然資源であることが示唆される。

3-11. 統計分析

各データは標準誤差 (SE) で表した。統計比較は one-way ANOVA および Duncan's multiple-range test によって行われた。線虫の寿命測定のため、MST を Kaplan-Meier survival curves および log-rank test を用いて算出した。統計分析は SPSS (version 16.0, Chicago, Illinois) を使用した。 $p < 0.05$ は有意差があると認められる。

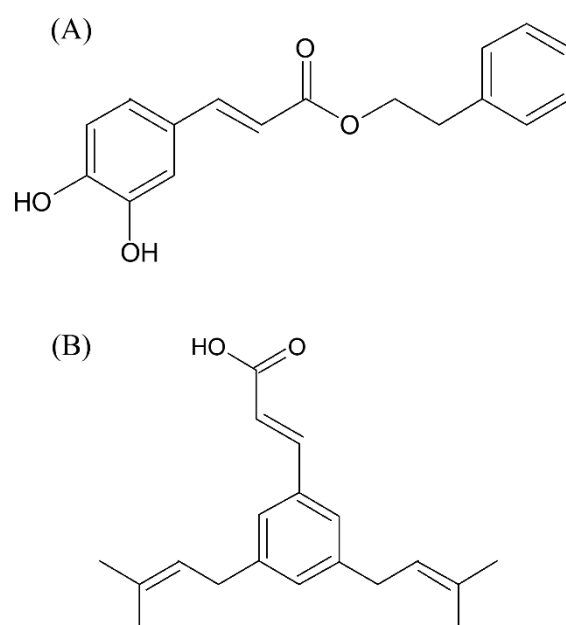


図 3-1. 様々なプロポリスに含まれる生理活性物質

A : Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)

B : artemipillin C (ARC)

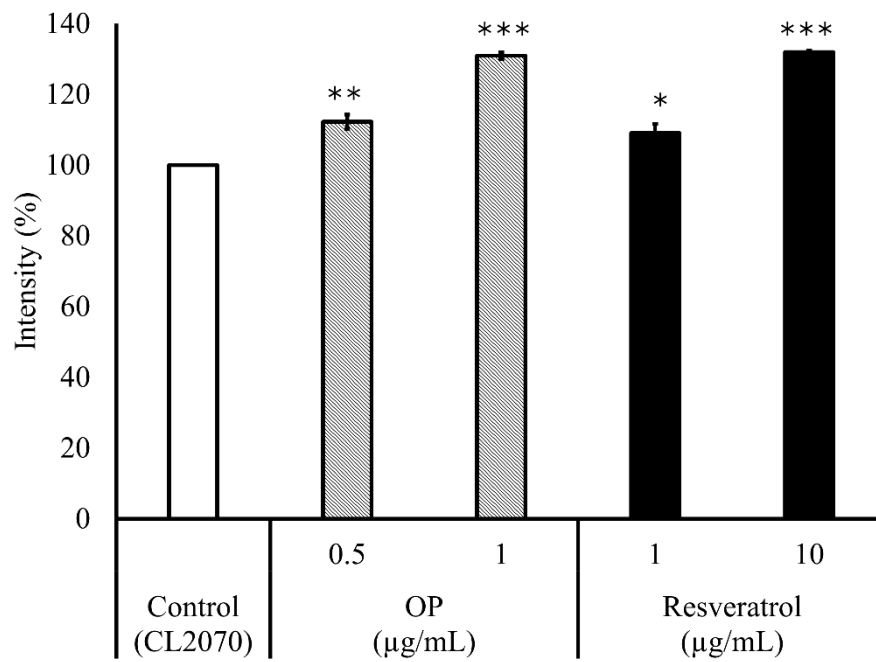


図 3-2. OP による線虫 (CL2070) の HSP-16.2 遺伝子の活性化

線虫 CL2070 の各群の GFP 強度。コントロール群とサンプル摂食群の有意差は *で示している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

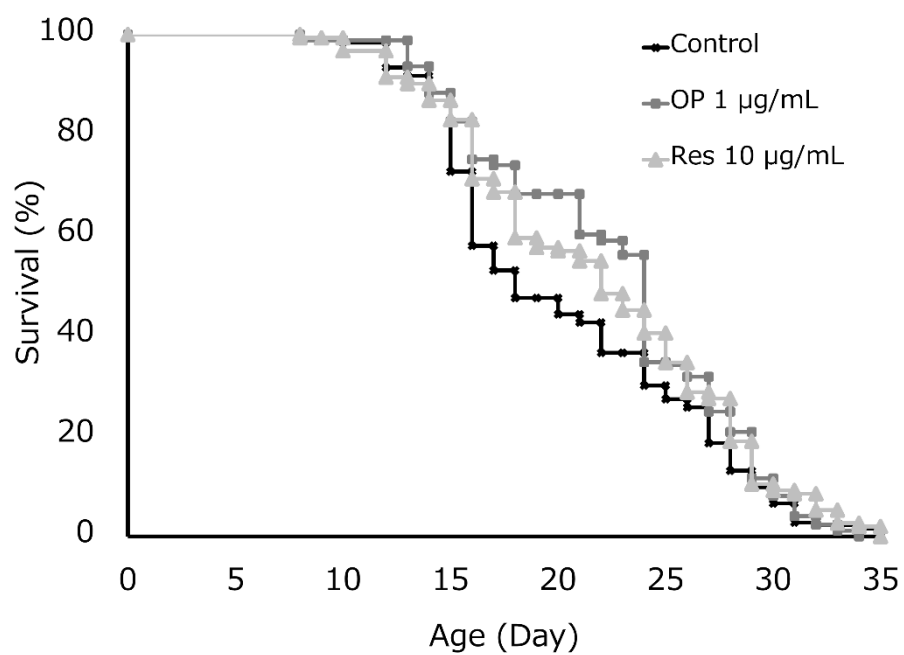


図 3-3. OP の線虫に対する寿命延長効果

MST (day) : control = 18 ± 1.1 , OP = 24 ± 0.2 , resveratrol = 22 ± 1

これらデータの有意差は $p < 0.05$

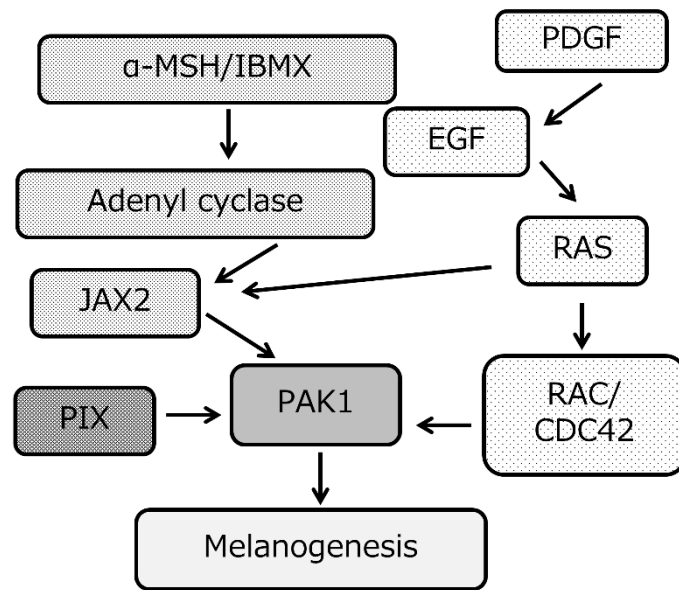


図 3-4. メラニン産生の基礎をなす PAK1 のメカニズム (一部抜粋)

出典 : Be Tu, P.T., Nguyen, B.C.Q., Tawata, S., Yun, C.-Y., Kim, E.G., Maruta, H., 2016. Drug Discov. Ther. 10, 314–322. doi:10.5582/ddt.2016.01062

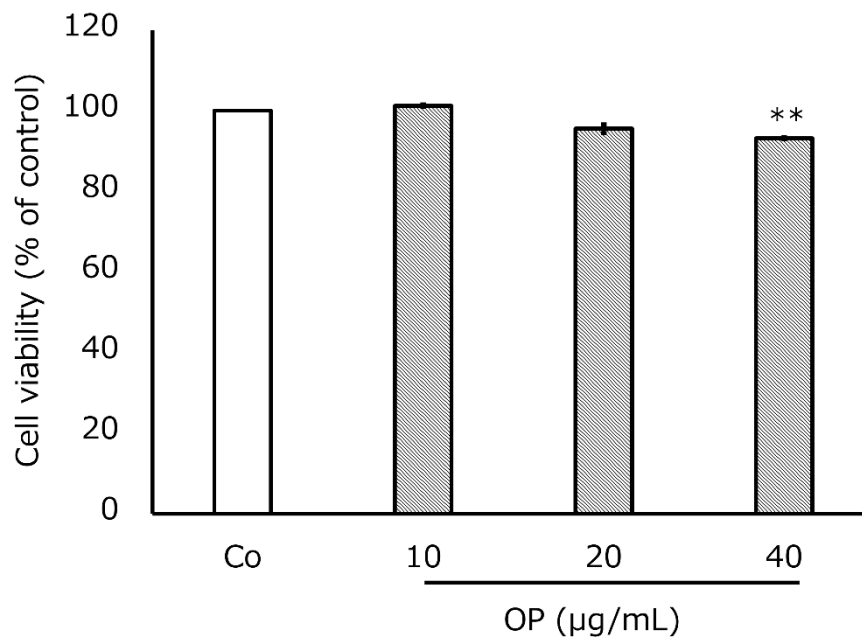


図 3-5. OP のメラノーマ細胞に対する影響

OP はメラノーマ細胞に対して、毒性を示さなかった。コントロールとサンプル添加の有意差は*で示している(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

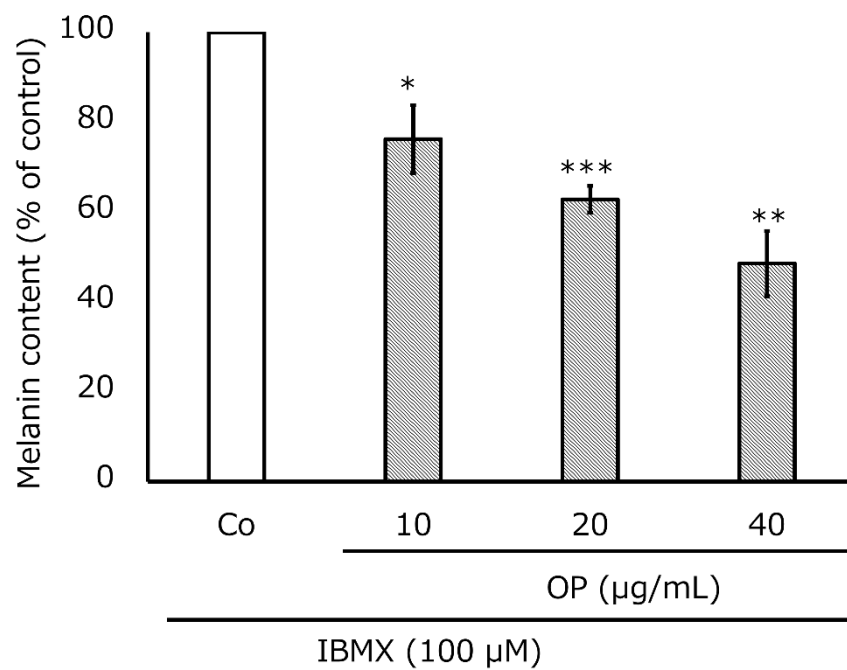


図 3-6. OP のメラノーマ細胞に対する抗メラニン産生効果

コントロールとサンプル添加の有意差は*で示している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

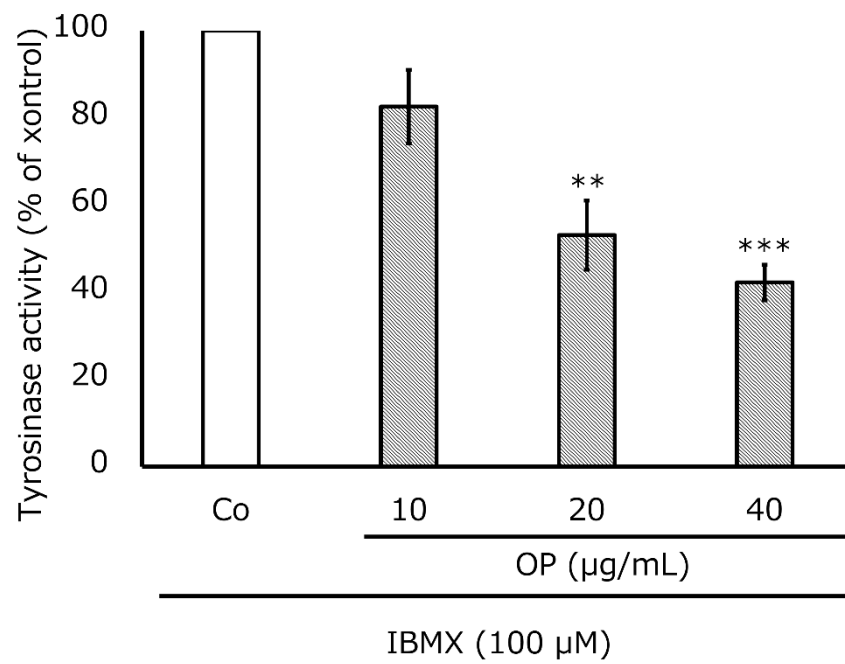


図 3-7. OP によるメラノーマ細胞内チロシナーゼ活性阻害

コントロールとサンプル添加の有意差は*で示している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

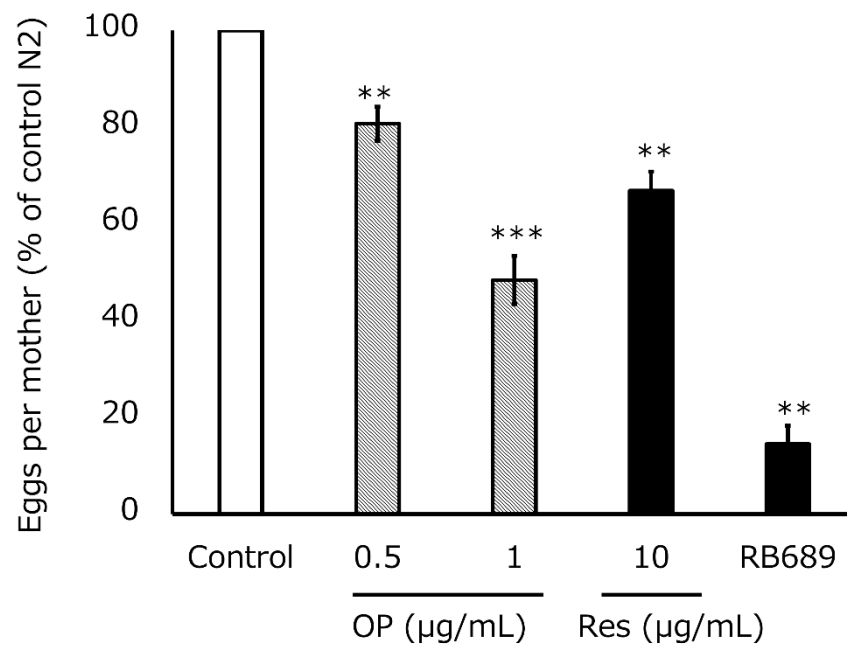


図 3-8. 線虫の産卵数測定

OP は線虫の野生株の産卵数を有意に減少させた。resveratrol はポジティブコントロールとして使用した。RB689 は PAK1 欠損株である。コントロール群とサンプル摂食群の有意差は*で示している (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$)

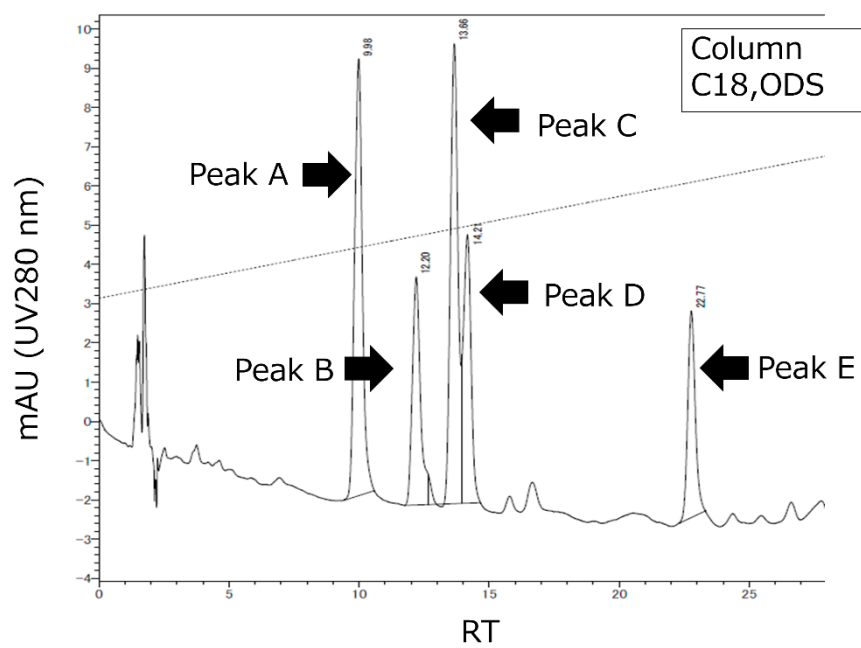


図 3-9. OP の HPLC クロマトグラム

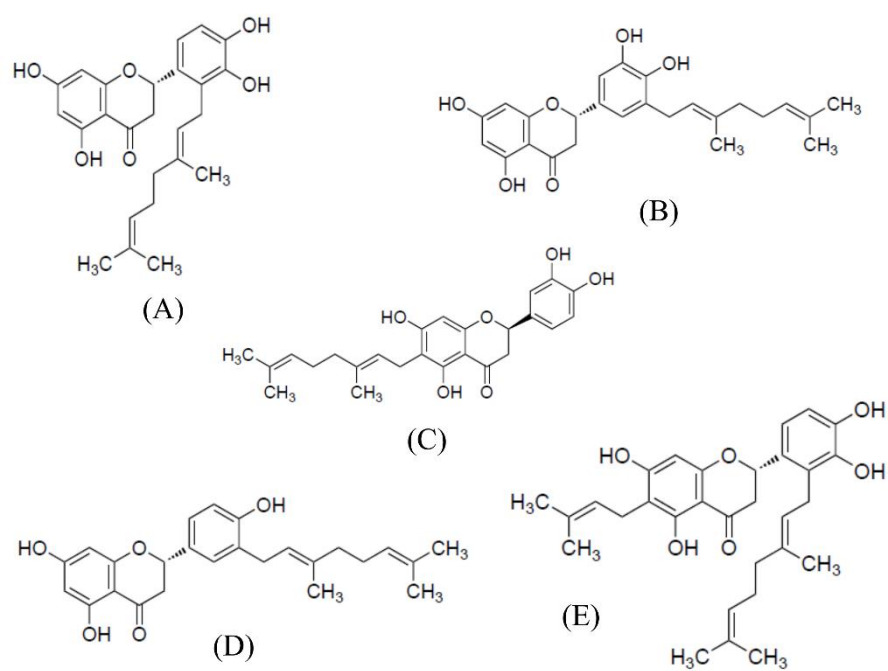


図 3-10. OP の主要成分の化学構造

(A) nymphaeol-B; (B) isonymphaeol-B; (C) nymphaeol-A; (D) 3'-geranyl-naringenin; and (E) nymphaeol-C.

表 3-1. 様々なプロポリスの抗ガン活性および抗 PAK1 活性

Propolis type	IC ₅₀ value (μg/mL)	
	Anti-cancer activity	Anti-PAK1 activity
OP	12	5.23
Green propolis ^a	100	>150
Bio 30 ^b	8	60

^{a, b} (出典 : Messerli et al., 2009 and Demestre et al., 2009)

総論

本研究では、健康寿命に関わる様々な病態を PAK1 阻害活性と関連付け、沖縄由来の亜熱帯天然資源であるゲットウ (*Alpinia zerumbet*) と沖縄産プロポリス (OP) に含まれる生理活性物質の様々な効果を考察し、その応用可能性を議論した。

まず、第2章で沖縄県の亜熱帯生物資源とその生理活性、およびこれらとPAK1の阻害の関連を議論した後、細胞培養においてゲットウ抽出物とゲットウに由来する化合物であるKOGおよびlabdadieneが、顕著な発毛・育毛効果と抗ガン作用を示すことを明らかにした。詳細な分子メカニズムと構造活性の関係はいまだ明らかではないが、これらの特性は、単離した化合物による発ガン性/老化キナーゼPAK1の抑制によるものと考えられ、これらのゲットウから単離した化合物は、脱毛症やガンを治療するための新薬の候補として期待される。ゲットウは沖縄県で古くから利用され、商品化やサプリメントの開発も行われている伝統的な素材である。本研究の成果から、ゲットウは今後も健康食品・機能性食品の素材として更に期待される。

第3章では、OPのPAK1阻害活性に起因する線虫の寿命延長効果と産卵数減少、メラニン産生阻害および抗ガン作用を見出した。過去に類似の成果が報告されたプロポリスであるCAPEとARCは、“抗ガンプロポリス”として既に市場に進出している。OPは、これまで機能性に関する報告がわずかしかなく、有効利用の目が向けられていなかったが、本研究の成果は、沖縄由来の亜熱帯天然資源として、OPが地域経済に寄与できる新たな素材になりえることを示唆してい

る。加えて、OP はガンや色素沈着症などの PAK1 が関与する病態の治療や、健康長寿のための医薬品やサプリメントとして用いることが出来ると期待される。同時に、本研究の手法は PAK1 阻害活性を有する医薬品等の開発に応用が可能であると思われる。

謝辞

本稿を作成するにあたり、幅広く助言頂きました琉球大学の屋宏典教授、和田浩二教授、福田雅一准教授、鹿児島大学の玉置尚徳教授、侯徳興教授ならびに琉球大学の高野良名誉教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行中、学部四年次から研究の開始以来、現在に至るまで長きに渡り幅広くご指導頂きました **PAK1** リサーチセンター沖縄支部の多和田真吉先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究は、琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科多和田研究室ならびに石井研究室において行われました。現研究室主宰者の石井貴弘先生には幅広くご指導いただきました。また過去に在籍されていた **Binh Cao Quan Nguyen** 氏、**Pham Thi Be Tu** 氏、**Atul Upadhyay** 氏、**Jamnian Chompoo** 氏、岸本周氏、その他多くの方々に貴重な助言とご指導を頂きましたこと感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、**PAK1** に関連した技術的な実験をご指導頂きました丸田浩博士に心から感謝申し上げます。本研究で用いた線虫株の一部は、築瀬澄乃博士より頂きました。その他の株は **Caenorhabditis Genetics Center (CGC)** より頂きました。また、**LC/MS** および **NMR** に関するご指導を頂きました琉球大学機器分析支援センターの職員の方々、事務的な手続きを支援頂きました農学部事務の方々に大変お世話になりました。皆様のご協力に心より御礼申しあげます。

最後に、私を生活面・精神面から支えてくれた両親、応用生命科学専攻の友人らに感謝致します。

引用文献

厚生労働省, 平成 27 年簡易生命表の概況, 参考資料 2 主な年齢の平均余命の年次推移

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life15/dl/life15-09.pdf>

厚生労働省, 平成 27 年簡易生命表の概況, 参考資料 3-1 死因別死亡確率の推移

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life15/dl/life15-10.pdf>

厚生労働科学研究 健康寿命のページ, 健康寿命の指標化に関する研究 (健康日本 2 1 (第二次) 等の健康寿命の検討) (平成 27 年度分担研究報告書)

<http://toukei.umin.jp/kenkoujyummyou/houkoku/H27.pdf>

島袋敬一, 植物全国大会記念誌 沖縄の生物, 沖縄生物教育研究会, 1984, 23-32.

多和田真淳, 大田文子, 沖縄の薬草百科 : 誰にでもできる薬草の利用法 : やさしい煎じ方と飲み方, 那覇出版社, 1998

Be Tu, P.T., Nguyen, B.C.Q., Tawata, S., Yun, C.-Y., Kim, E.G., Maruta, H., 2016. The serum/PDGF-dependent “melanogenic” role of the minute level of the oncogenic kinase PAK1 in melanoma cells proven by the highly sensitive kinase assay. Drug Discov. Ther. 10, 314–322. doi:10.5582/ddt.2016.01062

- Borges, K.S., Brassesco, M.S., Scrideli, C.A., Soares, A.E.E., Tone, L.G., 2011. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genet. Mol. Biol.* 34, 310–314. doi:10.1590/S1415-47572011000200024
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363. doi:10.1016/S0278-6915(97)00145-2
- Chen, C.N., Weng, M.S., Wu, C.L., Lin, J.K., 2004. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. *eCAM* 1, 175–185. doi:10.1093/ecam/neh034
- Chompoo, J., Upadhyay, A., Fukuta, M., Tawata, S., 2012. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 106. doi:10.1186/1472-6882-12-106
- Chompoo, J., Upadhyay, A., Kishimoto, W., Makise, T., Tawata, S., 2011. Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. *Food Chem.* 129, 709–715. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.034
- Demestre, M., Messerli, S.M., Celli, N., Shahhossini, M., Kluwe, L., V. Mautner, Maruta, H., 2009. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based Propolis Extract (Bio 30) Suppresses the Growth of Human

Neurofibromatosis (NF) Tumor Xenografts in Mice. *Phyther. Res.* 23, 226–230. doi:10.1002/ptr

Dong, L., Hao, H., Xia, L., Liu, J., Ti, D., Tong, C., Hou, Q., Han, Q., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X., Han, W., 2014. Treatment of MSCs with Wnt1a-conditioned medium activates DP cells and promotes hair follicle regrowth. *Sci. Rep.* 4, 5432. doi:10.1038/srep05432

El-Ansary, S.L., Hussein, M.M., Abdel Rahman, D.E., Abdel Ghany, L.M.A., 2014. Synthesis, docking and in vitro anticancer evaluation of some new benzopyrone derivatives. *Bioorg. Chem.* 53, 50–66. doi:10.1016/j.bioorg.2014.02.003

Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Koyama, H., Tawata, S., 2007. Antioxidant activity and contents of essential oil and phenolic compounds in flowers and seeds of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burtt. & R.M. Sm. *Food Chem.* 104, 1648–1653. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.016

Feher, M., Schmidt, J.M., 2003. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 43, 218–227. doi:10.1021/ci0200467

Harvey, A.L., 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13, 894–901. doi:10.1016/j.drudis.2008.07.004

- He, H., Levitzki, A., Zhu, H.J., Walker, F., Burgess, A., Maruta, H., 2001. Platelet-derived growth factor requires epidermal growth factor receptor to activate p21-activated kinase family kinases. *J. Biol. Chem.* 276, 26741–4. doi:10.1074/jbc.C100229200
- Hong-Xi Xu, Hui Dong, Keng-Yeow Sim, 1996. Labdane diterpenes from *Alpinia zerumbet*. *Phytochemistry* 42, 149–151. doi:10.1016/0031-9422(96)00887-4
- Huang, W.J., Huang, C.H., Wu, C.L., Lin, J.K., Chen, Y.W., Lin, C.L., Chuang, S.E., Huang, C.Y., Chen, C.N., 2007. Propolin G, a Prenylflavanone, Isolated from Taiwanese Propolis, Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Brain Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7366–7376. doi:10.1021/jf0710579
- Huh, S., Lee, J., Jung, E., Kim, S.C., Kang, J. Il, Lee, J., Kim, Y.W., Sung, Y.K., Kang, H.K., Park, D., 2009. A cell-based system for screening hair growth-promoting agents. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 381–385. doi:10.1007/s00403-009-0931-0
- Huynh, N., Liu, K.H., Baldwin, G.S., He, H., 2010. P21-activated kinase 1 stimulates colon cancer cell growth and migration/invasion via ERK- and AKT-dependent pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803,

1106–1113. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.05.007

Ishizawa, K., Yoshizumi, M., Kawai, Y., Terao, J., Kihira, Y., Ikeda, Y., Tomita, S., Minakuchi, K., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2011. Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 466–470. doi:10.1254/jphs.10R38FM

Itokawa, H., Morita, M., Mihashi, S., 1981. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry* 20, 2503–2506. doi:10.1016/0031-9422(81)83082-8

Junlatat, J., Sripanidkulchai, B., 2014. Hair growth-promoting effect of *Carthamus tinctorius* floret extract. *Phyther. Res.* 28, 1030–1036. doi:10.1002/ptr.5100

Kang, J. Il, Kim, S.C., Kim, M.K., Boo, H.J., Jeon, Y.J., Koh, Y.S., Yoo, E.S., Kang, S.M., Kang, H.K., 2012. Effect of dieckol, a component of *Ecklonia cava*, on the promotion of hair growth. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6407–6423. doi:10.3390/ijms13056407

Kawano, M., Han, J., Kchouk, M.E., Isoda, H., 2009. Hair growth regulation by the extract of aromatic plant *Erica multiflora*. *J. Nat. Med.* 63, 335–339. doi:10.1007/s11418-009-0324-x

- Kim, S.J., Park, H.R., Park, E., Lee, S.C., 2007. Cytotoxic and antitumor activity of momilactone B from rice hulls. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1702–1706. doi:10.1021/jf062020b
- Kretzschmar, G., Zierau, O., Wober, J., Tischer, S., Metz, P., Vollmer, G., 2010. Prenylation has a compound specific effect on the estrogenicity of naringenin and genistein. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 118, 1–6. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.08.005
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84, 329–339. doi:10.1016/S0308-8146(03)00216-4
- Kumazawa, S., Murase, M., Momose, N., Fukumoto, S., 2014. Analysis of antioxidant prenylflavonoids in different parts of *Macaranga tanarius*, the plant origin of Okinawan propolis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, 16–20. doi:10.1016/S1995-7645(13)60184-4
- Kumazawa, S., Ueda, R., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., 2007. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7722–7725. doi:10.1021/jf071187h

- Kwack, M.H., Kang, B.M., Kim, M.K., Kim, J.C., Sung, Y.K., 2011. Minoxidil activates β -catenin pathway in human dermal papilla cells: A possible explanation for its anagen prolongation effect. *J. Dermatol. Sci.* 62, 154–159. doi:10.1016/j.jdermsci.2011.01.013
- Kwon, O.S., Han, J.H., Yoo, H.G., Chung, J.H., Cho, K.H., Eun, H.C., Kim, K.H., 2007. Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Phytomedicine* 14, 551–555. doi:10.1016/j.phymed.2006.09.009
- Lachgar, S., Moukadiri, H., Jonca, F., Charveron, M., Bouhaddioui, N., Gall, Y., Bonafe, J.L., Plouët, J., 1996. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal papilla cells. *J. Invest. Dermatol.* 106, 17–23. doi:10.1111/1523-1747.ep12326964
- Machado, J.L., Assunção, A.K.M., da Silva, M.C.P., Reis, A.S. dos, Costa, G.C., Arruda, D. de S., Rocha, B.A., Vaz, M.M. de O.L.L., Paes, A.M. de A., Guerra, R.N.M., Berretta, A.A., Nascimento, F.R.F. do, 2012. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *eCAM* 2012, Article ID 157652. doi:10.1155/2012/157652
- Maruta, H., 2014. Herbal therapeutics that block the oncogenic kinase PAK1: a practical approach towards PAK1-dependent diseases and longevity. *Phytother. Res.* 28, 656–72. doi:10.1002/ptr.5054

- McElwee, K.J., Sinclair, R., 2008. Hair physiology and its disorders. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 5, 163–171. doi:10.1016/j.ddmec.2008.04.001
- Messerli, S.M., Ahn, M.R., Kunimasa, K., Yanagihara, M., Tatefuji, T., Hashimoto, K., Mautner, V., Uto, Y., Hori, H., Kumazawa, S., Kaji, K., Ohta, T., Maruta, H., 2009. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phyther. Res.* 23, 423–427. doi:10.1002/ptr.2658
- Mihaylova, V.T., Borland, C.Z., Manjarrez, L., Stern, M.J., Sun, H., 1999. The PTEN tumor suppressor homolog in *Caenorhabditis elegans* regulates longevity and dauer formation in an insulin receptor-like signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7427–7432. doi:10.1073/pnas.96.13.7427
- Miyata, S., Oda, Y., Matsuo, C., Kumura, H., Kobayashi, K., 2014. Stimulatory effect of brazilian propolis on hair growth through proliferation of keratinocytes in mice. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11854–11861. doi:10.1021/jf503184s
- Morita, M., Nakanishi, H., Morita, H., Mihashi, S., Itokawa, H., 1996. Structures and Spasmolytic Activities of Derivatives from sesquiterpenes of *Alpinia speciosa* and *Alpinia japonica*. *chem. Pharm. Bull* 44, 1603–

1606. doi:10.1248/cpb.37.3229

Mpalantinos, M.A., Soares De Moura, R., Parente, J.P., Kuster, R.M., 1998.

Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phyther. Res.* 12, 442–444. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199809)12:6<442::AID-PTR320>3.0.CO;2-Y

Murphy, C.T., McCarroll, S., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S.,

Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., 2003. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424, 277–283. doi:10.1038/nature01789

Naresh Kumar, R., Poornachandra, Y., Nagender, P., Santhosh Kumar, G.,

Krishna Swaroop, D., Ganesh Kumar, C., Narsaiah, B., 2016. Synthesis of novel nicotinohydrazide and (1,3,4-oxadiazol-2-yl)-6-(trifluoromethyl)pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 4829–4831. doi:10.1016/j.bmcl.2016.08.020

Nguyen, B.C.Q., Be Tu, P.T., Tawata, S., Maruta, H., 2015. Combination of

immunoprecipitation (IP)-ATP_Glo kinase assay and melanogenesis for the assessment of potent and safe PAK1-blockers in cell culture. *Drug Discov. Ther.* 9, 289–295. doi:10.5582/ddt.2015.01041

Nguyen, B.C.Q., Taira, N., Maruta, H., Tawata, S., 2016. Artepillin C and

Other Herbal PAK1-blockers: Effects on Hair Cell Proliferation and Related PAK1-dependent Biological Function in Cell Culture. *Phytother Res* 30, 120–127. doi:10.1002/ptr.5510

Nguyen, B.C.Q., Yoshimura, K., Kumazawa, S., Tawata, S., Maruta, H., 2017. Frondoside A from sea cucumber and nymphaeols from Okinawa propolis: Natural anti-cancer agents that selectively inhibit PAK1 <i>in vitro</i>. *Drug Discov. Ther.* 11, 110–114. doi:10.5582/ddt.2017.01011

Omura, S., 2011. Microbial metabolites: 45 years of wandering, wondering and discovering. *Tetrahedron* 67, 6420–6459. doi:10.1016/j.tet.2011.03.117

Ong, C.C., Jubb, A.M., Haverty, P.M., Zhou, W., Tran, V., Truong, T., Turley, H., O'Brien, T., Vucic, D., Harris, A.L., Belvin, M., Friedman, L.S., Blackwood, E.M., Koeppen, H., Hoeflich, K.P., 2011. Targeting p21-activated kinase 1 (PAK1) to induce apoptosis of tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7177–82. doi:10.1073/pnas.1103350108

Patel, S., Sharma, V., N, S.C., Thakur, M., Dixit, V.K., 2015. Evaluation of hair growth promoting activity of *Phyllanthus niruri*. *Avicenna J Phytomed* 5, 512–519. doi:PMC4678496

- Rea, S.L., Wu, D., Cypser, J.R., Vaupel, J.W., Johnson, T.E., 2005. A stress-sensitive reporter predicts longevity in isogenic populations of *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* 37, 894–898. doi:10.1038/ng1608
- Rettig, M., Trinidad, K., Pezeshkpour, G., Frost, P., Sharma, S., Moatamed, F., Tamanoi, F., Mortazavi, F., 2012. PAK1 kinase promotes cell motility and invasiveness through CRK-II serine phosphorylation in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 7, e42012. doi:10.1371/journal.pone.0042012
- Rho, S.S., Park, S.J., Hwang, S.L., Lee, M.H., Chang, D.K., Lee, I.H., Chang, S.Y., Rang, M.J., 2005. The hair growth promoting effect of *Asiasari radix* extract and its molecular regulation. *J. Dermatol. Sci.* 38, 89–97. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.12.025
- Rodriguez, R.J., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., Buhler, D.R., 2001. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 39, 437–445. doi:10.1016/S0278-6915(00)00159-9
- Shin, S.H., Bak, S.S., Kim, M.K., Sung, Y.K., Kim, J.C., 2014. Baicalin, a flavonoid, affects the activity of human dermal papilla cells and promotes anagen induction in mice. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 388, 583–586. doi:10.1007/s00210-014-1075-0

- Shorter, K., Farjo, N.P., Picksley, S.M., Randall, V.A., 2008. Human hair follicles contain two forms of ATP-sensitive potassium channels, only one of which is sensitive to minoxidil. *FASEB J.* 22, 1725–36. doi:10.1096/fj.07-099424
- Srivastava, A., Tiwari, R., Srivastava, V., Singh, T.B., Asthana, R.K., 2015. Fresh water cyanobacteria *Geitlerinema* sp. CCC728 and *Arthrospira* sp. CCC729 as an anticancer drug resource. *PLoS One* 10, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0136838
- Sun, Y.N., Cui, L., Li, W., Yan, X.T., Yang, S.Y., Kang, J. Il, Kang, H.K., Kim, Y.H., 2013. Promotion effect of constituents from the root of *Polygonum multiflorum* on hair growth. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 23, 4801–4805. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.098
- Tawata, S., Fukuta, M., Xuan, T.D., Deba, F., 2008. Total utilization of tropical plants *Leucaena leucocephala* and *Alpinia zerumbet*. *J. Pestic. Sci.* 33, 40–43. doi:10.1584/jpestics.R07-10
- Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Ishihara, M., Toyama, S., 1996. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1643–5. doi:10.1271/bbb.60.1643

- Tsuchiya, I., Hosoya, T., Ushida, M., Kunimasa, K., Ohta, T., Kumazawa, S., 2013. Nymphaeol-A Isolated from Okinawan Propolis Suppresses Angiogenesis and Induces Caspase-Dependent Apoptosis via Inactivation of Survival Signals. eCAM 2013, Article ID 82245.
- Upadhyay, A., Chompoo, J., Kishimoto, W., Makise, T., Tawata, S., 2011. HIV-1 integrase and neuraminidase inhibitors from *Alpinia zerumbet*. J. Agric. Food Chem. 59, 2857–62. doi:10.1021/jf104813k
- Upadhyay, A., Chompoo, J., Taira, N., Fukuta, M., Tawata, S., 2013. Significant Longevity-Extending Effects of *Alpinia zerumbet* Leaf Extract on the Life Span of *Caenorhabditis elegans*. Biosci Biotechnol Biochem 77, 217–223. doi:10.1271/bbb.120351
- Vera H. Price, M.D., 1999. Treatment of hair loss. N. Engl. J. Med. :964-973. doi:10.1056/NEJM199909233411307
- Walker, G.A., Lithgow, G.J., 2003. Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. Aging Cell 2, 131–139. doi:10.1046/j.1474-9728.2003.00045.x
- Wikramanayake, T.C., Villasante, A.C., Mauro, L.M., Perez, C.I., Schachner, L.A., Jimenez, J.J., 2012. Prevention and treatment of alopecia areata

- with quercetin in the C3H/HeJ mouse model. *Cell Stress Chaperones* 17, 267–274. doi:10.1007/s12192-011-0305-3
- Wright, A.S., Thomas, L.N., Douglas, R.C., Lazier, C.B., Rittmaster, R.S., 1996. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J. Clin. Invest.* 98, 2558–2563. doi:10.1172/JCI119074
- Wu, J., Wu, Y., Yang, B.B., 2002. Anticancer activity of *Hemsleya amabilis* extract. *Life Sci.* 71, 2161–2170. doi:10.1016/S0024-3205(02)02013-1
- Xu, J.W., Ikeda, K., Kobayakawa, A., Ikami, T., Kayano, Y., Mitani, T., Yamori, Y., 2005. Downregulation of Rac1 activation by caffeic acid in aortic smooth muscle cells. *Life Sci.* 76, 2861–2872. doi:10.1016/j.lfs.2004.11.015
- Yanase, S., 2013. PAK1-deficiency/down-regulation reduces brood size, activates HSP16.2 gene and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Drug Discov. Ther.* 7, 29–35. doi:10.5582/ddt.2013.v7.1.29
- Yoon, N.Y., Eom, T.K., Kim, M.M., Kim, S.K., 2009. Inhibitory effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4124–4129. doi:10.1021/jf900006f

Zhang, N., Park, D.K., Park, H.-J., 2013. Hair growth-promoting activity of hot water extract of *Thuja orientalis*. BMC Complement. Altern. Med. 13, 9. doi:10.1186/1472-6882-13-9

Zhou, D., Tuo, W., Hu, H., Xu, J., Chen, H., Rao, Z., Xiao, Y., Hu, X., Liu, P., 2013. Synthesis and activity evaluation of tilorone analogs as potential anticancer agents. Eur. J. Med. Chem. 64, 432–441. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.050

Zoghbi, M. das G.B., Andrade, E.H.A., Maia, J.G.S., 1999. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. purpurata* (Viell.) Schum. FLAVOUR Fragr. J. 14, 411–414. doi:CCC 0882-5734/99/060411-04\$17.50