

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 シチ スサンティ

題 目 漢方薬の腫瘍選択的細胞毒性及び作用機構に関する研究  
(Studies on the tumor specific cytotoxicity of Kampo medicine and its mechanism of action)

化学療法はガン治療における主要な選択肢のひとつであるが、これまでの抗ガン剤はガン細胞のみならず正常細胞をも障害するため、副作用が大きな問題となってきた。本研究は、人に対する生理作用が明らかであり且つ日常的に服用されている漢方薬からガン細胞特異的な毒性物質を分離し、その作用機構を明らかにすることで副作用のない抗ガン剤開発に寄与しようとするものである。

まず初めに、364種の漢方薬の粗抽出液についてガン特異的細胞毒性のスクリーニングを行い、9種の漢方薬にガン特異的な毒性を検出した。これらの中、最も選択性が高いと判断されたゴボウシ (*Arctium lappa* L) については、活性物質を単離し、その化学構造をアルクチゲニンと同定した。アルクチゲニンは正常細胞に影響することなく肺腺ガン (A549)、肝ガン (Hep-G2)、胃ガン (KATOIII) の増殖を阻害し、ひいてはアポトーシスを誘導することが *in vitro* 試験で明らかになった。

次いで、選択的細胞毒性発現機構について検討した。アルクチゲニンはガン細胞のみにおいて選択的に細胞周期を  $G_0/G_1$  で停止させ、細胞増殖を阻害した。アルクチゲニンによる  $G_0/G_1$  期における細胞周期の停止は、 $G_1$  期から S 期への移行において重要な役割を演じている NPAT タンパク質発現を cyclin E/CDK2 或いは cyclin H/CDK7 複合体を介して抑制することにより行われることが示唆された。他方、アルクチゲニンは PI3K/Akt1 経路関連の遺伝子発現を阻害することにより、ガン細胞選択的にアポトーシスを誘導することも示された。また、グルタチオン (GSH) 合成阻害剤はアルクチゲニンに対するガン細胞の感受性を高めることから、細胞内 GSH 濃度も選択性を支配する因子の一つであることも示された。

最後に、9種の漢方薬についてその組み合わせ効果を検証した。9種の漢方薬をそれぞれ単独投与すると、いずれもガン細胞の増殖を選択的に阻害するものの高濃度の投与では正常細胞についても毒性が認められた。これに対し、9成分を低用量で混合した場合は、ガン細胞に対する毒性は増強される一方、正常細胞に対する毒性は殆ど認められなかった。これは、混合にともなうより多様な成分の相互作用がガン細胞に対する選択性を高めるだけでなく、副作用を軽減する可能性があることを示唆するものと考えられた。さらに、アルクチゲニンの選択的細胞毒性を高める粗抽出液との組み合わせについて検討し、ウバイ (*Prunus mume*) 或いはキャラウェイ (*Carum carvi*) が最適であることを明らかにした。

これらの成果は、漢方薬或いはその有効成分の組み合わせにより、ガン細胞に対する毒性を増強する一方で正常細胞への影響は最少に留める、つまり副作用のないガン特異的な抗ガン剤が開発可能であることを示すものと考えられた。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Siti Susanti

題 目

Studies on the tumor specific cytotoxicity of Kampo medicine and its mechanism of action

(漢方薬の腫瘍選択的細胞毒性及び作用機構に関する研究)

Chemotherapy as one of therapeutic options for cancer, until recently still has the drawbacks of severe side effects and dose-limiting toxicity. Given the reality of chemotherapy is unsatisfactory, innovations for healing cancer disease with the low side effects always become an important and attractive goal along the journey of anticancer drug discovery. Some herbal extracts of Kampo medicine are believed to contain different chemo-preventives or chemotherapeutics. However, the scientific basis for their modes of action is limited. Therefore, the identification of non-toxic chemotherapeutics from herbal medicines remains to be an attractive research theme to advance cancer treatments.

The first study evaluated the cytotoxicity profiles of 364 herbal plant extracts, using various cancer and normal cell lines. The screening found occurrence of A-549 (human lung adenocarcinoma) specific cytotoxicity in 9 species of herbal plants, especially in the extract of *Arctium lappa* L. Moreover, purification of the selective cytotoxicity in the extract of *Arctium lappa* L. resulted in the identification of arctigenin as tumor specific agent that showed cytotoxicity to lung cancer (A549), liver cancer (Hep-G2) and stomach cancer (KATO III) cells, while no cytotoxicity to several normal cell lines. Arctigenin specifically inhibited the proliferation of cancer cells, which might consequently lead to the induction of apoptosis. Thus, this study found that arctigenin was one of cancer specific phytochemicals, and responsible for the tumor selective cytotoxicity of the herbal medicine.

Next, the mechanism of action of arctigenin leading to specific cytotoxicity was studied. Arctigenin selectively arrested the cell cycle of cancer cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase, while induced apoptosis via modulation of gene expression in Akt-1 related signaling pathway. Furthermore, the cell cycle arrest in cancer cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was found to be effected by the down-regulation of NPAT protein via the suppression of either cyclin E/CDK2 or cyclin H/CDK7. Furthermore, GSH synthase inhibitor specifically enhanced the cytotoxicity of arctigenin, suggesting that intracellular GSH content appeared to be another factor to influence the susceptibility of cancer cells to arctigenin.

Finally, we evaluated the selective cytotoxicity of 9 herbal plant extracts in single or mixed doses. Single and higher doses of herbal extracts selectively decreased the viability of cancer cells with slight toxicity to normal cells. A combination of lower doses of these extracts significantly increased the cytotoxicity to cancer cells with no adverse effect on normal cells suggesting that selectivity against cancer cells was enhanced and toxicity to normal cells was reduced by interactions between the wide arrays of compounds in the mixed formulations. We further tested for the positive or negative interactions between these crude extracts and arctigenin. On the basis of changes in ED<sub>50</sub> values, it was found that a combination of arctigenin with extracts from *Prunus mume* or *Carum carvi* enhanced the cytotoxicity to cancer cells with no detrimental effect on normal cells. These observations indicated that combination of Kampo medicine can optimize cytotoxicity specifically to cancer cells while normal cells experience minimal toxicity.

In conclusion, this study clearly demonstrated that optimization of Kampo medicine can be achieved by appropriate combinations with respect to the specific cytotoxicity to cancer cells while ameliorating the toxicity to normal cells. Approaches based on interactions between Kampo-derived individual compounds or herbal plant extracts are necessary to find the optimum Kampo formulation for cancer treatment, and may open a new avenue for cancer chemotherapy.

## 学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	Siti Susanti
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学准教授 福田 雅一
	副査 佐賀大学准教授 永尾 晃治
	副査 鹿児島大学教授 侯 徳興
	副査 琉球大学教授 金城 一彦
審査協力者	
題目	<b>Studies on the tumor specific cytotoxicity of Kampo medicine and its mechanism of action</b> (漢方薬の腫瘍選択的細胞毒性及び作用機構に関する研究)
<p>化学療法はガン治療における主要な選択肢のひとつであるが、これまでの抗ガン剤はガン細胞のみならず正常細胞をも障害するため、副作用が大きな問題となってきた。本研究は、人に対する生理作用が明らかであり且つ日常的に服用されている漢方薬からガン細胞特異的な毒性物質を分離し、その作用機構を明らかにすることで副作用のない抗ガン剤開発に寄与しようとするものである。</p> <p>まず初めに、364種の漢方薬の粗抽出液についてガン特異的細胞毒性のスクリーニングを行い、9種の漢方薬にガン特異的な毒性を検出した。これらの中、最も選択性が高いと判断されたゴボウシ (<i>Arctium lappa</i> L) については、活性物質を単離し、その化学構造をアルクチゲニンと同定した。アルクチゲニンは正常細胞に影響することなく肺腺ガン (A549)、肝ガン (Hep-G2)、胃ガン (KATOIII) の増殖を阻害し、ひいてはアポトーシスを誘導することが細胞試験で明らかになった。</p> <p>次いで、選択的細胞毒性発現機構について検討した。アルクチゲニンはガン細胞のみにおいて選択的に細胞周期を <math>G_0/G_1</math> で停止させ、細胞増殖を阻害した。アルクチゲニンによる <math>G_0/G_1</math> 期における細胞周期の停止は、<math>G_1</math> 期から S 期への移行において重要な役割を演じている NPAT タンパク質発現を cyclin E/CDK2 或いは cyclin</p>	

H/CDK7 複合体を介して抑制することにより行われることが示唆された。他方、アルクチゲニン<sup>1</sup>は PI3K/Akt1 経路関連の遺伝子発現を阻害することにより、ガン細胞選択的にアポトーシスを誘導することも示唆された。また、グルタチオン (GSH) 合成阻害剤はアルクチゲニンに対するガン細胞の感受性を高めることから、細胞内 GSH 濃度も選択性を支配する因子の一つであることも示された。

最後に、9種の漢方薬についてその組み合わせ効果を検証した。9種の漢方薬をそれぞれ単独投与すると、いずれもガン細胞の増殖を選択的に阻害するものの高濃度の投与では正常細胞についても毒性が認められた。これに対し、9成分を低用量で混合した場合は、ガン細胞に対する毒性は増強される一方、正常細胞に対する毒性は殆ど認められなかった。これは、混合に伴う多様な成分の相互作用がガン細胞に対する選択性を高めるだけでなく、副作用を軽減する可能性があることを示唆するものと考えられた。さらに、アルクチゲニンの選択的細胞毒性を高める粗抽出液との組み合わせについて検討し、ウバイ (*Prunus mume*) 或いはキャラウェイ (*Carum carvi*) が最適であることを明らかにした。

これらの成果は、漢方薬或いはその有効成分の組み合わせにより、ガン細胞に対する毒性を増強する一方で正常細胞への影響は最少に留めることが可能であることを実験的に証明しており、副作用のないガン特異的な抗ガン剤の開発に寄与する成果と判断された。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	Siti Susanti
審査委員	主査 琉球大学教授 屋 宏典
	副査 琉球大学准教授 福田 雅一
	副査 佐賀大学准教授 永尾 晃治
	副査 鹿児島大学教授 侯 徳興
	副査 琉球大学教授 金城 一彦
審査協力者	
実施年月日	平成25年 1月 21日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査及び審査協力者は、平成25年1月21日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	Siti Susanti
<p>[質問1] cell cycleの実験でG<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期の割合が細胞によって異なるのは何故か？</p> <p>[回答1] 基本的には細胞の種類が異なるためだと考えられる。ただ、いずれの場合もPBSをコントロールとして比較しているので、細胞周期のずれは確実に検出できていると判断している。</p> <p>[質問2] AKTのRT-PCRを行なっているが、何故リン酸化のチェックをしていないのか？</p> <p>[回答2] ご指摘のとおり、シグナル伝達にはタンパク質のリン酸化を調べる必要がある。今後、検討したい。</p> <p>[質問3] 細胞周期との関連で Cyclin Dの発現は調べていないのか？</p> <p>[回答3] フローサイトメトリーにより、アルクチゲニンはG<sub>1</sub>からS期への移行を阻害することが解っており、G<sub>1</sub>/S期の移行にCyclinDは関与しないため、本実験では調べていない。</p> <p>[質問4] エタノール抽出物の混合投与の実験ではエタノールそのものの細胞毒性は問題にならないか？細胞毒性の低いDMSOを使用したほうがよいのではないか？</p> <p>[回答4] 混合物のエタノール終濃度について細胞毒性を予め評価しており、用いた濃度の範囲内では細胞の生存率に影響しないことを確認している。現時点では特にDMSOの必要性はないと判断している。</p> <p>[質問5] ゴボウシ以外の漢方薬にもアルクチゲニンは含まれているのか？</p> <p>[回答5] ゴボウシ以外の報告例はない。</p> <p>[質問6] スクリーニング実験ではエタノール濃度が50%であるにもかかわらず、大量精製において70%を採用したのはなぜか？</p> <p>[回答6] 大量精製の際には、抽出効率の高いアルコール濃度についてトライ&amp;エラーで検討し、70%がアルクチゲニンの抽出に最適であることが解ったためである。</p> <p>[質問7] ゴボウシ以外の他の漢方薬についても選択的細胞毒性成分としてアルクチゲニンが含まれている可能性はあるか？</p> <p>[回答7] 他の生薬にアルクチゲニンは殆ど含まれないので、その可能性は低いと判断している。</p> <p>[質問8] 今後in vivo試験を行うことも想定しているか？</p> <p>[回答8] ぜひ、検討したいと考えている。</p> <p>[質問9] ガン細胞と正常細胞ではアルクチゲニンに対する感受性が異なっているが、その主因は何と考えているか？たとえば、アルクチゲニンを認識するレセプターの有無が関係するような可能性はどうか？</p> <p>[回答9] ガン細胞と正常細胞ではGSH濃度が大きく異なっており、正常細胞はGSH濃度が概して高いのに対して、ガン細胞は低い。GSHはアルクチゲニンを抱合し、無毒化するのでこれが一番効いているのではないかと個人的には考えている。</p> <p>[質問10] 大量精製の際のアルクチゲニンの収率はどの程度か？</p> <p>[回答10] 乾物重量200gのゴボウシから125mgのアルクチゲニンが精製できた。</p> <p>[質問11] 9種類の生薬抽出物の混合物を用いた場合の正常細胞への影響はどうか？</p> <p>[回答11] グラフ左半分は正常細胞に対する結果を示しており、殆ど影響を受けていない。</p> <p>[質問12] 混合物を実際に生体に用いた場合の副作用の可能性についてはどうか？</p> <p>[回答12] 漢方はもともと安全性が確立されているため、副作用が出る可能性はすくないと判断している。</p>	