

養生片仔癩の研究内容:

<実例報告>

「ヒト肝癌細胞に対する新薬草療法剤の 作用機序に関するインビトロ研究」

米国癌研究協会 例年研究会議

2008年11月6日~7日

F・マロタ^{1,3}、M・原田²、KL・ゴー³、A・ロレンゼッティ⁴、P・マランドラ⁴、E・ミネリ¹

¹ミラノ大学バイオテクノロジー・伝統医学WHOセンター(イタリア),

²MCH病院(東京都), ³マラヤ大学胃腸病学・肝臓病学講座(マレーシア、クアラルンプール),

⁴GAIAエイジ・マネジメント基金(イタリア、パヴィア)

[要旨]

HepG2ヒト肝癌細胞を、異なる濃度の養生片仔癩 (YHK) 溶液を加えてインキュベーター内で24時間ないし48時間培養し、24時間培養後、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニール)-2-(4-スルフォフェニール)-2Hテトラゾリウム (MTT) 測定法によって細胞増殖と細胞毒性を判定した。細胞毒性、すなわち壊死は、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の放出として表示した。指数増殖期後、HepG2は異なる用量のYHKで処置後、アネキシンV-FITCキットを用いてアポトーシスを評価した。さらに、ジクロロフルオレセイン・ジアセテート (DCFH-DA) 測定法で酸化ストレスを測定した。対照群と比べると、YHK処置したHepG2培養細胞は、細胞増殖率が経時的に有意に低下した ($p < 0.01$)。これは細胞毒性が増強したためとみられる (MTT検定及びLDH検定) ($p < 0.001$)。他方、YHKはインビトロでは、HepG2細胞の酸化ストレスを大幅に亢進させ ($p < 0.01$)、72時間の培養で細胞のG2/M期における増殖停止とともにアポトーシスを大幅に増加させる ($p < 0.01$) ことが判明した。こうしたデータは、YHKはアポトーシスの外因性調節因子や内因性調節因子を調節し、アポトーシスに対する腫瘍細胞の感受性を高める働きをしている可能性を示唆している。この栄養機能性食品が、レドックス状態調節作用や免疫調節作用により、保護的抗腫瘍効果を発揮することが、インビトロおよびインビボで明らかにされていることから考えると、これらの予備的データは注目に値するものである。こうした天然物質についてはこれまでのところ毒性の報告はなく、化学療法の採用が計画されている幾

養生片仔癩の研究内容:

つかの病的状態に対し有効な栄養サプリメントとなるといえる。

キーワード: HepG2細胞、培養肝細胞、養生片仔癩 (YHK)

[緒言]

ヒト肝細胞癌 (HCC) は、世界の主要な死亡原因の一つであり¹⁻⁴、肝移植の対象となりうる限られた症例^{5,6}を除き、外科的切除が唯一の治療法である。しかし、多様型もしくは転移性の腫瘍患者の場合、こうした治療法には限界がある。このため、効果的な化学療法剤を探索することは、進行性もしくは再発HCC患者の外科治療後の生存率を高めるための重要な目標である。一方、HCCは通常、多剤耐性遺伝子の発現により、使用できる化学療法剤に対して感受性が低い。こうしたことから、HCCに対して有効な新薬の評価が急務となっている。HCCには細胞増殖とアポトーシスの両方が関与しており^{7,8}、特にHCCが低分化型へ進行するにつれ、細胞増殖が亢進するらしいことが明らかにされている^{9,10}。我々は、ここ数年間に数多くの実験的試験や臨床試験を実施し、天然物質、すなわち養生片仔癩 (YHK: 田七、杜仲、黄精、甘草、高麗人參。株協通事業、東京都) の安全性という側面に加え、その有効な肝保護特性も示唆する結果を得てきた。^{11,12}。さらにごく最近、インビボ実験肝癌発癌モデルにおいて、YHKが癌化を有意に阻害することを示した¹³。そこで、本研究においては、HCC患者に対する臨床応用の理論的根拠を提供するため、HepG2ヒト肝癌細胞培養細胞系におけるYHKの増殖抑制剤及びアポトーシス促進剤としての可能性を探ることを目的とした。

[材料と方法]

細胞と化学薬品

HepG2ヒト肝癌細胞は米国細胞バンク (ACTT) より購入した。イーグル培地 (MEM、 α -改良型)、ジクロロフルオレセイン・ジアセテート (DCFH-DA)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、AAPHはシグマ社から購入した。DCFH-DAの原液 (20 μ M) はDMSOを溶媒とし-20°Cで、最大1ヶ月間保存した。AAPH(166.4mM)使用原液は、適量をPBSに溶解し日々新しく作製した。AAPH (本実験におけるフリーラジカル発生源) は使用時まで氷浴中に静置した。

養生片仔癩の研究内容:

細胞培養

細胞は、既報の方法¹⁴に従い、2mMグルタミン、10%ウシ胎仔血清、40U/mLストレプトマイシン、50U/mLペニシリン添加ダルベッコMEM培地（1x）中、37°C、950mL/L空気、50mL/L二酸化炭素（CO₂）の加湿環境下で培養した。細胞は単層培養とし、培地は一日置きに交換した。すべての実験でコンフリュエントなHepG2培養細胞を使用できるように、実験開始前に、細胞を基礎培地（100%MEM）で24時間培養し、80~90%コンフリュエンシーに増殖、周期を同調した。

被験薬剤含有培地の作製

熱水抽出したYHKを調製し、蒸留水1mL中薬剤1gの濃度になるまで濃縮した。37°C、30分かけてDMEMに溶解、攪拌した後、YHKの濃度が100mg/mLになるよう調整した。この溶液を遠心分離（1200 x g、30分）し、不溶成分を除去した。ついで、上清を0.45 μm及び0.22 μmのフィルターで濾過滅菌した。

細胞生存率、細胞増殖、細胞毒性測定法

波長490nmで、比色法により細胞生存率を調べた後、細胞懸濁液200 μLを含む試料を0.02%エデト酸で分散させ、細胞濃度 3×10^7 /Lの懸濁液を調整した。ついで、細胞懸濁液を96ウェル平底マイクロタイタープレートに、1ウェル当たり総量が100mLになるよう分注し、37°C、5%CO₂インキュベーター内で4時間培養した。培養細胞に異なる濃度（0~200mg/L）のYHK溶液を加え、24時間インキュベーター内で培養した。24時間培養後、5g/L 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニール)-2-(4-スルフォフェニール)-2Hテトラゾリウム（MTT）溶液、（1ウェル当たり20 μL）及び25 μmol/Lフェナジンメトサルフェートを添加した。さらに4時間培養後、上清を捨て、0.04mol/Lイソプロピルハイドロライド（1ウェル当たり100 μL）を追加した。その後、懸濁液はマイクロバイブレーターで5分間振動させ、細胞内でのMTT還元によって産生された可溶性ホルマザンの吸光度（A）を、ELISAリーダーを用い570nmの波長で測定した。細胞抑制率は、抑制率 = $(1 - A_{\text{処置群}} / A_{\text{対照群}}) \times 100\%$ の式を用いて算出した。すべて3重測定を行い、結果は血球計数器を用いて直接細胞数を計測することにより確認した。さらに、 3.7×10^4 Bq³ Hチミジンで細胞を標識し、24時間後に、シンチレーションカウンターを用い、³HチミジンのDNAへの取り込みを測定した。

細胞毒性については、NADH(還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)が減少する場合、波長340nmにおける吸光度が低下することから、細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の放出量で判断した。簡単に言えば、異なる濃度のYHK溶液を加えてインキュベーター内で24時間培養した後、細胞培養の上清と培地（100 μL）を、改良型Krebs-Heuseleit緩衝液（118mmol/L塩化ナトリウム、24mmol/L炭酸水素ナトリウム、1mmol/Lリン酸二水素カリウム、4.8mmol/L塩化カ

養生片仔癆の研究内容:

リウム、3mmol/L塩化カルシウム、0.8mmol/L磷酸マグネシウム、pH7.4) 900 μ L、20mg/Lウシ血清アルブミン、1.36mmol/Lピルビン酸ナトリウム、さらに0.2mmol/L NADHを加えて攪拌した。LDH放出度 (%) は、培地のLDH活性を、細胞培養上清および培地のLDH活性で除した値 $\times 100\%$ で算出した¹⁶。YHK抽出物を添加しない細胞には10mL/Lエタノールと10mL/Lソルビトール溶液を加えてインキュベーター内で培養し、対照群とした。細胞と培地は回収した。細胞内及び培地の蛋白量については、ローリーらの方法を改良したものにより測定した¹⁷。

細胞周期進行とアポトーシスについての評価

細胞は、フラスコ内において 1×10^6 細胞/フラスコの密度で播種した。24時間後、最終濃度200mg/Lで、当該フラスコにYHKを添加し、24時間、48時間、もしくは72時間インキュベーター内で培養した。細胞はトリプシン処理し、収集、試験管内で80%冷却エタノール1mLで固定し、4°C15分間、インキュベーター内で培養した。培養後、細胞は1500rpmで5分間遠心分離し、細胞ペレットは、300 μ g/mL リボヌクレアーゼ (シグマ社、米国ミズーリ州) を含むプロピジウムアイオダイド (10 μ g/mL) 500 μ lに再懸濁させた。その後、細胞を30分間冷却培養し、53 μ mナイロンメッシュで濾過した。細胞周期分布は、FACSキャリバー (ベクトン・ディッキンソン社、米国カリフォルニア州) を用い、細胞1万個から計測した。アポトーシスはアネキシンV-FITCキット結合アッセイを用いて評価し、蛍光励起細胞分別装置 (FACS) を使用したサイトメトリーにより解析した。上記のように調製した細胞懸濁液 (2mL) は、結合緩衝液 (10mM HEPES/水酸化ナトリウム、pH7.4、140mM塩化ナトリウム、2.5mM塩化カルシウム) に再懸濁し、アネキシンV-FITCを添加して、96ウェルプレートで30分間、室温、暗所にて培養した。37°C、5%CO₂インキュベーター内で24時間培養した後、YHK溶液を添加した。さらに72時間培養した後、細胞を遠心分離して回収し、50 μ g/mLホスファチジルイノシトール、10 μ g/mLデオキシリボヌクレアーゼ (リボヌクレアーゼを含まない)、および0.1% Igepal CA-630を含むトリス緩衝生理食塩水で、4°C、1時間かけて染色した。FACS解析は、フローサイトメーターにより波長488nmで行った。細胞4000個からデータを収集し、3重解析を繰り返した。

DCFH-DA測定法によるHepG2細胞における酸化ストレスの評価

トリパンブルー排除試験によってHepG2細胞の生存率をチェックした後、試験開始の12時間前にこれらの細胞を96ウェルプレートに分注した (10000細胞/ウェル)。実験当日、親水性のYHK抽出物を解凍し、PBS (pH7.3) で希釈した。12時間培養した後、培地を除去し、細胞はPBSで洗

養生片仔癀の研究内容:

浄後、PBS中0~200mg/L YHK抽出物50 μ L、で処置し、対照群はPBS 50 μ Lで処置した。総量200 μ L/ウェルになるよう、DCFH-DA(最終濃度:5 μ M) 50 μ L及びAAPH(最終濃度:41.6mM) 50 μ Lを使用した。蛍光プレートリーダー(励起フィルター495/20nm、吸収フィルター528/20nm)を用いて、AAPHを添加した直後及び5分置きに30分間にわたって蛍光を計測した。各プレート内で試料を無作為抽出することによって、すべての試料について3重測定を行った。データは蛍光強度/ウェルとして表示した。30分間の計測が終了した後、細胞をPBSで洗浄し、蛋白量を以下のようにして測定した。すなわち、各ウェルに0.8%濾過ジギトニン溶液50 μ Lを加え細胞を溶解し、37°Cで10分間培養した。その後、検出用蛍光色素バイオラド200 μ Lを各ウェルに添加し、色素の強度をマイクロプレートリーダーにより、595nmで測定した。

結果は、各ウェルに対しmg蛋白/mLとして表示し、参考標準としてウシ血清アルブミンを使用した。

最終データは、蛍光強度/mg蛋白、もしくは対照群(YHK抽出物は添加せずDCFH及びAAPHのみ)と比較した蛍光強度(ROS産生/mg蛋白 \pm 標準偏差)の30分間の平均減少率として表示した。データは公式(100c-(Fb₃₀/Fc₃₀ \times 100))を用いて算出した。100cは対照群が示す100%蛍光強度/mg蛋白/30分を表し、Fb₃₀はYHK抽出物が存在する場合の30分時点の蛍光強度/mg蛋白であり、Fc₃₀は対照群の30分時点の蛍光強度/mg蛋白を表している。データを標準化し、その偏差は、すべての試料の蛍光強度/mg蛋白質を対照試料の蛍光強度/mg蛋白で毎回割ることによって調整した。

[統計分析]

データは、 $\chi \pm s$ として表示している。データは一元配置分散分析によって分析し、YHK処置による効果が認められた場合には、ポストホック比較を行うためフィッシャーの最小有意差検定を用いた。p<0.05の場合その差を有意とした。1プレート当たり3試料の平均を用いて計算を行った。

[結果]

細胞増殖測定

24時間培養後、YHK(25~200mg/L)処置群は対照群と比較して、用量依存的にHepG2細胞の細胞増殖を有意に(p<0.05)抑制することが、MTT測定法により確認された(図1)。YHKは100mg/L及び200mg/Lで、HepG2細胞の細胞増殖を、それぞれ対照群の56%、49%に抑制した。³Hチミ

養生片仔癀の研究内容:

ジンのDNAへの取り込みは、50mg/L濃度以上で用量反応的に有意に抑制されることが観察された (>50%抑制、 $p < 0.01$) (データは示されていない)。

細胞毒性測定

細胞毒性は、LDH放出量により直接測定した。24時間培養後、YHK(50~200mg/L)は対照群と比較して、HepG2細胞に対し細胞毒性を有意に ($p < 0.05$) 増加させた (6.2%) (図2)。YHKの用量が200mg/Lの場合、細胞からのLDH放出は28.6%に上昇し、用量50mg/Lの場合 (12.2%) に比べて有意に ($p < 0.05$) 高かった。

HepG2細胞の細胞周期及びアポトーシスに対するYHKの影響

YHKが細胞周期に与える影響をフローサイトメトリーによって判定した。HepG2細胞の細胞周期に対するYHKの影響は用量依存的かつ時間依存的であるようであった。200mg/L YHK存在下、72時間培養した場合、G2/M期の細胞集団は対照群と比較して12.1%から48.9%へ増加した。G2/M期の細胞集団の増加に伴い、G1期の細胞集団は63.4%から44.3%へ減少した ($p < 0.05$) (図3)。結果的に、72時間の時点で、YHKは50mg/Lの濃度以上で用量依存的に著しくアポトーシスを誘導した。予期した通り、アポトーシス細胞集団の増加は同時に起こった細胞周期開始前の細胞集団の拡大と関連していた。これは細胞周期分析によって観察された通りである。

酸化ストレスに対するYHKの効果

図4に示す通り、HepG2細胞のROS (活性酸素種) レベル (蛍光強度と一致) は、YHK (50mg/L~200mg/L) 処置後に有意に上昇した。最高濃度の場合、ROSレベルは基礎値と比較して80%まで上昇した ($p < 0.001$)。

[考察]

幾つかの実験的研究や疫学的研究によって、食品中の抗酸化作用をもつ微量栄養素は、イニシエーション、プロモーション、プログレッションのいずれかの段階において分子レベルで影響を与えることにより、発癌を抑制できることが明らかになっている¹⁹⁻²²。多細胞生物の場合、アポトーシスはホメオスタシスを維持するために必要不可欠なプロセスであり、ホルモン、サイトカイン、成長因子などの受容体調節シグナルによって誘発されるため²³、多様な生理学的病理学的状態において重要な役割を果たしている。実際、抗癌剤は、アポトーシスの外因性調節因子や内因性調節因子を調整し、癌細胞のアポトーシスに対する感受性を高める一方、理想的には正常細胞に対し

養生片仔癀の研究内容:

てはまったく細胞毒性効果を及ぼさないことが期待される。本研究において、YHKは濃度依存的にHepG2細胞の増殖を抑えることが可能で、200mg/L濃度で細胞生存率がほぼゼロに低下することが観察された。(図1)。細胞増殖を抑制する効果以外にも、高用量(100~200mg/L)のYHKは、HepG2細胞からのLDH放出によって判定される細胞毒性が有意に上昇した。しかし、YHKの細胞毒性効果は、150mg/L以上の用量では横ばいとなった。YHKの細胞毒性効果は、壊死及び/またはアポトーシスに起因すると見てよいかもしれない。

我々の研究結果は、YHK処置細胞で壊死指数としてのLDH放出量の増加を明らかにしたが、この事実はYHKが壊死性変化の引き金となっている可能性を示した。アポトーシスがYHKの細胞毒性効果に寄与している可能性もあるかもしれない。実際、アポトーシス誘発に伴い、カスパーゼ3の活性化²⁴やBcl-2のダウンレギュレーション²⁵に先立って、細胞内にROSが産生されることが明らかになっている。我々の研究結果はアポトーシスを誘発する用量であっても、そうでない用量でもYHKを添加した場合、対照群と比べてROSレベルが有意に上昇することを示した。我々の研究結果によって示されている。細胞内あるいは細胞外部位におけるROS産生は、酸化傷害時の細胞生存に影響を与える一方²⁶、アポトーシスは細胞内のレドックス状態によって制御されているとみられる²⁷ことはよく知られている。興味深いことに、天然物質の丹参(タンジン)が、アポトーシスの誘発により、また基礎細胞研究で示されているように²⁹、細胞内グルタチオン(GSH)の欠失により、HepG2ヒト肝癌細胞の増殖を抑制する²⁸ことが、最近確認されている。

従って、YHKによって誘発されるROSレベルの上昇は、ある種の抗癌剤についての清水らの報告³⁰にあるようにHepG2細胞のアポトーシスや細胞増殖抑制に関わる推定メカニズムの一つかもしれない、と我々は考えている。YHKは、細胞のG2/M期増殖停止を誘発することができ、用量依存的かつ時間依存的にHepG2細胞にアポトーシス効果をもたらすことが確認された。細胞周期チェックポイントは、細胞周期が適切に機能しているかどうかを確認する重要な制御メカニズムである。特に、G2/Mチェックポイントでは、DNAが損傷を受けた場合、有糸分裂への進入は阻止される³¹。以上をまとめると、本研究は、インビトロでYHKがHepG2肝癌細胞に強力な効果を及ぼすことを示している。YHKはHepG2細胞の増殖を抑制し、アポトーシスによる細胞死を誘発する。YHKはROSの産生、HepG2細胞内のレドックスバランスの異常を来すことにもなる。YHKに因って引き起こされるレドックスバランスの異常は、HepG2細胞の増殖抑制やアポトーシス誘発に重要な役割を果たしていると推測される。本研究では、各単一成分の効果を区別することや、各成分の相互作用を解明することはできず、現段階では、このことが限界であることは確かである。しかし、没食子酸や甘草などYHKに含まれる少なくとも一部の成分に癌の増殖を抑制する効果があることが、類似のインビトロテストやインビボテストで示されている³²⁻³⁴。特に、没食

養生片仔癀の研究内容:

子酸は、没食子酸誘発アポトーシスに対する抑制因子が産生されるために、耐性となると考えられる肝細胞などの正常細胞に比べはるかに感受性の高い腫瘍細胞に対して特異的に、細胞内ROS関連細胞毒性を示すことが立証されている³⁵。我々の研究結果は、肝細胞癌に関する更なるインビボ研究や臨床研究のための基礎となるばかりではなく、YHKの薬理学的理解をより一層深めるための研究に一段と弾みをつけることにもなるだろう。

養生片仔癀の研究内容:

図1 HepG2細胞の細胞増殖に対するYHKの効果

MTT測定法で計測したHepG2細胞の細胞増殖に対するYHKの効果。データポイントは3回の計測の平均値。データは $x \pm s$ として表示。

図2 HepG2細胞の細胞毒性に対するYHKの効果

乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出により判定したHepG2細胞の細胞毒性に対するYHKの効果。データは $x \pm s$ として表示 (n=3)。同一アルファベットを共有しない値は、フィッシャーの最小有意差検定によると、同一細胞系で有意の差があった(P<0.05)。

図3 HepG2細胞の細胞周期とアポトーシスに対するYHKの効果 (72時間時点)

(左図) 細胞周期の進行

(右図) アポトーシス (上昇率%)

72時間時点で観察された細胞周期停止 (G3M期の細胞集団) と、それに関する用量関連のアポトーシス促進に対するYHKの効果。データは3回の測定値より算出し、 $x \pm s$ として表示。

図4 HepG2細胞における酸化ストレス発生に対するYHKの効果

DCF蛍光により計測した、HepG2細胞における急激な活性酸素発生に対するYHKの用量別の効果。データは $x \pm s$ として表示。