

(様式 6 - 1)

学籍番号 : 1631D03

氏 名 : 大久保 伸哉

論文題名 : がん細胞の増殖およびオートファジーを抑制する天然物の網羅的探索

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

オートファジーは細胞内分解機構のひとつであり、分解で生じたアミノ酸は細胞の恒常性維持に重要な役割を担っている。近年、オートファジーと種々の疾病との関連性が明らかになってきており、中でもオートファジーががん細胞の増殖に関与していることを示す報告は多い。しかしながら、がん細胞においてオートファジー制御能を持つ天然物に関する研究は限られている。申請者が所属する研究室は、がん細胞の増殖を抑制する天然物の探索とその作用機序解析を行っており、その中で汎用生薬であるオウレン（黄連）やオウバク（黄柏）の主要成分である berberine (BBR) のアポトーシス誘導能とその作用機序を報告している。また近年、BBR がいくつかのがん細胞においてオートファジーを誘導することが報告されており、オートファジーを制御する化合物が生薬中に潜在している可能性が示唆される。そこで本研究では、生薬エキ斯拉イブラリーの中からオートファジー制御能を持つ生薬エキスを探索し、さらに、そのエキス中に含まれる化合物の同定ならびに作用機序の解明を目的として研究を行った。

はじめに、ヒト肝がん細胞 HepG2 において、生薬エキ斯拉イブラリーを用いてオートファジー関連因子および細胞増殖への影響をスクリーニングした。スクリーニングの結果、オートファゴソーム形成のマーカーである LC3-II の発現増加が見られた生薬エキスは、約 130 種の生薬エキスのうち 24 種であった。また、これら 24 種の生薬エキスのうち、細胞増殖へ影響を及ぼした生薬エキスは 8 種であった。LC3-II の発現増加がオートファゴソーム形成促進または分解抑制によるものかを区別するために、オートファゴソームに内包され分解される p62 を指標としたオートファジーフラックスに対する評価を行った結果、8 種の生薬エキスのうちゴボウシ（牛蒡子）、ソボク（蘇木）、モッコウ（木香）、レンギョウ（連翹）、ヒカイ（葶藶）エキスが細胞増殖を抑制し、p62 の蓄積、すなわちオートファゴソームの分解を抑制した。以上の結果から、これら 5 種の生薬エキスは、オートファジー阻害および細胞増殖抑制作用を有することが示唆された。

続いて、選抜された 5 種の生薬エキスのうちゴボウシおよびレンギョウエキスの主要成分が

(様式 6 - 1)

arctigenin (ARG) であることに着目して解析を行った。オートファジー関連因子および細胞増殖への影響を解析した結果、ARG がオートファジー阻害および細胞増殖抑制作用を有することを見出した。また、ARG と作用機序の異なるオートファジー阻害剤 3-methyladenine (3-MA) および chloroquine (CQ) のオートファジー関連因子への影響を比較した結果、ARG のオートファジー阻害作用機序は 3-MA および CQ とは異なることが示唆された。ARG のオートファジー阻害作用を確実なものとするために、細胞を飢餓状態にすることによって誘導されるオートファジーに対する影響を評価した結果、ARG は飢餓誘導性オートファジーを抑制した。さらに、アポトーシス誘導因子への影響を解析したところ、ARG は caspase-3 および PARP の活性化に影響を与えなかったことから、ARG の細胞増殖抑制作用は、caspase-3 を介したアポトーシスに依存しないことが推察された。

次に、選抜された 5 種の生薬エキス中で、もっとも強い細胞増殖抑制作用を示したヒカイエキスに着目し、化合物の単離同定および活性評価を行った。ヒカイエキスを順次溶媒分配し、得られた各画分の中で *n*-ブタノール画分がもっとも強い細胞増殖抑制作用を示したことから、同画分について分離精製を行った。その結果、ステロイド型サポニン dioscin (1)、yamogenin 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside (2)、protodioscin (3) を単離同定し、さらに 1 および 2 の酸加水分解を行いそれぞれのアグリコン diosgenin (4)、yamogenin (5) を得た。また、これら 1-5 が細胞増殖抑制作用を有すること、1-3 がオートファジー阻害作用を有することを明らかにした。さらに、化合物 1-3 は caspase-3 および PARP の活性化に影響を与えなかったことから、1-3 の細胞増殖抑制作用は、caspase-3 を介したアポトーシスに依存しないことが推察された。

最後に、モッコウエキス中のオートファジー阻害化合物の確認および活性評価を行った。モッコウエキスを順次溶媒分配することで得られた画分のうち、ヘキササン画分がもっとも強い細胞増殖抑制作用を示したことから、同画分の主要成分を TLC および HPLC にて解析した。その結果、同画分の主要成分は costunolide (CL) および dehydrocostuslactone (DCL) であった。また、CL および DCL が細胞増殖抑制およびオートファジー阻害作用を有することを明らかにした。さらに、CL および DCL は、ARG や 1-3 とは異なり caspase-3 および PARP を活性化したことから、アポトーシス誘導作用を有することが示唆され、CL および DCL の細胞増殖抑制作用は、アポトーシス誘導作用の関与が示唆された。

本研究により、オートファジー阻害および細胞増殖抑制作用を有する化合物を 6 種見出した。これらの化合物は、オートファジー研究の新たな解析ツールとなるとともに、オートファジー阻害を介した抗がん剤開発に貢献することが期待される。