

琉球大学学術リポジトリ

[総説]沖縄産食材由来の腫瘍選択的抑制活性物質の探索

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): 抗腫瘍活性, 食品由来成分, 培養細胞, スクリーニング キーワード (En): 作成者: 岩崎, 公典, 屋, 宏典, IWASAKI, Hironori, OKU, Hirosuke メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016624

沖縄産食材由来の腫瘍選択的抑制活性物質の探索

岩崎 公典・屋 宏典

*琉球大学遺伝子実験センター遺伝資源応用分野

Tumor specific cytotoxicity from subtropical plants in Okinawa.

Hironori IWASAKI and Hirosuke OKU

*Division of Molecular Biotechnology, Center of
Molecular Bioscience, University of the Ryukyus*

Keywords : 抗腫瘍活性、食品由来成分、培養細胞、スクリーニング

はじめに

琉球諸島は亜熱帯海洋性気候という気候帯に属しており、特有的な気象、土壌、海洋、および生物環境下にある。また、交易中継地としての歴史が長く、アジア諸国の文化に影響された独特の文化や生活様式が確立されている。一方で、長寿国日本の中にあつて、自立している高齢者の割合が高いことも知られている¹⁾。家森らは一連の先行研究において、沖縄県在住の沖縄県人と、沖縄からハワイやブラジルへ移住した沖縄系移民の生活習慣や健康状態を調査したところ、同じ遺伝的背景を保持していても、伝統的な生活様式を守っている地域には生活習慣病が少なく、逆に、欧米化した地域では発症率が増加していることから、生活様式とりわけ食生活が生活習慣病の予防に効果的であることを示唆している^{2,3)}。これと同様に、その他の疾患についても食文化に大きく影響していることが予想される。沖縄県では全国的に悪性新生物による死亡率が低いことが知られており⁴⁾、沖縄県における伝統的な食文化には、腫

瘍を抑制する効果が少なからず存在していることが期待された。

腫瘍を抑制する物質としては、これまでに様々な植物性抗腫瘍物質が報告されており⁵⁻⁸⁾、その多くは改良されたのち、既に抗腫瘍剤として臨床応用されている⁹⁾。しかしながら、現行の抗腫瘍剤には強い副作用があり、患者への負担が大きいことなどが問題になっている。

このような背景から筆者らは、沖縄県産の食材および薬草類由来の低副作用の抗腫瘍活性のスクリーニングを行い、これまでに薬草茶であるサルカケミカン (*Toddalia asiatica* Lam.) 抽出液中に、強い活性を見出している。本報告ではこのサルカケミカン由来の抗腫瘍活性成分に関する研究を中心に、沖縄県産食材由来の機能性物質の探索と、スクリーニング技術の可能性について考察する。

素材としての沖縄県産食材

沖縄県を含む亜熱帯性の植物は温帯性のものと比較すると、様々な環境ストレスにさらされている。亜熱帯地域における環境ストレスは主に、紫外線、

*〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1

可視光線、熱、塩、そしてやや例外的ではあるが病害虫による被害が挙げられる。これらの環境ストレスと植物の抵抗メカニズムの関係を表1にまとめた。ここに示したストレスの多くは、植物体内の抗酸化物質によって中和されており、熱帯、亜熱帯性の植物に高濃度の抗酸化物質が見出されるのは、強い環境ストレスによってもたらされた結果である。一方、病害虫による攻撃に対しては、アルカロイドやステロイドなどの毒性物質を植物体内に蓄積したり、精油などの忌避効果のある揮発性物質を放出することによって対応している。また、ある植物種が他種を駆逐するアレロパシー作用も、このような植物毒によって引き起こされている。すなわち熱帯、亜熱帯域に生育している植物に毒性植物が多いのは、その気候域に多様な生物種が存在していることに起因していると考えられる。このような背景から、亜熱帯性の植物には様々な生理活性物質が種類も量も豊富に含まれており、これを利用する他の生物種にも多大な影響を与えていると考えられる。

一部の亜熱帯性植物は、経口摂取した場合に人体に及ぼす影響（栄養価、風味、薬効など）によって、食材あるいは薬草などに分類され、特有の食文化として現在に継承されている。すなわち、現在我々が食材として利用している植物群とは、長い食文化の歴史のなかでヒトに対する様々な有益性を評価されたものであり、ヒトに対する安全性および有益性のスクリーニングを行った結果と考えることができる。このような背景から、亜熱帯性の植物群を食材として利用することによって、そこに含まれる多種多様な生理活性物質が、同地域に生活するヒトの健康状態にも少なからず影響していると考えられる。筆者らは沖縄県における低発ガン率に注目し、沖縄産食材には抗腫瘍効果を示す成分が存在していると予測し、スクリーニングを行った。

表1 亜熱帯海洋性気候域に生育する植物に対する環境ストレス

ストレス起源	直接的なストレス要因	抗ストレスメカニズム
紫外線	エネルギー線によるDNA損傷および活性酸素発生	抗酸化物質産生
可視光線	過剰な光合成により発生する活性酸素	抗酸化物質産生
温度	過剰なエネルギー産生により発生する活性酸素	抗酸化物質産生
塩	塩ストレスにより誘導される活性酸素	抗酸化物質産生
病原性微生物	病原体の産生する物質または酸素などによる生育阻害	抗菌性物質などの産生
食害（昆虫）	物理的損傷	殺虫、忌避成分の産生

スクリーニング法の確立

現行の抗腫瘍剤のほとんどが細胞の増殖、すなわち細胞分裂を阻害する薬剤である。一般的に腫瘍細胞は成長速度が速いため、抗腫瘍剤は活発に分裂している細胞を抑制（細胞増殖抑制）するよう設計されている。しかしながら、ある種の健康な細胞にも急速に細胞分裂するものがあり、このような正常細胞に与える影響が副作用として現れる。筆者らは、食材由来の抗腫瘍活性を検出するにあたり、新しい評価法の確立が重要であると考えた。すなわち、従来細胞増殖抑制活性ではなく、腫瘍細胞における何らかの特徴をターゲットとした、「腫瘍選択的細胞抑制活性（以下、選択的抑制活性）」を指標とした評価法を確立することで、新しい抗腫瘍活性物質が見出されると予想した。具体的には、細胞増殖速度が同程度の培養細胞を用い、腫瘍細胞のみに抑制効果を示す活性を選択的抑制活性として評価した。活性測定は、腫瘍細胞および正常細胞の培養液中に、食材の50%エタノール抽出物を添加し、24時間後の生存率を測定した（図1）。筆者らは2000-2002年にかけて、沖縄県工業技術センター、沖縄トロピカルテクノセンターの協力のもと、約150種の植物について選択的抑制活性のスクリーニングを行った。

このスクリーニングの結果、沖縄県において薬草茶として用いられている、サルカケミカン（方言名：サラカチ、サラカチャー、学名：*Toddalia asiatica Lam.*）抽出物中に、強い肺ガン選択的抑制活性を見出し、活性成分を単離した。次項に活性成分の構造および機能的特徴について報告する。

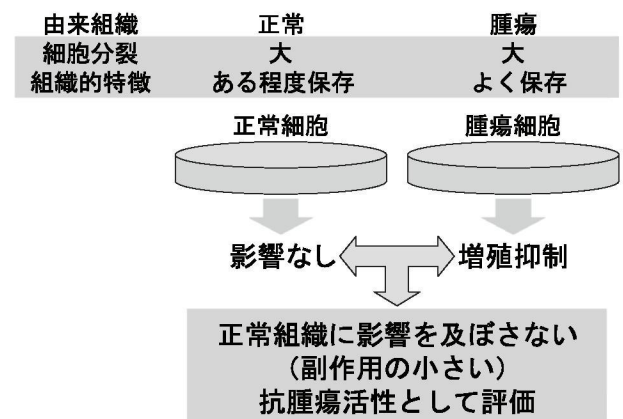


図1 腫瘍選択的細胞抑制活性測定法概念図

サルカケミカン由来選択的抑制活性物質

・ 活性物質の化学構造と選択的抑制活性

サルカケミカンから単離した選択的抑制活性物質はジヒドロニチジン (Dihydronitidine : DHN) と同定された (図2A)。DHNはヒト正常肺由来の細胞 (WI-38) と比較して、ヒト肺腺癌細胞 (A549) に対しては非常に強い選択的抑制活性を示し (図3)、その他のヒト培養細胞パネルにおいても、多くの腫瘍細胞に対して強い抑制効果を示した (表2)。これまでにDHNの生理活性は明らかにされていない

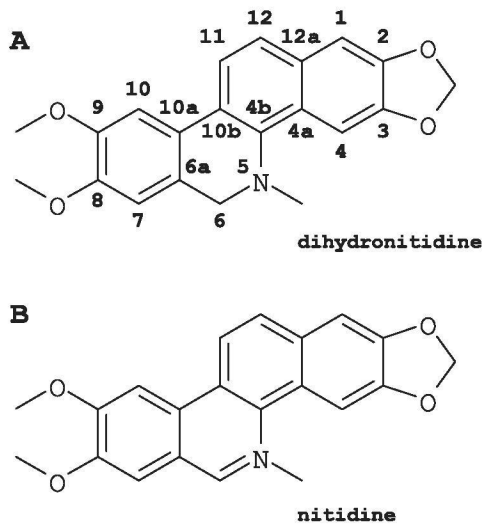


図2 腫瘍選択的細胞抑制物質の化学構造

A, ジヒドロニチジン、dihydranitidine : (1,3) Benzodioxolo(5,6-c) phenanthridine, 12,13-dihydro-2,3-dimethoxy-12-methyl-
B, ニチジン、nitidine : (1,3) Benzodioxolo(5,6-c) phenanthridinium, 2,3-dimethoxy-12-methyl-、(dihydranitidineとは6位の二重結合が異なる)

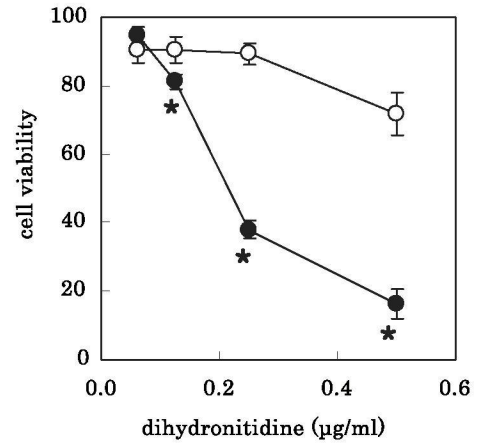


図3 ジヒドロニチジンの肺腺癌細胞選択的抑制活性
1x10⁴ cells/mlのヒト正常肺由来細胞WI-38 (○) および、ヒト肺腺癌由来細胞A549 (●) をジヒドロニチジンで24時間処理したのち、細胞生存率を測定。*p<0.05

表2 ジヒドロニチジンの様々な細胞に対する抑制活性の比較

由来	細胞株	D ₅₀ (µg/ml)
正常組織	WI-38 (肺繊維芽細胞)	55.11
	OUMS-36 (胎児繊維芽細胞)	41.13
	OUMS-36T-2F (胎児繊維芽細胞(不死化))	56.15
腫瘍組織	A549 (肺腺ガン)	0.19
	VMRC-LCP (肺扁平上皮ガン)	38.52
	COLO-201 (大腸ガン)	3.21
	MIA-PaCa2 (膵臓ガン)	2.38
	A431 (皮膚ガン)	1.95
	KATOIII (胃ガン)	4.60
SKBR-3 (乳ガン)	3.31	

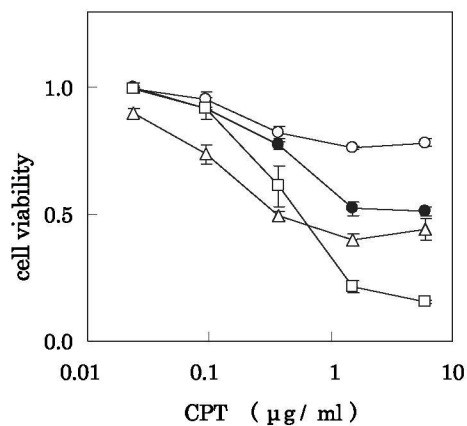
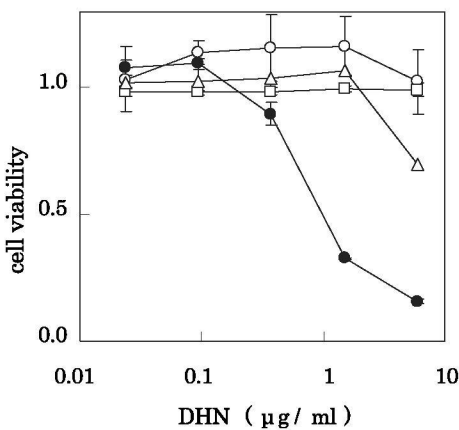


図4 ジヒドロニチジン、カンプトテシンの細胞抑制効果の比較

1x10⁴ cells/mlのヒト正常肺由来細胞WI-38 (○)、ヒト肺腺癌由来細胞A549 (●) および、ヒト肺扁平上皮癌由来細胞VMRC-LCP (□) を、ジヒドロニチジンまたはカンプトテシンで24時間処理したのち、細胞生存率を測定。ヒト正常肺由来細胞WI-38に関しては48時間処群 (△) も測定。

が、同じサラカチから単離されたDHNの類縁体であるニチジン (Nitidine : NTD) (図2B) に関しては多くの生理活性が報告されている。中でも、細胞分裂時のDNA複製に関与するDNAトポイソメラーゼI (TOPO-I) の阻害活性は、抗腫瘍剤としての応用が期待される活性である。しかしながら、TOPO-I阻害活性に関しては、カンプトテシン (Camptothecin : CPT) に代表されるより強力な活性を示す植物アルカロイドが発見されており、既に臨床への応用も行われている。また、この活性は細胞を分裂期で停止させることで細胞死を誘導するため、先に述べた増殖能の高い正常組織に対する副作用も強いことが知られている。図4にDHNとCPTのヒト肺由来正常細胞 (WI-38)、肺扁平上皮癌細胞 (VMRC-LCP)、肺腺癌細胞 (A549) に対する抗腫瘍効果を比較した結果を示した。各細胞の増殖速度はほぼ同程度であった。DHNは24時間処理において、A549細胞のみを特異的に抑制し、VMRC-LCP細胞には全く抑制効果を示さなかった。

また、48時間作用させた場合でもWI-38細胞に対する影響は小さかった。一方CPTはVMRC-LCP > A549 > WI-38の順に抑制効果を示したが、48時間後にはWI-38にも強い抑制が認められた。CPTの抑制効果は細胞増殖に依存しているため、いわば副作用に似た効果が観察されたと考えられる。これらの結果は、DHNの細胞抑制効果は肺腺癌A549細胞に特有の性質をターゲットとしていることを示している。そこで次に、DHNの肺腺癌選択性に関してこれまでに明らかになっている特徴を示す。

・活性物質の特性

DHNは蛍光物質であり、紫外線照射により黄緑色の蛍光を発することが判っている。この蛍光を利用して、細胞内のDHNの存在を視覚化することが出来る。図5Aに細胞内へのDHNの蓄積の様子を示した。DHNの蛍光強度を細胞間で比較すると、抑制効果の高い細胞 (A549) 内には強い蛍光が認められ、細胞内DHN蓄積量が高いことが示された。また、DHNの蓄積は細胞質中の微小器官内に局在

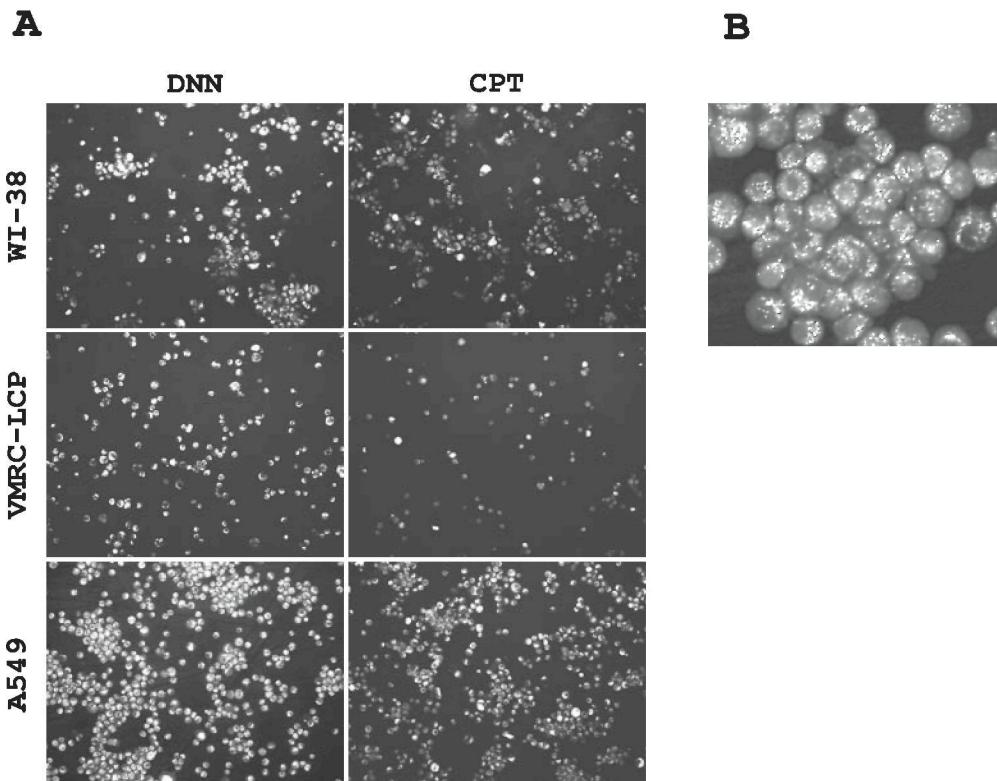


図5 ジヒドロニチジン、カンプトテシン処理細胞の蛍光顕微鏡観察
 A, 各細胞は250ng/mlのジヒドロニチジンまたはカンプトテシンで24時間処理したのち、蛍光顕微鏡で観察した (倍率: ×100)。
 B, ジヒドロニチジン処理したA549細胞の拡大画像。細胞内に粒子状に分布する蛍光が確認された (倍率: ×400)。

していることが明らかになった (図5B)。CPT も蛍光物質であることから同様の実験を行った結果、検出できる濃度の蓄積はいずれの細胞においても認められなかった。おそらく A549 細胞においては DHN が特異的に吸収されているか、または DHN 排出機構が欠落しているなどの理由が予想された。すなわちこれは、肺腺癌細胞には薬物輸送機構において、他の細胞と大きく異なる部分が存在しており、今回のスクリーニングの結果、この輸送機構の違いをターゲットとした細胞抑制物質として、DHN が見出されたと推測される。

まとめ

近年、沖縄県産食材が様々な方面で注目されている。そのひとつの理由として、素材に期待されている効果 (抗酸化、抗炎症作用など) が、温帯のものと比較して強いことが挙げられる。この強い生理活性の源は、亜熱帯植物の強力な自己防衛機構であり、沖縄県産植物性素材の優位性のひとつであるといえる。この植物性素材の中でも、食材由来の生理活性物質に筆者らは大きな期待を寄せている。その理由として、安全性が既に確認されているという点と、摂取の簡易性が挙げられる。食材であれば毎日恒常的に摂取可能であることから、予防医学的效果も期待できる。また、沖縄においては独特の食材が多く、今後の研究が進むことで、様々な新しい生理活性物質が明らかになることが予想される。

新しい生理活性を見出す上で、素材に並んで重要なのが活性評価法である。これは既知の生理活性を評価する、いわゆる活性測定法ではなく、新たな生理活性の価値を見出すための評価基準の設定を指す。今回の報告では、副作用の小さい新しい抗腫瘍活性を見出すために、細胞増殖速度が同程度の正常細胞、および腫瘍細胞を用いることで、腫瘍細胞に存在する、未知の特徴をターゲットとした抑制効果を見出すことに成功した。今後、同様のスクリーニングを続けていくことで、様々な腫瘍選択的細胞抑制物質が見出されると同時に、そのターゲットとなる因子が明らかになると考えられる。このような、“機能性物質—ターゲット”という情報をデータベース化することで、将来的には患者の腫瘍のタイプに合わせて、副作用の小さい薬剤を選択するといった治療プログラムが構築されることを期待している。

活性評価の方法論は、化学的、酵素化学的、生化学的、生理学的方法など多岐にわたっている。新しい活性評価法を用いることで、新たな物質が見出される可能性はもちろん、既に活性が明らかになっている物質であっても、その輸送性や代謝経路の違いにより、新たな効果が見出される可能性は十分にあると考えられる。

要約

沖縄県は亜熱帯性の気候に属し、その強い環境ストレスから、植物の生体防御物質は温帯のものより豊富であることが知られている。これらの植物群を長く食材として利用してきた沖縄県民は、何らかの影響を受けていると考えられる。筆者らは沖縄における低発ガン率に注目し、食品性の抗腫瘍活性のスクリーニングを行った。特に、細胞増殖速度に依存しない抗腫瘍活性、「腫瘍選択的細胞抑制活性」についてスクリーニングを行った結果、沖縄県において特徴的に用いられている薬草茶であるサルカケミカン (*Toddalia asiatica* Lam.) に強い活性を見出した。単離された活性物質はジヒドロニチジン (Dihydroneitidine : DHN) と同定された。DHN の抗腫瘍活性は既に示唆されていたが、今回の報告ではこれまでの活性だけでは説明できない抗腫瘍効果が示された。この DHN の選択的抑制活性は腫瘍細胞に特異的な物質輸送経路に依存していることが示唆された。今回示した腫瘍選択的細胞抑制活性は、特定の腫瘍細胞のみをターゲットとする新たな抗腫瘍剤の検索に貢献できると考えられた。

参考文献

- 1) Yokota Takao, Ishizu Hiroshi, Takaesu Natsuko, Akamine Yoriko, Kakinohana Shige, Sawada Shigenobu, Feng Yu, Moriyama Koji. Factors correlated with the Mental Health of the Elderly People living in the Okinawan Traditional Community (Symposium : Psychosomatic Medicine towards Health Promotion). Japanese Journal of Psychosomatic Medicine Vol.44, No.9 pp. 681-687 (2004)

- 2) Mizushima S, Moriguchi E, Nakada Y, Gonzales Biosca M, Nara Y, Murakami K, Horie R, Moriguchi Y, Mimura G and Yamori Y. The relationship of dietary factors to cardiovascular diseases among Japanese in Okinawa and Japanese immigrants, originally from Okinawa, in Brazil. *Hypertens Res.* 15, 45-55 (1992)
- 3) Mizushima S, Moriguchi E, Ishikawa P, Hekman P, Nara Y, Mimura G, Moriguchi Y and Yamori Y. Fish intake and cardiovascular risk among middle-aged Japanese in Japan and Brazil. *J Cardiovascular Risk.* 4, 191-199 (1997)
- 4) 厚生労働省統計情報、都道府県別にみた死亡の状況—平成12年都道府県別年齢調整死亡率の概況—
- 5) Wang G, Lemos JR, Iadecola C. Herbal alkaloid tetrandrine: from an ion channel blocker to inhibitor of tumor proliferation. *Trends Pharmacol Sci.* Mar 25(3) 120-3 (2004)
- 6) Kupchan SM, Yang TH, Vasilikiotis GS, Barnes MH, King ML. Tumor inhibitors. XLII. Thalidasine, a novel bisbenzylisoquinoline alkaloid tumor inhibitor from *Thalictrum dasycarpum*. *J Org Chem.* Dec 34(12) 3884-8 (1969)
- 7) Warthen D, Gooden EL, Jacobson M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. *J Pharm Sci.* May 58(5) 637-8 (1969)
- 8) Adamovics JA, Hutchinson CR. Prodrug analogues of the antitumor alkaloid camptothecin. *J Med Chem.* Mar 22(3) 310-4 (1979)
- 9) Shinkai T, Arioka H, Kunikane H, Eguchi K, Sasaki Y, Tamura T, Ohe Y, Oshita F, Nishio M, Karato A, et al. Phase I clinical trial of irinotecan (CPT-11), 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin, and cisplatin in combination with fixed dose of vindesine in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* May 15 54(10) 2636-42 (1994)