

令和元年5月14日現在

機関番号：16201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06914

研究課題名(和文) ジャトロファ種子に含まれるカテコール型リグナン・ネオリグナンの抗癌活性

研究課題名(英文) The anticancer activity of catechol-typed lignan and neolignan in Jatropha seeds

研究代表者

片木 絢子 (Katagi, Ayako)

香川大学・医学部・研究員

研究者番号：30799458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱脂ジャトロファ種子のEtOAcとMeOH有機抽出物と水抽出物は肝細胞と乳癌細胞の増殖阻害をし、イソアメカノールAは、癌細胞ごとにそれぞれ違った増殖阻害をすることも明らかとなった。イソアメカノールAは、正常細胞(MCF-10A)より乳癌細胞(MCF-7)を $25.9 \pm 6.14\%$ も増殖を阻害し、MCF-7増殖阻害はモノポーラースピンドル形成によるM細胞周期停止によることを明らかとした。イソアメカノールA処理で頸癌細胞(HeLa)ではG1アレストで細胞増殖抑制が誘導された。また、Protein Kinase C betaの発現増加が見られ、種子に含まれるホルボルエステル働き抑制が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱帯、亜熱帯を中心に育つジャトロファ種子は油が豊富であり、二酸化酸素の排出の少ない次世代燃料としての注目がある。また同時にジャトロファは古くから伝わる民間薬としての利用があるため、脱脂種子廃棄物の医療への利用、そして新たな抗癌剤の開発は経済的にも重要な試みである。

研究成果の概要(英文)：The organic and water extracts of EtOAc and MeOH obtained from defatted jatropha seeds have been shown to inhibit the growth of hepatocytes and breast cancer cells. In addition, it became clear that isoamecanol A has different rates for inhibition on each cancer cell type. Isoamecanol A inhibited human breast cancer cell growth by $25.9 \pm 6.14\%$ ($n = 4$, $p < 0.05$) than normal human breast cells. Furthermore, it was revealed that the inhibition of breast cancer cell growth is due to monopolar spindle formation, which leads to M stage of the cell cycle arrest. The cell growth inhibition was induced in HeLa cells due to G1 arrest by isoamecanol A treatment. In addition, it was suggested that the treatment increases the expression of protein kinase C beta, which suppresses the function of phorbol ester contained in seeds.

研究分野：バイオマス化学

キーワード：ジャトロファ ネオリグナン イソアメリカノールA MCF-7 MCF-10A モノポーラースピンドル形成
HeLa Protein kinase C beta

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジャトロファはホルボールエステルなどの発癌物質を含むため、食料と競合しないバイオディーゼル燃料用植物として期待されている油糧植物である。ホルボールエステルは、プロテインキナーゼCなどの様々なタンパク質を活性化することから、ジャトロファ自身においても少なからず有害な作用があると予想されるが、その制御機構については全く明らかにされていない。一方で、この種子に高い抗酸化活性を有するカテコール型リグナン・ネオリグナン類の存在が明らかにされた。高等植物におけるカテコール型リグナンの報告は少ないことから、このカテコール型リグナン類がホルボールエステルの発癌制御に何らかの関与をしている可能性が示唆されている。本研究では、ジャトロファに含まれるイソアメリカノールAの抗癌活性を調べるとともに、さらなる抗癌作用のメカニズムの解明を目的とした。

2. 研究の目的

ジャトロファ搾油カスの酢酸エチル抽出区画とメタノール抽出区画のそれぞれの水層と有機層での抗癌作用を調べる。特にメタノール抽出区画の有機層から発見された高い抗酸化活性を保持するイソアメリカノールAのヒト乳癌細胞(MCF-7)での作用を明らかとする。正常細胞である乳腺細胞(MCF-10A)との増殖抑制効果を比較し、イソアメリカノールAの癌細胞での特異的増殖抑制効果を確かめる。さらにイソアメリカノールAのヒト頸癌細胞(HeLa)での効果についても検証する。

3. 研究の方法

➤ 脱脂ジャトロファ種子より抽出物の搾取、またそれらの抗癌活性の評価

(1) 脱脂ジャトロファ種子からのソックスレー法による画分分離

ジャトロファ種子からの分離・精製を行う。ジャトロファ種子は、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン、酢酸エチル、メタノールによる逐次抽出を行った。メタノール抽出画分は、二層分配し、各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行った。

(2) イソアメリカノールAの化学合成

カフェ酸エチルを無水THF中でDIBAL-Hによって還元し、カフェイルアルコールを得た。これをアセトン-トルエン中で炭酸銀により脱水素重合させ、イソアメリカノールAを得た。

(3) 酢酸エチル抽出やメタノール抽出画分、イソアメリカノールAの抗癌活性

ジャトロファ種子は、ソックスレー抽出器を用いて、ヘキサン、酢酸エチル、メタノールによる逐次抽出を行った。酢酸エチル抽出画分(EtOAc)とメタノール抽出画分(MeOH)は、水層(water)と有機層(organic)の二層分配しを同様の方法にてヒト肝癌細胞(HuH-7)、ヒト乳癌細胞(MCF-7)、またイソアメリカノールAではHuH-7、MCF-7以外にヒト子宮頸癌(HeLa)の増殖抑制効果について検証し、増殖抑制効果を、cell counting kit (wako)を用いて検証した。

➤ イソアメリカノールAによるヒト乳癌(MCF-7)への細胞増殖抑制メカニズムの解明

(1) 正常細胞との増殖抑制作用比較

ヒト乳腺細胞(MCF-10A)を利用することによってイソアメリカノールAの増殖抑制効果が癌細胞選択性であるかを確かめた。コントロール(0.1%DMSO)と300 μ MイソアメリカノールAのMCF-7とMCF-10Aでの三日間の増殖抑制効果をcell counting kitを用いて検証した。

(2) 免疫染色法によるイソアメリカノールAのMCF-7への影響

イソアメリカノールAを添加5~8時間後のM期の細胞を固定、オーロラキナーゼ(赤)、染色体(青)、微小管(緑)と3重染色を行った後、Confocal microscopeで観察し、写真を撮った。

➤ イソアメリカノールAによるヒト子宮頸癌(HeLa)の細胞増殖抑制メカニズムの解明

(1) フローサイトメトリー

75 μ Mまたは150 μ MのイソアメリカノールA添加あり、もしくはなしの3日後の細胞を集めフローサイトメトリー解析を行った。

(2) マイクロアレイ解析

フローサイトメトリー解析同様、イソアメリカノールAで処理、及びコントロールのHeLa細胞を回収し、GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array (Filgen Inc.)を使用してマイクロアレイ解析を行った。またMicroarray Data Analysis Toolで分析を行った。

4. 研究成果

- 脱脂ジャトロファ種子からの4画分の分離、イソアメリカノールAの作成とまたそれらの抗癌活性の評価

ジャトロファ種子をソックスレー抽出器を使用して、種子から抽出するために3つの異なる溶媒を使用した。n-ヘキサン抽出により脱脂した後、種子をEtOAcおよびMeOHで連続的に抽出した。それらの抽出物を、EtOAcおよび水によって有機画分と水画分にさらに分配した[二層分配]。それぞれの画分で採取された全収穫量は図1に示す。また、(EtOAc-water, EtOAc-organic, MeOH-water, MeOH-organic) と、合成イソアメリカノールAでの抗癌作用を3日間調べた(図2 & 3)。

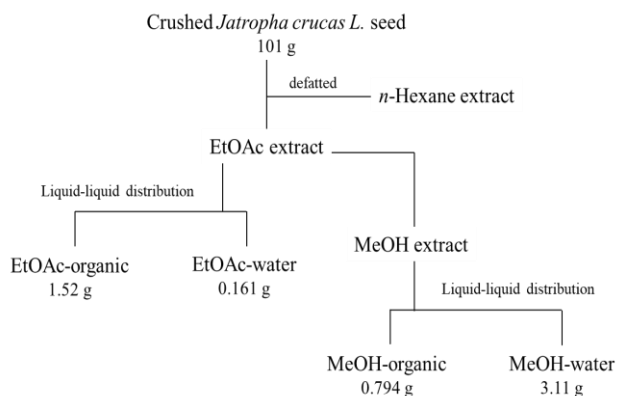


図1: 破碎したジャトロファ種子の分別工程

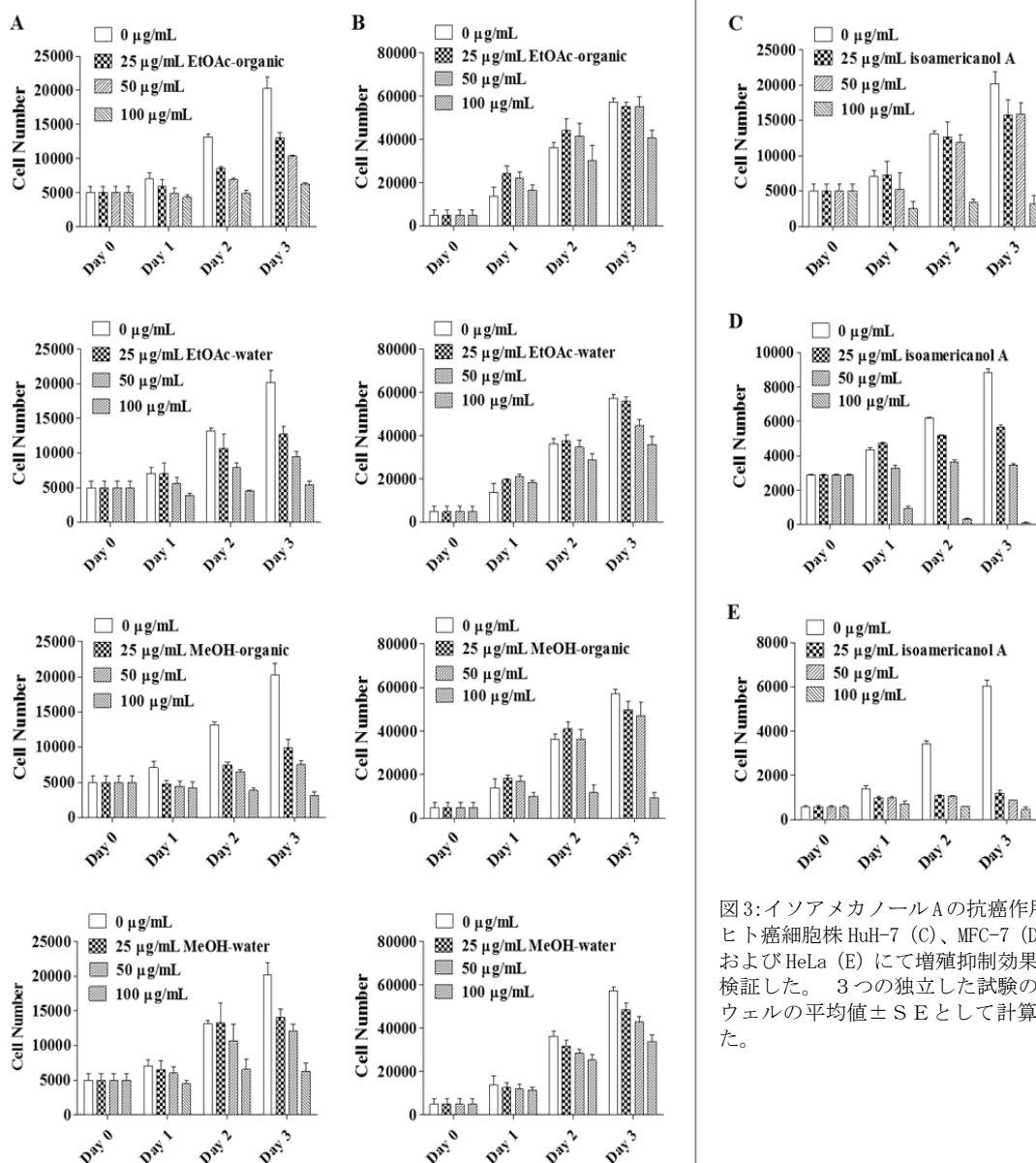


図2: ジャトロファ種子の4画分の抗癌特性。ヒト癌細胞株HuH-7 (A、左の列) およびMFC-7 (B、右の列) を使用して、EtOAc および MeOH 抽出物の有機画分および水画分の効果を調べた。細胞数は、3つの独立した試験の4つのウェルの平均値±SEとして計算した。

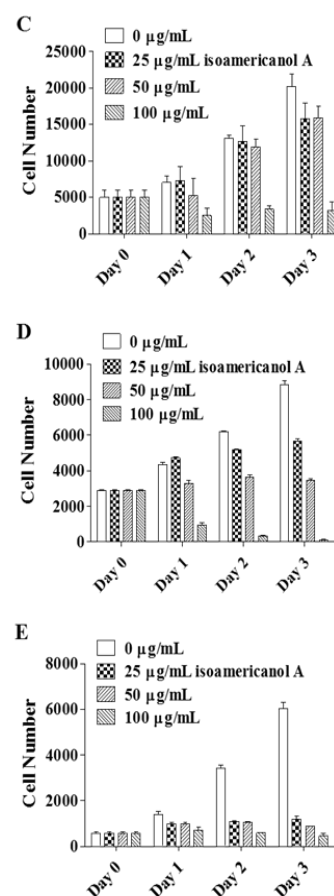


図3: イソアメリカノールAの抗癌作用。ヒト癌細胞株HuH-7 (C)、MFC-7 (D)、およびHeLa (E) にて増殖抑制効果を検証した。3つの独立した試験の4ウェルの平均値±SEとして計算した。

イソアメリカノールAは、他のヒト癌細胞株と同程度にはHuH-7の増殖に対して阻害を示さなかったが、それでもある程度の抑制には影響を及ぼした。HeLa細胞は、3日間の治療期間後に最も少量のイソアメリカノールAによって最も有意に阻害された。一方、MCF-7の増殖は最高投与量で最も抑制され、イソアメリカノールAの成分とともに、ジャトロファの種子残渣の成分を同定し、それらの独自の機能を分析し続けることが今後必要である。

➤ イソアメリカノールAによるMCF-7の細胞増殖抑制メカニズムの解明

(1) 正常細胞との増殖抑制作用比較

正常なヒト乳腺上皮細胞のMCF-10A細胞と癌のMCF-7細胞でイソアメリカノールAの増殖抑制効果を比較した。

イソアメリカノールAによって約17%の増殖抑制が正常細胞に起こるのに対し、癌細胞ではイソアメリカノールA添加によって約43%もの増殖抑制効果が認められた。よってイソアメリカノールAは癌細胞に特有の増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

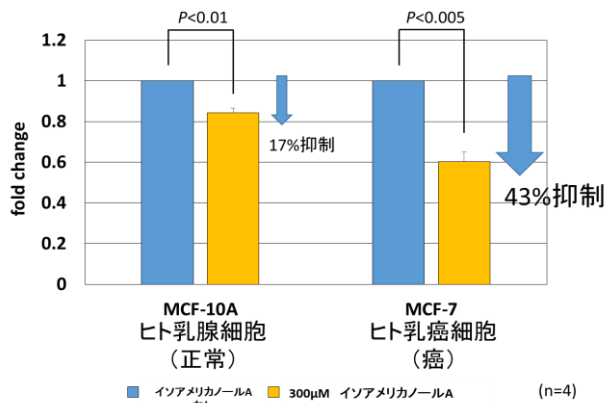


図 4: イソアメリカノールAのMCF-10AとMCF-7に対する抗癌作用

(2) 免疫染色法によるイソアメリカノールAのMCF-7の細胞分裂M期での阻害

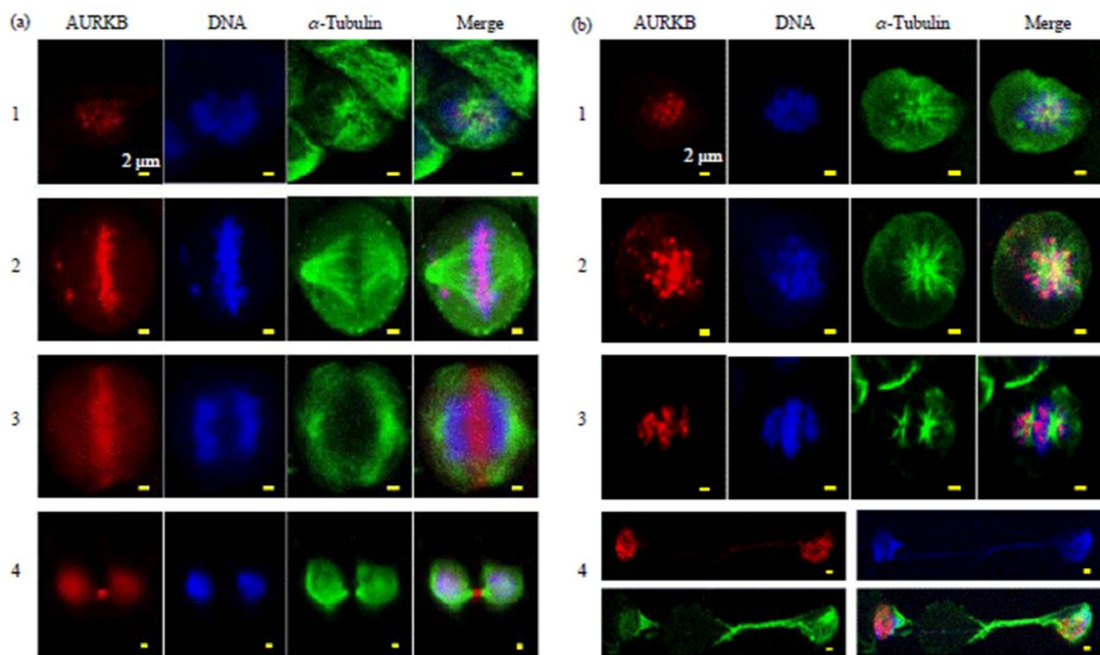


図 5 (a-b): イソアメリカノールAによるMCF-7のモノポーラー形成 (a) 未処理および (b) イソアメリカノールAを有するMCF-7の形態を細胞分裂の段階によって比較した: (1) 前相、(2) 中期、(3) 後期および (4) 終期

これまでの実験ではG2期なのかM期なのかを判断することは困難だったため、染色をして見極める必要があった。コントロールとイソアメリカノールAで処理した細胞を比べると前期にはあまり目立った変化がなかったものの、中期に入ってくると差が見られ始めた(図5)。コントロールではオーロラキナーゼや染色体が赤道板に正しく並び、中心体両極に位置し、正しい紡錘体(バイポーラースピンドル)が形成された。一方、イソアメリカノールA処理によって中心体が一部に集まり、オーロラキナーゼや染色体も固まって一部に位置するのでモノポーラースピンドル構造を形成した。よって、イソアメリカノールA処理によってM期で正常な紡錘体形成が阻害されることが明らかとなった。

➤ イソアメリカノール A によるヒト子宮頸癌 (HeLa) の細胞増殖抑制メカニズムの解明
 (1) フローサイトメトリー
 これまでの実験でイソアメリカノール A は HeLa 細胞の増殖抑制をすることが明らかとなった。1%DMSO をコントロールとし、25 μ g/mL イソアメリカノール A と 100 μ g/mL イソアメリカノール A で 3 日間 HeLa 細胞で処理したところ、細胞周期 G1 アレストを誘導することが今回明らかとなった。

(2) マイクロアレイ解析

細胞増殖の実験の結果より、低濃度の 75 μ M (25 μ g/mL) と高濃度 300 μ M (100 μ g/mL) のイソアメリカノール A を選びそれぞれを 1%DMSO のコントロールで比較した。添加 3 日後の HeLa 細胞でマイクロアレーを行ったところ、25 μ g/mL のイソアメリカノール A 添加によって PRKCB の発現減少が観測された。この結果はジャトロファ種子が保持する発癌プロモーター 12-deoxyl-16-hydroxyphorbol (ホルボールエステル) の働きを弱めていることが示唆された。発癌性の高いホルボールエステルと抗癌作用を持つイソアメリカノール A の相異なる作用がジャトロファ種子で共存が可能なのは、お互いに作用し合っている可能性が考えられる。
 また、100 μ g/mL イソアメリカノール A 添加によって PPP1R13B 発現の増加はアポトーシス誘導が示唆された。

Table 1: イソアメリカノール A による HeLa 細胞での遺伝子発現変化

1%DMSO vs 25 μ g/mL isoamericanol A (detected 1281genes)				
	gene name		fold change	description
	cell cycle			
	RGCC	Regulator Of Cell Cycle	-2.85	
cyclin	CCND1	Cyclin-D1	2.99	a cell growth regulator that controls cell cycle G1 progression
	CCNO	Cyclin O	2.32	cell cycle G1/S transition
	CCNE1	Cyclin E1	-2.26	
cdk	Inc-CDKN1B-1	Long non-coding cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	-2.14	enhances CDK1 activity
	CDKN2C	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C	-3.62	required for cell cycle G1/S transition
	kinase (33)			
	PRKCB	protein kinase C beta	-4.24	serve as major receptors for phorbol esters, a class of tumor promoters
1%DMSO vs 100 μ g/mL isoamericanol A (detected 1208genes)				
	apoptosis			
	PPP1R13B	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 13B	86.0	Apoptosis-stimulating of p53 protein 1
oxidase	NOX4	NADPH Oxidase 4	7.81	may play a role in apoptosis
	PXDN	Peroxidasin	2.33	
	ACOX1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1	2.29	
	cell cycle			
cyclin	CDKL2	Cyclin Dependent Kinase Like 2	2.31	CDC2-related serine/threonine protein kinases
cdk	CDK2AP2	Cyclin Dependent Kinase 2 Associated Protein 2	-2.27	inhibits cell cycle G1/S phase transition by repressing CDK2 expression and activation
	CCND1	Cyclin D1	4.75	required for cell cycle G1/S transition
	CDK9	Cyclin-dependent kinase 9	2.57	regulates transcription by phosphorylating RNA polymerase II
	CDK2AP2	Cyclin Dependent Kinase 2 Associated Protein 2	-2.27	inhibits cell cycle G1/S phase transition by repressing CDK2 expression and activation
	CCNT2	Cyclin T2	-2.85	interact with CDK9
0.1%DMSO vs 300 μ M isoamericanol A (detected 196 genes)				
	apoptosis			
	BCL2L11	BCL2 Like 11	7.26	apoptosis facilitator
	cell cycle			
cyclin	CCNL2	Cyclin L2	5.77	a regulator of the pre-mRNA splicing process, and inducing apoptosis

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Katagi A, Sui L, Kamitori K, Suzuki T, Katayama T, Dong Y, Nakagawa T, Yube K, Hossain A, Yamaguchi F, Tokuda M. (2019) Monopolar spindle induced by isoamericanol A suppresses human breast cancer cell (MCF-7) growth. *Asian Journal of Cell Biology*, 14: 1-6.

Suzuki T, Kato T, **Katagi A**, Katayama T. (2018) Antioxidative catechol lignins/neolignans isolated from defatted seed of Tung tree. *Journal of the Forest Biomass Utilization Society*, 13(2):47-51.

Katagi A, Sui L, Kamitori K, Suzuki T, Katayama T, Hossain A, Noguchi C, Dong Y, Yamaguchi F, Tokuda M. (2017) High anticancer properties of defatted *Jatropha curcas* seed residue and its active compound, isoamericanol A. *Natural Product Communications*, 12(12):1881-1885.

[学会発表] (計 4 件)

Katagi A, Sui L, Kamitori K, Suzuki T, Katayama T, Dong Y, Nakagawa T, Yube K, Hossain A, Yamaguchi F, Tokuda M. High Anticancer Properties of Defatted *Jatropha Curcas* Seed Residue and its Active Compound, Isoamericanol A. 2018 SWST/JWRS International Convention in Nagoya; Nagoya, Japan, November 5-9, 2018. Oral presentation.

鈴木利貞、松山恵、加藤哲明、片木絢子、片山武士 シナアブラギリ種子油のバイオディーゼル燃料利用と抗酸化活性成分の探索 樹木抽出成分討論会 2018

Katagi A, Sui L, Kamitori K, Suzuki T, Katayama T, Hossain A, Noguchi C, Dong Y, Yamaguchi F, Tokuda M. Isoamericanol A from *Jatropha curcas* seed extract inhibits human breast cancer cell (MCF-7) proliferation by disrupting spindle formation at metaphase. The 68th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Kyoto; Kyoto, Japan, March 14-16, 2018. Oral presentation.

Katagi A, Pujirahayu N, Suzuki T, Katayama T. Antioxidant activity and content analysis of Ehime citrus juice. The 29th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society for Chugoku and Shikoku area; Hiroshima, Japan, September 11-12, 2017. Poster Presentation (best poster award).

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：

片木 絢子 (研究者代表)：実験の実地と総括

片山 健至 (協力研究者)：カテコール型リグナン、ネオリグナンの化学合成

鈴木 利貞 (協力研究者)：カテコール型リグナン、ネオリグナンの化学合成

徳田 雅明 (協力研究者)：抗癌活性のメカニズム解析

神鳥 和代 (協力研究者)：抗癌活性のメカニズム解析

ローマ字氏名：

Ayako Katagi

Takeshi Katayama

Toshisada Suzuki

Masaaki Tokuda

Kazuyo Kamitori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。