

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18904

研究課題名(和文)がん転移・再発予防を指向した「柿蒂」のアジュバント療法への利活用に関する基礎研究

研究課題名(英文) Research of Shiteito and the ingredients for utilizing against cancer recurrence and cancer metastasis

研究代表者

好村 守生 (YOSHIMURA, Morio)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：80454891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：柿蒂湯は柿蒂、丁子、生姜で構成され、難治性の吃逆に対症療法として用いられる。柿蒂は成分の報告に乏しいため、精査を行った結果、1種の新規化合物を含む29種の化合物を単離した。また、柿蒂湯の主要成分を同定するとともに柿蒂湯には柿蒂由来の縮合型タンニンが豊富に含まれることを明らかにした。また、柿蒂湯、柿蒂湯の主要成分、柿蒂の抽出物及び分画物について、各種ヒト由来がん細胞種(Caco-2, Hep3B, A549, AGS)に対する細胞増殖抑制活性を行った。その結果、細胞種によって活性は異なるが、各細胞に対していずれかの試料が有意な活性を示したことから、柿蒂湯はがん転移の予防に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Shiteito is composed of 3 crude drugs (Shitei, Ginger, and Clove) and the decoction is used for treatment of chronic hiccough. The ingredients of Shitei of the high polar compounds were not reported thus we examined the ingredients and isolated 29 compounds including a new low-molecular phenolic. The main four-ingredients of Shiteito decoction were identified as gallic acid, ellagic acid, biflorin, and isobiflorin, which were derived from Clove, and the presence of condensed tannin was identified by ¹³C-NMR. The growth-inhibitory activity against human-derived cell lines (Caco-2, Hep3B, A549, AGS) of samples (Shiteito, main four-ingredients of Shiteito, and Shitei extracts) was examined, and one or another sample exhibit growth-inhibitory activity for cell lines with or without cytotoxicity. The result indicated that the Shiteito would contribute to anti-cancer recurrence and anti-cancer metastasis for low-risk combination use with anticancer drugs.

研究分野：生薬, 天然物化学

キーワード：柿蒂 ポリフェノール 縮合型タンニン 細胞増殖抑制活性

1. 研究開始当初の背景

(1) 柿蒂湯は抗がん剤治療の副作用による難治性の吃逆に対症療法として用いられる処方である。吃逆は基本的に一過性の疾患であるため重大な病態と認識されることは少ないが、稀に持続性吃逆(48時間~1ヶ月)や難治性吃逆(1ヶ月以上)が認められ、それらは睡眠障害、食欲不振による体力の消耗など治療の大きな妨げとなる。一方、柿蒂湯の構成生薬(柿蒂、生姜、丁子)のうち、丁子に含まれる加水分解性タンニンには宿主介在性抗腫瘍活性が、柿蒂の既知成分である oleanolic acid や ursolic acid には結腸直腸がんの増殖抑制作用が報告されていることから、柿蒂湯には抗腫瘍活性または腫瘍の増殖抑制活性が期待される。

(2) 柿蒂湯の構成生薬のうち、丁子 (*Syzygium aromaticum*: 薑) および生姜 (*Zingiber officinale*: 根茎) については複数の研究者によって含有成分、およびそれらの生物活性が報告されている。一方、柿蒂 (*Diospyros kaki*: 蒂) についてはトリテルペノイドやフラボノイド、低分子フェノール類が知られているものの、それ以外の高極性成分、特にタンニンの詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 柿蒂湯の構成生薬のうち、成分の詳細、特に縮合型タンニンおよび関連化合物の詳細が十分に明らかにされていない柿蒂について精査を行うことで、柿蒂湯の科学を理解するための基礎的データに資することを目的とする。

(2) 柿蒂湯の構成生薬のうち、丁子および柿蒂の既知成分には抗腫瘍活性などが報告されていることから、柿蒂湯にも同様の生物活性が期待される。そのため、柿蒂湯および柿蒂湯の主要成分を用いて各種がん細胞に対する細胞増殖抑制活性を検討することで、付加価値としてのがん転移予防効果を模索する。柿蒂湯は抗がん剤との併用に際して薬物相互作用や副作用は報告されていないことから、既に臨床で使用実績のある柿蒂湯にがん転移予防効果を見出すことは、理想的な育薬になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 柿蒂の高極性成分、特に縮合型タンニンおよび関連化合物の分離、精製、構造解析を行うことで柿蒂の成分構成の詳細を明らかにし、柿蒂湯の科学を理解する足がかりとする。さらに、分離、分画を行うことで得られる縮合型タンニン画分について、化学反応および ¹³C-NMR スペクトル解析を行うことでその詳細を明らかにする。加えて、生物活性評価に供するに十分な量の化合物を成分精査で得る。

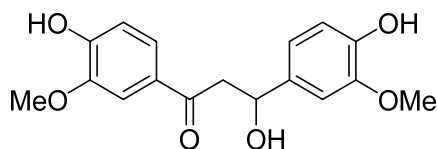
(2) 成分精査で得た各成分および柿蒂湯(煎液、エキス製剤)について、各種がん細胞(Caco-2: ヒト結腸がん由来細胞, Hep3B: ヒト肝がん由来細胞, A549: ヒト肺がん由来細胞, AGS: ヒト胃腺がん由来細胞)に対する細胞増殖抑制活性を検討する。評価法としては、生細胞測定を生細胞数測定試薬 SF (nacalai tesque) で、死細胞数を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo Molecular Technologies, Inc.) を用いて測定し、得られた結果を blank と比較することで考察する。

4. 研究成果

(1) 柿蒂の成分精査

当初の研究目的では、柿蒂の熱水抽出物を用いて成分精査を行う予定であったが、熱水抽出で得られる化合物の収量に乏しく、活性評価の遂行に十分な量的確保が困難であったため、柿蒂を 70%アセトンで抽出を行い、得られた化合物を標準品として HPLC による直接比較によって柿蒂の熱水抽出物の成分同定を行うこととした。柿蒂の 70%アセトン抽出物について *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配し、得られた各分画物の HPLC 分析を行った。その結果、水分画物では顕著なピークを認めず、山なりのバックグラウンドが観察されたことから、その主要成分は縮合型タンニンであることが明らかになった。同様のバックグラウンドは *n*-ブタノール分画物にも観察されたため、これらの画分に縮合型タンニンが分画されることが明らかになった。また、酢酸エチルおよび *n*-ブタノール分画物の成分精査を行った結果、4 種の低分子フェノール類 [gallic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, 3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid], 7 種のフェニルプロパノイド [*trans-p*-coumaric acid, *cis-p*-coumaric acid, scopoletin, dehydroconiferyl alcohol, 2,3-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanone, 1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2-[4''-(3-hydroxypropyl)-2'',6''-dimethoxyphenoxy]propane-1,3-diol, 2-*O*-[4'-(3-hydroxypropyl)-2'-methoxyphenyl]-1-*O*-glucosylglycerol], 15 種のフラボノイド [aromadendrin, taxifolin, ampelopsin, quercetin, kaempferol, naringenin, catechin, gallocatechin, kaempferol 3-*O*-glucoside, kaempferol 3-*O*-galactoside, kaempferol 3-*O*-glucoside-2''-*O*-gallate, kaempferol 3-*O*-galactoside-2''-*O*-gallate, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-galactoside, quercetin 3-*O*-glucoside-2''-*O*-gallate], 2 種の縮合型タンニン [procyanidin B1, procyanidin B3] の計 28 種の化合物を単離するとともに、文献未記載の化合物である 3-hydroxy-1,3-di-(4-hydroxy-3-methoxyph

enyl)-1-propanone を単離し，その構造を明らかにした．



3-hydroxy-1,3-di-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanone

これらの情報を基に，柿蒂の熱水抽出物の HPLC 分析を行った結果，その主要成分は山なりのバックグラウンドとして観察された縮合型タンニンであることが明らかになった．他に，gallic acid, vanillic acid, *trans-p*-coumaric acid の存在を標品との直接比較から同定した．さらに，柿蒂の 70%アセトン抽出物の ¹³C-NMR 長時間測定を行った結果，catechin に対応するケミカルシフトにブロードのシグナルを観察したことから，縮合型タンニンの存在を確認した．また，同画分のチオール分解後，分解物を catechin 類のチオール付加物と HPLC 直接比較を行った結果，縮合型タンニンの構成は B 環カテコールタイプとピロガロールタイプが約 2 : 1 の比率であると示された．加えて，同画分の GPC 分析を行った結果，その平均分子量は 30,482 と算出されたことから，柿蒂には高度に重合した縮合型タンニンが存在していることが明らかになった．

(2) 柿蒂湯の主要成分解析

柿蒂湯（煎液，エキス製剤）に含まれる成分を，柿蒂，生姜，丁子の各熱水抽出物と HPLC 分析で比較した結果，柿蒂湯で検出された主要なピークはすべて丁子の熱水抽出物に由来することが明らかになった．そのため，丁子の熱水抽出物の成分精査を行い，主要成分の単離，構造解析を実施した．それら標準品と柿蒂湯との HPLC 成分比較を行った結果，柿蒂湯の主要成分は gallic acid, ellagic acid, biflorin, isobiflorin であることが明らかになった．なお，柿蒂湯煎液と柿蒂湯エキス製剤では両者ともこれらの化合物を主要成分として認められたが，柿蒂湯エキス製剤には柿蒂湯煎液に認められた eugenol を検出しなかった．このことは，eugenol が揮発性成分であるため，顆粒剤の製造過程で揮散したものと考えられる．

(3) がん細胞に対する増殖抑制活性の評価

柿蒂湯（煎液，エキス製剤），柿蒂湯の主要成分（gallic acid, ellagic acid, biflorin, isobiflorin），柿蒂の 70%アセトン抽出物および各分画物（*n*-ヘキサン分画物，酢酸エチル分画物，*n*-ブタノール分画物，水分画物）について，各種ヒト由来がん細胞種（Caco-2：ヒト結腸がん由来細胞，Hep3B：ヒト肝がん由来細胞，A549：ヒト肺がん由来

細胞，AGS：ヒト胃腺がん由来細胞）に対する細胞増殖抑制活性を検討した．なお，*n*-ブタノール分画物および水分画物は縮合型タンニンを豊富に含む画分である．また，同時にヒト正常腸上皮細胞である InEpC（Lonza）に対する細胞増殖抑制活性を行い，結果を比較する予定であったが，培養に必須な添加因子（SmGM™-2 SingleQuots™ 添加因子セット）の製造が休止されており，年度内の検討を行うことができなかった．評価法としては，生細胞測定を生細胞数測定試薬 SF（nacalaitesque）で，死細胞数を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST（Dojindo Molecular Technologies, Inc.）を用いて測定し，得られた結果を blank と比較した．なお，各化合物は終濃度 12.5, 25, 50, 100 μM，柿蒂湯（煎液，エキス製剤），柿蒂抽出物および各種分画物は終濃度 12.5, 25, 50, 100 μg/mL で評価を行い，ポジティブコントロールとしてカンプトテシンを用いた．以下の結果において，括弧内の%は blank を 100%とした際の相対値を示す．

Caco-2 細胞（ヒト結腸がん由来細胞）では，gallic acid（100 μM, 95%），biflorin（100 μM, 94.4%），isobiflorin（100 μM, 94.2%）で有意（*p*<0.05）な生細胞数の減少を認め，LDH assay における LDH 量の有意な増加を認めなかったことから，弱いながら細胞増殖抑制活性があることが示唆された．また，同細胞において柿蒂の酢酸エチル分画物は 12.5 ~ 100 μg/mL において濃度依存的に有意（*p*<0.01）な生細胞数の減少（91.4%, 77.7%, 70.9%, 55.7%）を認められたが，100 μg/mL では培養上清中の LDH 量が blank と比較して有意に（*p*<0.01）増加（139.0%）した．このことから，柿蒂の酢酸エチル分画物は 12.5 ~ 50 μg/mL では細胞増殖抑制活性が，100 μg/mL では細胞毒性が認められると判断した．一方，柿蒂湯（煎液）および柿蒂湯エキス製剤では生細胞数に有意な差を認めなかった．

Hep3B 細胞（ヒト肝がん由来細胞）では，ellagic acid（12.5 ~ 100 μM）で濃度依存的に有意（12.5 μM: *p*<0.05, 25 ~ 100 μM: *p*<0.01）な生細胞数の減少（93.1%, 82.2%, 74.5%, 62.1%）を認められたが，25 μM 以上の濃度では有意な（*p*<0.01）LDH 量の増加（224.2%, 325.2%, 490.2%）を認められたため，強い細胞毒性が観察されていると判断した．また，柿蒂の酢酸エチル分画物でも同様に，濃度依存的な有意な（*p*<0.01）生細胞数の減少（80.9%, 66.5%, 53.7%, 27.6%）および LDH 量の増加（158.4%, 199.9%, 233.5%, 482.8%）を認められたため，顕著な細胞毒性が観察されていると判断した．一方，他の画分では，柿蒂の 70%アセトン抽出物（97.3%, 96.9%, 94.1%, 86.9%），*n*-ヘキサン分画物（96.1%, 93.8%, 85.9%, 68.9%），*n*-ブタノール分画物（95.7%, 94.5%, 92.2%, 86.6%），水分画物（91.7%, 91.7%, 89.5%, 85.3%）において，いずれも濃度依存的に生細胞数の減少を認め，*n*-ヘキ

サン分画物の 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以外では有意な LDH 量の増加を認めなかったことから、これらの画分には細胞増殖抑制活性が認められると判断した。また、柿蒂湯（煎液）および柿蒂湯エキス製剤は 50 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で有意 ($p < 0.05$) な生細胞数の減少（柿蒂湯煎液：94.6%, 94.4%, 柿蒂湯エキス製剤：95.6%, 93.2%）を認め、LDH 量の有意な増加を認めなかったことから、弱いながら細胞増殖抑制活性を有することが示唆された。このことから、柿蒂湯（煎液）および柿蒂抽出物は、本細胞種に対して一定の細胞増殖抑制活性あるいは細胞毒性を有することが明らかになるとともに、縮合型タンニンを豊富に含む画分である柿蒂の *n*-ブタノール分画物および水分画物は、本細胞種に対して細胞毒性を伴わずに細胞増殖抑制活性を有する可能性が示唆された。

A549 細胞（ヒト肺がん由来細胞）では、柿蒂の 70%アセトン抽出物の 25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で濃度依存的に有意 ($P < 0.05$) な生細胞数の減少（90.0%, 85.6%, 81.4%）を認め、その LDH 量の有意な増加を認めなかったことから、弱いながら細胞増殖抑制活性を有すると判断した。一方、*n*-ヘキサン分画物では生細胞数の有意（12.5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $p < 0.05$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $p < 0.01$ ）な減少（84.0%, 81.0%, 82.4%, 71.0%）を認めたが、いずれの濃度においても LDH 量の有意 ($p < 0.01$) な増加（203.4%, 218.8%, 215.1%, 199.7%）を認めたため、細胞毒性を有すると判断した。また、柿蒂湯（煎液）では 12.5 および 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で有意 ($p < 0.05$) な生細胞数の減少（79.1%, 74.2%）を認め、また LDH 量の有意な増加を認めなかったことから、細胞増殖抑制活性を有することが示唆された。

AGS 細胞（ヒト胃腺がん由来細胞）では、ellagic acid（25 ~ 100 μM ）で濃度依存的に有意 ($p < 0.01$) な生細胞数の減少（82.9%, 53.6%, 39.1%）を認め、LDH 量の増加を認めなかったことから、顕著な細胞増殖抑制活性を有すると判断した。また、酢酸エチル分画物（25 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 91.2%, 76.7%, 5.8%）および *n*-ヘキサン分画物（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6.6%）に有意 ($p < 0.01$) な生細胞数の減少を認めたが、各 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度では有意 ($p < 0.01$) な LDH 量の増加（144.9%, 124.4%）を認めたことから、細胞毒性であると判断した。一方、柿蒂湯（煎液）および柿蒂湯エキス製剤では生細胞数に有意な差を認めなかった。

上記の結果のように、細胞種によって反応は異なるが、各細胞に対して柿蒂湯の主要成分あるいは柿蒂の分画物が細胞増殖抑制活性または細胞毒性を示したことから、柿蒂湯の摂取はがん転移の予防に寄与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

好村 守生, 望月 陽, 杉脇 秀美, 天倉 吉章,
シテイのポリフェノール成分, 日本生薬学会
第 64 回年会, 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

好村 守生 (YOSHIMURA, Morio)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：80454891