

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19406004

研究課題名 (和文) タイ国伝承医薬の現地調査と薬効に関する科学的根拠の検証

研究課題名 (英文) Search for traditional medicines in Thailand and scientific evaluation of their pharmacological effects

研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20211336

研究成果の概要 (和文)：タイ国では、いわゆる伝承療法において、様々な天然植物が医療や健康増進に利用されている。そこでタイ国にて現地の研究者から、伝承医薬の情報とともに、天然植物試料を収集し、抗がん作用を中心に効果の科学的解明を試みた。その結果、がん細胞がある種のタイ植物抽出物と抗がん剤で同時に処理すると、がん細胞への抗がん剤の取り込みが上昇し、抗がん剤の効果が著しく増強されることが明らかとなった。また、ある種のタイ植物は、抗がん剤に耐性を示すがん細胞に対しても、単独で強力な抗がん作用を示すことが判明した。これらの研究を進めることで、がん治療に新たな道が開かれることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：In Thailand, many traditional medicines are used for therapy and health promotion. Based on the discussion with colleagues in Thailand, some Thai plant extracts and purified compounds were generously provided. The pharmacological effects of these extracts and compounds were examined; especially the effects on anticancer drug-resistant tumor cells. It was found that certain extracts potentiated the effect of anticancer effect of the drug, while another extract has potential anticancer effect by itself. These results would provide important information for the development of novel anticancer chemotherapies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	7,700,000	2,310,000	10,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：タイ国伝承医薬、抗がん作用

1. 研究開始当初の背景

(1) タイ国では、いわゆる伝承療法、民間療法において、様々な天然資源由来の医薬品、

健康食品、サプリメントの類が医療や健康増進に利用されている。これまでにタキサン系抗がん剤など現代の医療に重要な医薬品が

天然植物から見出されてきていることは周知の事実であり、天然資源の宝庫であるタイ国には、まだまだ未知の医薬品シーズが眠っているものと思われる。しかし「伝承」が真実を伝えているのか、「民間」という広範な母集団において所期の治療効果・予防効果は得られているのか、といった点について、科学的見地からのアプローチは乏しい。

(2) P-糖タンパク質 (P-gp) は、がん細胞の抗がん剤多剤耐性を担う薬物排出ポンプであり、がん細胞内の薬物濃度を下げることによってがん細胞に薬剤耐性を付与する膜タンパク質である。P-gp 機能を阻害することでがん細胞の多剤耐性を克服できる可能性があることから、基礎、臨床の両面から P-gp 阻害活性の強い物質の探索が進められている。

(3) 同じ BMI 値でも東南アジア人のほうが、白人に比べて糖尿病に罹患しやすいとの見解があることから、タイを含め東南アジア圏の糖尿病予防に対する関心は高い。タイでは肥満や糖尿病予防・治療目的で様々な天然植物由来の民間医薬が用いられているが、その効果に関する科学的情報基盤は乏しい。

2. 研究の目的

(1) タイ国において、がんや糖尿病の予防、進行阻止、改善目的で摂取されている伝承医薬・民間医薬に関する情報を、これまでから交流のあるタイ国研究者の協力を得て収集する。収集した情報を整理し、がん、糖尿病の予防、治療に有望と考えられる伝承医薬を選定し試料を収集する。

(2) 得られたタイ植物抽出物および精製成分について、抗がん作用および P-gp 阻害作用・抗がん剤多剤耐性克服作用を解析する。そのための *in vitro* モデル細胞系として、抗がん剤に多剤耐性を示すがん細胞を新たに樹立する。

(3) 得られたタイ植物抽出物および精製成分について、食後過血糖抑制作用につながる消化管の二糖類分解酵素阻害作用を解析する。

3. 研究の方法

(1) タイ国における情報・試料の収集：天然植物由来の伝承医薬のなかで、抗がん効果、抗糖尿病効果（食後過血糖改善効果）があるとされるものに焦点を当て、タイ国研究者の協力を得て情報、試料を収集する。タイ国内の地域としては、協力者の大学のある Bangkok 地区周辺、Khon Kaen 地区周辺を中心に調査する。

(2) パクリタキセル耐性 HepG2 細胞の樹立：HepG2 細胞は 10% ウシ胎児血清、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)を用いて CO₂インキュベーター(37°C、5% CO₂-95% air)内で培養した。

HepG2 細胞を 3 nM パクリタキセル(PTX)含有培地を用いて長期間培養し、PTX に耐性を示す HepG2 細胞(PR-HepG2)を樹立した。

(3) mRNA 発現解析：HepG2 細胞および PR-HepG2 細胞から total RNA を抽出し Real-time PCR 法により解析した。

(4) 細胞の viability 評価：テスト物質存在下で 48 時間処理した細胞を用い、XTT アッセイにより評価した。

(5) [³H]PTX および rhodamine123 (Rho123) の細胞内蓄積の測定：基質を含む薬液を細胞に加えて一定時間インキュベーションした。PBS(+)で細胞を洗浄後、0.1 mM NaOH により細胞を溶解し、放射活性あるいは蛍光強度を測定した。

(6) 二糖類分解酵素活性の測定：ラット小腸粘膜のホモジネートから調製した S9 画分を酵素試料として、スクラーゼ、マルターゼ、トレハラーゼの活性を測定した。

4. 研究成果

(1) タイ国産天然植物に関する情報・資料収集：コンケン大学の Denpong Patanasethanont 博士、Bung-orn Sripanidkulchai 博士、マヒドン大学の Varaporn Junyaprasert 博士、Noppamas Soonthornchareonnon 博士からタイ国における伝承医薬、民間医薬の現状について話を伺うとともに、協議の上、コンケン大学から 10 種類の、マヒドン大学から 13 種類のタイ植物の素抽出物および単離精製物を供与いただいた。一部を表 1 に示す。

表 1. タイ国産天然植物抽出物および単離精製物

Code name	Plant	Family
50% Ethanol extracts (Kohn Kaen Univ.)		
1: RC-01	<i>Oryza sativa</i> (grain)	gramineae
2: KP006	<i>Cratoxylum formosum</i> (leaves)	Clusiaceae
3: KP007	<i>Garcinia cawa</i> (leaves)	Clusiaceae
4: KP008	<i>Aganosma marginata</i> (leaves)	Apocynaceae
5: KP011	<i>Polyalthia evecta</i> (leaves)	Annonaceae
6: KP018	<i>Ellipeiopsis cherrevensis</i> (stem)	Annonaceae
80% Ethanol extracts (Mahidol Univ.)		
7: MT80	<i>Microcos tomentosa</i>	Tiliaceae
8: MM80	<i>Micromelum minutum</i>	Rutaceae
9: AT80	<i>Ancistrocladus tectorius</i>	Ancistrocladaceae
Purified compounds (Mahidol Univ.)		
10: LUP (Lupinifolin)	<i>Derris reticulata</i>	Fabaceae
11: ECL (Eurycomalactone)	<i>Eurycoma longifolia</i>	Simaroubaceae
12: OST (Osthole)	<i>Cnidium monnieri</i>	Apiaceae
13: BER (Bergapten)	<i>Cnidium monnieri</i>	Apiaceae

(2) パクリタキセル耐性 HepG2 細胞 (PR-HepG2 細胞)の樹立と耐性化の原因説明：HepG2 細胞を 3 nM パクリタキセル(PTX)存在下で長期間 (3~5 ヶ月) 維持培養することで、PTX に耐性を示す PR-HepG2 細胞を得た。XTT アッセイにて解析した PTX の IC₅₀ 値は、PR-HepG2 細胞で 15 倍以上高い値を示した (図 1)。

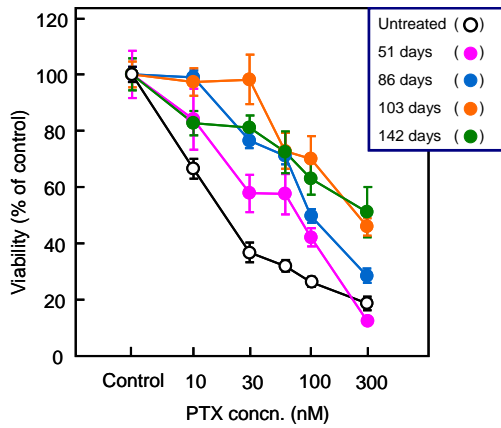


図 1. PTX 感受性に及ぼす PTX (3 nM) 長期間処理の影響

両細胞を用い、PTX 輸送に関わるトランスポーターの mRNA 発現を比較検討したところ、PTX の細胞外排出を担うと考えられる P-糖タンパク質 (P-gp; MDR1) の発現が亢進していた。興味深いことに、PTX 取り込みに関わると考えられる OATP1B3 の発現は、ほぼ消失していた (図 2)。従って、PR-HepG2 細胞は排出トランスポーターの亢進と取り込みトランスポーターの低下という二つの方法で耐性化を獲得しているものと考えられた。

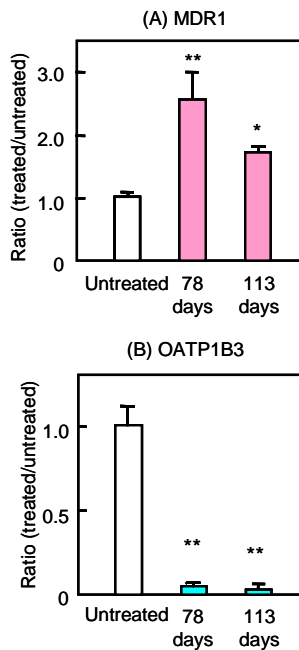


図 2. PTX の輸送に関わるトランスポーター (A; efflux transporter, B; influx transporter) の mRNA 発現に及ぼす PTX (3nM) 処理の影響

そこで PTX の細胞内蓄積性および移行メカニズムを両細胞で比較検討した。PTX の取り込みは HepG2 細胞に比べ、PR-HepG2 細胞で約 1/2 に低下しており、耐性化との関連が示唆された (図 3)。

細胞で約 1/2 に低下しており、耐性化との関連が示唆された (図 3)。

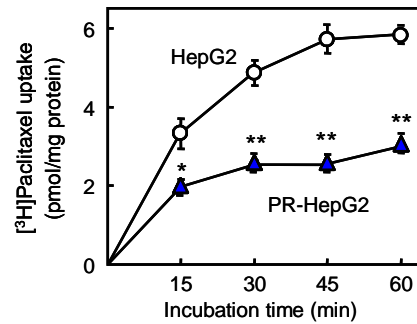


図 3. HepG2 及び PR-HepG2 細胞における PTX の細胞内蓄積

代謝阻害剤で細胞を処理すると、PTX の取り込みは、両細胞において同程度の値まで上昇したことから、エネルギー依存性の排出系の関与が示唆された。P-gp 阻害剤ベラパミルを添加した場合も、PTX の取り込みは、両細胞において同程度の値まで上昇した。同様の結果は、P-gp 基質である rhodamine123 (Rho123) においても観察された。従って、PTX の取り込みは P-gp によって抑制されていること、PR-HepG2 細胞では P-gp 機能の亢進により、HepG2 細胞に比べて蓄積が低くなる可能性が示された。さらに OATP1B3 の阻害剤 BSP は、HepG2 細胞においてのみ、PTX の取り込みを阻害したが、この結果は OATP1B3 の発現が PR-HepG2 細胞ではシャットダウンされていることと対応するものである。従って、OATP1B3 の発現・機能消失も、耐性化の一要因であると考えられた。さらにベラパミルを PTX と併用することで、PR-HepG2 細胞における PTX 取り込みが上昇し、耐性克服作用も認められた (図 4)。なお、PR-HepG2 細胞は、PTX と同様、P-gp 基質であるドキソルビシンにも交差耐性を示したが、P-gp 基質とならないシスプラチンに対しては耐性を示さなかった。

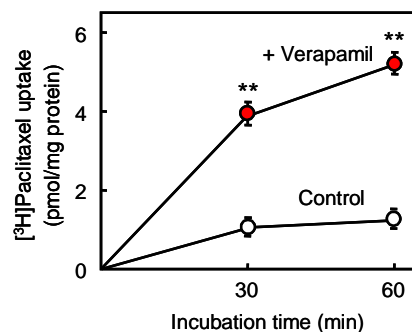


図 4. PR-HepG2 細胞における PTX の取り込みに及ぼすベラパミルの影響

(3) タイ国産植物成分の抗がん効果および多剤耐性克服効果の解析: P-gp 機能に及ぼす各種タイ国産植物抽出物および精製物の影響について PR-HepG2 細胞を用いて検討した。P-gp 機能は、代表的基質である Rho123 および PTX の細胞内取り込み量の変化から解析した。その結果、KP006, KP008, MT80 は Rho123 の細胞内取り込みのみを有意に上昇させ、MM80 (*Micromelum minutum*) は PTX のみを上昇させた。一方、AT80 (*Ancistrocladus tectorius*)、KP018 (*Aganosma marginata*) は両基質の取り込みを有意に上昇させた。従って、Rho123 および PTX の取り込みに対する抽出物の影響は、必ずしも同一ではないことが明らかとなった。そこで、PTX の細胞内取り込みを上昇させた抽出物についてさらに解析を進めた。これら抽出物による阻害の濃度依存性を検討したところ、KP018 は PTX の取り込みを濃度依存的に上昇させ、20 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度で有意な取り込み上昇が認められた。AT80、MM80 によっても濃度依存的な取り込み上昇が認められた (図 5)。

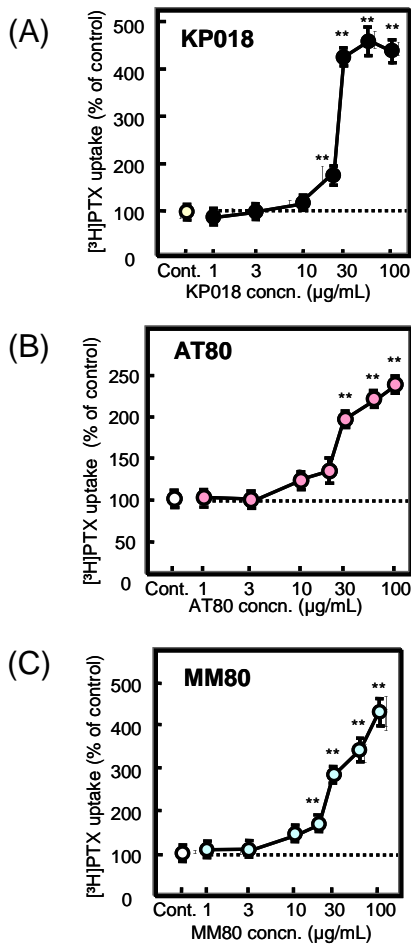


図 5. PR-HepG2 細胞における PTX の取り込みに及ぼす(A)KP018, (B)AT80, (C)MM80 の影響

なおこの条件下では、いずれも細胞の viability にも変化は認められず、抽出物による取り込み上昇は毒性によるものではなく、主に P-gp 阻害作用が関与しているものと考えられた。

KP018、AT80、MM80 の細胞毒性について検討したところ、KP018 の毒性は比較的強く、細胞の viability に対する IC_{50} 値は 5.8 $\mu\text{g/mL}$ であった (図 6)。

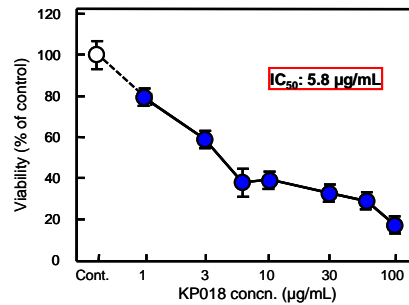


図 6. PR-HepG2 細胞に対する KP018 の細胞毒性

一方、AT80、MM80 は、KP018 と比較して毒性が弱く、PTX の細胞内取り込みを有意に上昇させる 30 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では、細胞の viability は、ほぼ維持されていた。そこで AT80 あるいは MM80 併用によって PR-HepG2 細胞の PTX に対する耐性が克服できるかどうか検討を行ったところ、30 $\mu\text{g/mL}$ の AT80 併用によって PTX に対する細胞の生存曲線は左にシフトし、 IC_{50} 値は約 1/3 に低下した (図 7)。同様に MM80 の場合も併用によって PTX に対する細胞の感受性亢進が認められた。

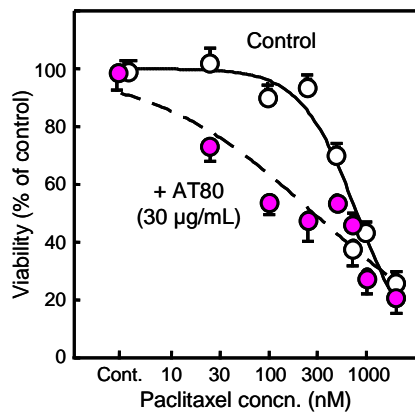


図 7. PTX に対する PR-HepG2 細胞の生存曲線に及ぼす AT80 併用の影響

以上、KP018 は、PTX の取り込みを上昇させる濃度では細胞毒性が強く、耐性克服剤としてよりは抗がん剤としての有用性が示唆された。さらに KP018 は、PTX 感受性細胞、耐性細胞に対して同程度の細胞毒性を示し、P-gp の高発現による耐性化の影響を受けないことが示された。一方、AT80、MM80 は、PTX の取り込みを上昇させる 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では毒性を示さず、PTX の殺細胞効果を増強したことから、抗がん剤多剤耐性克服剤として有用であることが示された。

(4) 消化管二糖類分解酵素活性に及ぼすタイ国産植物抽出物および精製物の影響解析：消化管には二糖類分解酵素が存在し、食事によって摂取された糖をグルコースやガラクトースといった単糖に分解し、吸収する。ラット小腸粘膜の S9 画分を用い、スクロース、マルトース、トレハロースを基質として、マルターゼ、スクラーゼ、トレハラーゼ活性を測定した。それぞれの酵素活性の Km 値は 41.9、2.3、47.0 mM、Vmax 値は 9.8、52.3、28.0 nmol/mg protein/min であった。これら二糖類分解酵素活性に及ぼすタイ国産植物抽出物および精製物の影響について解析したところ、用いた試料の中では KP008 (*Aganosma marginata*)、MT80 (*Microcos tomentosa*) の二糖類分解酵素阻害作用が強く、マルターゼ、スクラーゼ、トレハラーゼいずれに対しても阻害作用を示した (図 8)。したがって、これらのタイ国産植物抽出物中には二糖類分解酵素阻害活性を有する化合物が含まれていること、食後過血糖改善薬として有用である可能性が示された。

以上の研究成果より、タイ植物が、がんや糖尿病 (食後過血糖) の新規治療薬の探索ソースとして優れた可能性を持つことを明らかにすることができた。今後さらに *in vivo* での検証へと研究を発展させていく予定である。

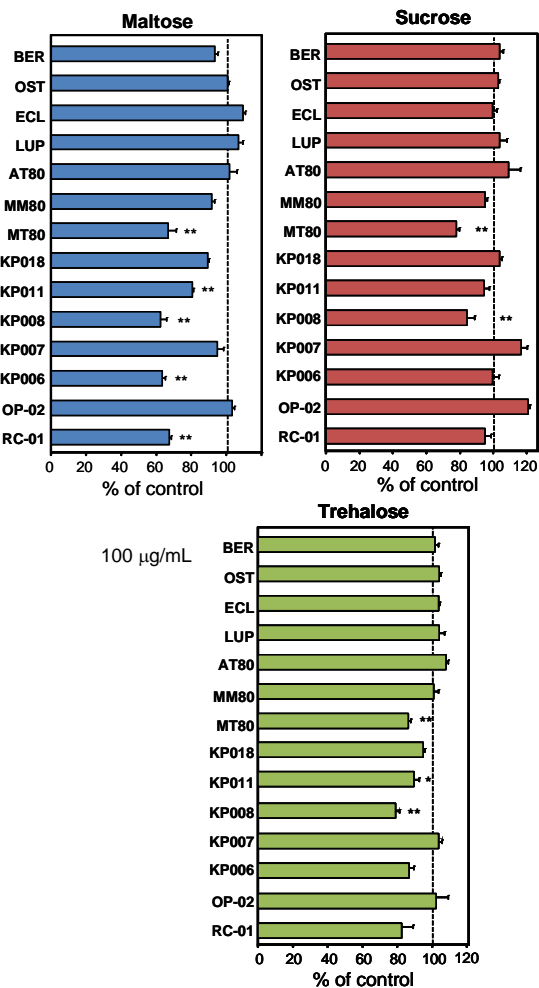


図 8. 二糖類分解酵素活性に及ぼすタイ国産植物抽出物および精製物の影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件) いずれも査読有

- ① Kawami, M., Yumoto, R., Nagai, J., Junyaprasert, V., Soonthornchareonnon, N., Patanasethanont, D., Sripanidkulchai, B., Takano, M.: Effect of Thai plant extracts on P-glycoprotein function and viability in paclitaxel-resistant HepG2 cells. Drug Metab. Pharmacokinet., in press (2010)
- ② Takano, M., Otani Y., Tanda, M., Kawami, M., Nagai, J. and Yumoto, R.: Paclitaxel-resistance conferred by altered expression of efflux and influx transporters for paclitaxel in human hepatoma cell line HepG2. Drug Metab. Pharmacokinet., 24

(5), 418-427 (2009)

- ③ Patanasethanont, D., Nagai, J., Matsuura, C., Fukui, K., Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B.-o., Yenjai, C., Yumoto, R. and Takano, M.: Modulation of function of multidrug resistance associated-proteins by *Kaempferia parviflora* extracts and their components. *Eur. J. Pharmacol.*, **566** (1-3), 67-74 (2007)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Ryoko Yumoto, Effect of Thai plant extracts on P-glycoprotein function and cell viability in HepG2 and paclitaxel-resistant HepG2 cells. The 3rd Asian Pacific Regional ISSX Meeting in Thailand, 2009年5月10-12日, The Imperial Queen's Park Hotel, タイ
- ② 川見昌史、タイ国産植物抽出物の抗がん作用および耐性克服作用に関する研究、日本薬学会第130年会、2010年3月28-30日、岡山桃太郎アリーナ
- ③ 川見昌史、タイ国産植物成分のP-glycoprotein阻害作用、paclitaxel耐性克服作用および抗がん作用に関する検討、第19回日本医療薬学会年会、2009年10月24-25日、長崎県立総合体育館
- ④ 川見昌史、タイ国産植物成分が及ぼすがん細胞のP-glycoprotein機能およびviabilityへの影響解析、日本薬学会第129年会、2009年3月26-28日、京都国際会館
- ⑤ 川見昌史、がん細胞のP-glycoprotein機能およびviabilityに対するタイ国産植物成分の影響解析、第47回日本薬学会中国四国支部学術大会、2008年11月8-9日、岡山コンベンションセンター
- ⑥ 湯元良子、ヒト肝がん由来HepG2細胞におけるパクリタキセルの輸送・細胞毒性とタイ国産植物成分の影響、医療薬学フォーラム2008、2008年7月12-13日、タワーホール船堀
- ⑦ 大谷佳文、ヒト肝がん由来HepG2細胞のパクリタキセル耐性と輸送機能、第46回日本薬学会中国四国支部学術大会、2007年11月11-12日、高知市文化プラザ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 幹久 (TAKANO MIKIHISA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：2021133

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永井 純也 (NAGAI JUNYA)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授 (H19：研究分担者)
研究者番号：20301301

湯元 良子 (YUMOTO RYOKO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70379915