

天然物由来物質によるがん細胞のアポトーシス

今井正彦

星薬科大学 衛生化学教室

Apoptosis induction by natural products in cancer cells

Masahiko IMAI

Department of Health Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

はじめに

厚生労働省人口動態統計によると、日本人の3大死因の1つである悪性新生物すなわちがんによる死亡数は、1981年以降第1位である。なかでも、2014年の日本人のがんによる部位別死亡数において、胃がんは女性で3位、男性で2位であり、大腸がんは女性で1位、男性で3位である¹⁾。2012年のアメリカでの大腸がんによる死亡率も男女ともに3位となっている²⁾。

このように死亡率の高い胃がんや大腸がんの治療には、フッ化ピリミジン系の薬物を中心とした多剤併用による化学療法が行われている³⁻⁶⁾。胃がんの治療には、フルオロウラシル (5-fluorouracil; 5-FU) とフォリン酸カルシウム (leucovorin; LV) に加えて、イリノテカン (irinotecan; CPT-11) あるいはシスプラチン (cisplatin; CDDP) を併用する処方が行われる。また、大腸がんの治療には、5-FU と LV に加えて、CPT-11 あるいはオキサリプラチン (oxaliplatin; L-OHP) を併用する処方が行われる。さらに、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) に対するモノクローナル抗体であるベバシズマブ (bevacizumab) や上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) に対するモノクローナル抗体であるセツキシマブ (cetuximab) のような分子標的薬も処方され始めている。一方、漢方薬やフラボノイドなどの天然物による抗腫瘍作用にも注目が集まっており、特にフラボノイドや合成フラボン化合物であるフラボピリドール (flavopilidol) による臨床試験も行われている^{7,8)}。これら既存の抗がん剤の併用や、一般に副作用が低いと言われている⁹⁾天然物との併用は、抗がん作用の増強や副作用の軽減のために有用である。

薬剤が抗腫瘍作用を発揮するメカニズムとして、がん細胞に細胞死を導くことや、がん細胞の増殖を抑制すること、さらにはその浸潤・転移を抑制することが知られている¹⁰⁻¹⁵⁾。先に示した分子標的薬である bevacizumab

は VEGF と結合することにより血管新生を抑制し、腫瘍の増殖を阻害する¹⁶⁾。また、cetuximab はがん細胞に高発現する EGFR を阻害し、腫瘍の増殖を阻害する¹⁷⁾。また、5-FU や CDDP はがん細胞に細胞死を導く薬剤である¹⁸⁻²⁰⁾。

以上のように、がん治療における副作用の軽減のためには抗がん剤の減量や作用の増強を目的とした安全な新規薬剤が必要とされる。そこで本稿では、古来より婦人科系の疾患に用いられてきた天然物 (*Vitex agnus-castus*) の抽出物によるがん細胞に対する増殖抑制作用について紹介する。また、細胞死誘導メカニズムの解析、並びに既存の抗がん剤との併用効果についても概説する。

1. *Vitex agnus-castus*

Vitex agnus-castus (和名: セイヨウニンジンボク) は、シソ科 (Lamiaceae) (旧分類ではクマツヅラ科 (Verbenaceae)) に属し、西アジアや南ヨーロッパに自生する落葉低木である。*V. agnus-castus* の果実は monk's pepper や chasteberry とも呼ばれ、2000 年以上前の古代ギリシャの時代から民間薬として婦人科系の疾患に用いられてきた。さらにヨーロッパにおいて、chasteberry は 50 年以上前から premenstrual syndrome (PMS) (月経前症候群) のような婦人科系の疾患に広く用いられており²¹⁾、月経異常症である無月経、希発月経、月経過多などの治療に良好な臨床効果が認められることが報告されている²²⁾。また、Schellenberg らは、chasteberry がホルモン変化やプロスタグランジンなどが関与する PMS の改善に効果を示すことを報告している²³⁾。特にドイツでは、chasteberry を PMS 治療に関して承認しており、ドイツのホームドクターや婦人科医によって広く処方されている²¹⁾。よって、*V. agnus-castus* は古代からの民間薬であるのみならず、現在もヨーロッパでは臨床応用されている非常に有用な天然物の一つである。

廣部らは、イスラエル産の植物をメタノール抽出し、

その抽出物を用いて細胞増殖抑制作用を検討した²⁴⁾。その結果、55種類の抽出物のうち、30 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で強い細胞増殖抑制作用を示す13種類の抽出物を見出した。その中で、*V. agnus-castus* 果実は、*Ecballium elaterium* (ウリ科、Cucurbitaceae) 果実と同様に低濃度から Chinese hamster 肺がん由来 V-79 細胞に増殖抑制作用を示した。次に、廣部らは、*V. agnus-castus* 果実抽出物中のフラボノイドについて解析した²⁵⁾。その結果、luteolin とその配糖体4種、3,3',6,7-tetramet hoxy-flavone、artemetin および isorhamnetin の8種類のフラボノイドを同定した。さらに、isorhamnetin 以外の7種類のフラボノイドは、マウス白血病細胞株 P388 の増殖を抑制することを報告した。一方、*V. agnus-castus* に含有されるイリドイドは、ヒト由来培養がん細胞株 (胃がん (HM02)、肝がん (HepG2) および乳がん (MCF7)) に対して細胞毒性を示さないことも報告されている²⁶⁾。よって、フラボノイドのような化合物が *V. agnus-castus* 果実抽出物の示すがん細胞の増殖抑制活性物質の本体であろうと推測することができる。

大山らは、*V. agnus-castus* 成熟果実からのエタノール抽出物 (以下、Vitex) による増殖抑制作用を正常細胞2種類およびがん細胞6種類を用いて検討した²⁷⁾。Vitex は、正常細胞であるヒト胎児線維芽細胞 (HE21) の増殖に影響を与えず、ヒト子宮頸管繊維芽細胞 (HCF) の増殖にほとんど影響を与えなかった。一方、Vitex はヒトがん細胞である胃印環細胞がん細胞 (KATO-III)、大腸がん細胞 (COLO 201)、肺小細胞がん細胞 (Lu-134-A-H)、乳がん細胞 (MCF-7)、子宮がん細胞 (SKG-3a) および卵巣がん細胞 (SKOV-3) の増殖を増殖速度依存的に抑制した。さらに、Vitex は KATO-III、COLO 201、Lu-134-A-H および SKOV-3 細胞にアポトーシスを誘導することを示した。加えて、KATO-III 細胞に対するアポトーシス誘導は、抗酸化剤である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) あるいは *N*-acetylcysteine (NAC) の共存により阻害されたことから、酸化的ストレスが関連することが示唆された。以上のことから、*V. agnus-castus* 抽出物はドイツで PMS の治療に用いられており、さらに Vitex はがん細胞特異的に細胞増殖を抑制することから、安全性の高い抗がん剤となる可能性が考えられた。

2. Vitex の KATO-III 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズム

細胞死は大別してアポトーシスとネクローシスに分けられ、それらは細胞死の過程における形態学的変化と生化学的变化によって明確に分けられる²⁸⁻³⁴⁾。アポトーシスでは形態学的変化に先立ってアポトーシスに特異的な

タンパク質分解酵素であるカスパーゼ (caspase) 類の連続的な活性化が起こり、そして様々なタンパク質の限定分解が見られ、アポトーシスの顕著な特徴の一つであるクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化が起こる。このような変化は、ネクローシスでは見られない。そこで、Vitex による KATO-III 細胞のアポトーシスを DNA 断片化を指標に経時的に評価した (Fig. 1)³⁵⁾。KATO-III 細胞では Vitex 処理後 18 時間から DNA 断片化が観察された。一方、抗酸化剤である NAC 共存化では、Vitex 処理による DNA 断片化は完全に抑制された。同様に、アポトーシスの指標であるクロマチンの凝縮についての検討でも Vitex 処理によりクロマチン凝縮が認められたが、NAC の共存により完全に抑制された³⁵⁾。よって、Vitex 処理による KATO-III 細胞のアポトーシスは酸化的ストレスに依存することが示唆された。

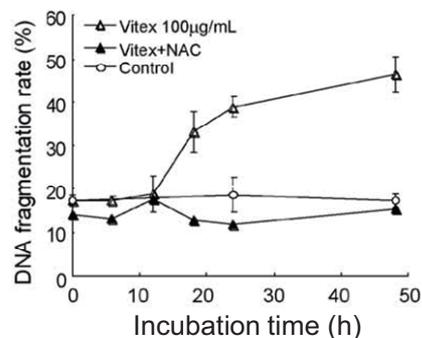


Fig. 1. KATO-III 細胞における Vitex 処理による DNA 断片化率と NAC 併用による影響³⁵⁾

KATO-III 細胞に 20 mM NAC 共存化あるいは非共存化 100 $\mu\text{g/ml}$ の Vitex を処理し、48 時間まで培養した。それぞれの処理時間の細胞から DNA を抽出し、DNA 断片化分析を行った。Control は \circ 、Vitex 単独は \blacktriangle および Vitex と NAC の併用は \triangle で示した。データは平均 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。

次に、酸化的ストレスによって誘導あるいは抑制される酸化的ストレス関連因子の発現に及ぼす Vitex の影響を検討した (Fig. 2)³⁵⁾。ストレスにตอบสนองして発現する heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA は、Vitex 処理により増加し、NAC の共存によりその増加は阻害された。一方、酸化的ストレスの消去系である catalase および Mn-superoxide dismutase (SOD) mRNA は、Vitex 処理により減少し、NAC の共存によりその減少は回復した。よって、Vitex は KATO-III 細胞の酸化的ストレス消去系に影響を及ぼすことでアポトーシスを誘導することが考えられた。

アポトーシス誘導のメカニズムについては多くの研究がなされている。先に示した caspase がその中心的な役割を果たしている³⁴⁾。Caspase は通常前駆体 (pro-form) として存在し、種々のアポトーシスシグナルに

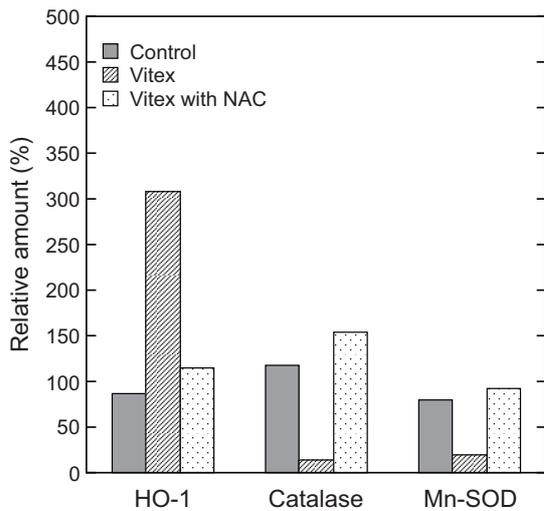


Fig. 2. KATO-III 細胞における Vitex 処理による酸化ストレス関連 mRNA 発現の変化と NAC 併用による影響³⁵⁾

KATO-III 細胞に 20 mM NAC 共存化あるいは非共存化 100 μ g/ml の Vitex を処理し、12 時間培養した。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により酸化ストレス関連 mRNA 発現を解析した。0 時間の mRNA 発現を 100% とした時の相対値で示した。文献 35 一部改変

より限定分解を受け活性体 (active-form) となる。これら caspase 類の活性化には、細胞表面のデスレセプターに対する刺激により caspase-8 を活性化する外因性の経路や、ミトコンドリアを介して caspase-9 を活性化する内因性の経路が知られている³⁶⁻³⁸⁾。ミトコンドリアへのシグナルを制御する分子として、Bcl-2 ファミリーの関与が重要であり、それらはアポトーシス誘導系の Bax や Bak と、アポトーシス抑制系の Bcl-2 や Bcl-XL との発現量のバランスにより、アポトーシスの誘導および抑制を制御している³⁷⁾。そこで、Vitex 処理による KATO-III 細胞のアポトーシス誘導経路を明らかにするため、アポトーシス関連因子の発現について検討した。まず、Fig. 3 にアポトーシス関連 mRNA 発現の変化を示した³⁵⁾。デスレセプターが関与するアポトーシスを誘導する tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA の発現は、Vitex 処理により増加し、NAC の共存によりその増加は抑制された。一方、ミトコンドリアにおいて、アポトーシスを負に制御する Bcl-2 および Bcl-XL mRNA の発現は、Vitex 処理により減少し、NAC の共存によりその減少は回復した。よって、Vitex 処理により KATO-III 細胞では、デスレセプター経路とミトコンドリア経路の両アポトーシス経路が進行することが示唆された。そこで、両経路の指標となる caspase-8 および caspase-9 の活性化、並びにアポトーシスの実行に関わる caspase-3 の活性化について検討した。その結果、Vitex は 3 種の caspase すべてを活性化し、NAC の共

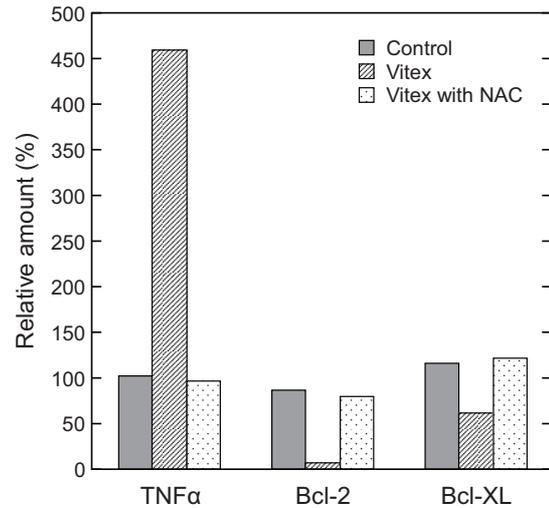


Fig. 3. KATO-III 細胞における Vitex 処理によるアポトーシス関連 mRNA 発現の変化と NAC 併用による影響³⁵⁾

KATO-III 細胞に 20 mM NAC 共存化あるいは非共存化 100 μ g/ml の Vitex を処理し、12 時間培養した。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR によりアポトーシス関連 mRNA 発現を解析した。0 時間の mRNA 発現を 100% とした時の相対値で示した。文献 35 一部改変

存は caspase 活性化を抑制した (Fig. 4)³⁵⁾。以上のことから、Vitex は KATO-III 細胞に対してデスレセプター経路とミトコンドリア経路の両アポトーシス経路を活性化すること、両経路の活性化は抗酸化剤 NAC の併用により阻害されたことから、Vitex は KATO-III 細胞に対して酸化ストレスに起因したアポトーシスを誘導することが明らかになった。

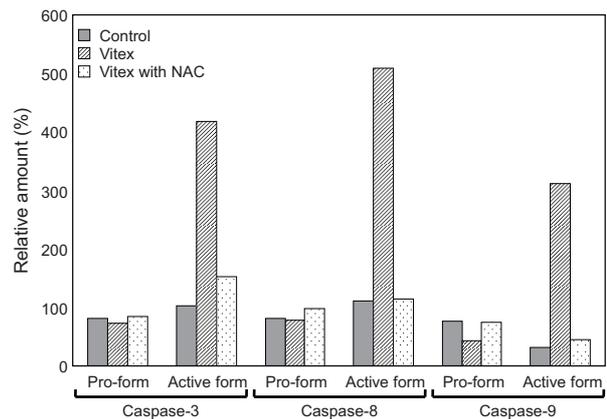


Fig. 4. KATO-III 細胞における Vitex 処理による caspase 活性化と NAC 併用による影響³⁵⁾

KATO-III 細胞に 20 mM NAC 共存化あるいは非共存化 100 μ g/ml の Vitex を処理し、24 時間培養した。細胞からタンパク質を抽出し、Western blot により caspase タンパク質の発現を解析した。0 時間の mRNA 発現を 100% とした時の相対値で示した。文献 35 一部改変

3. Vitex の COLO 201 細胞に対するアポトーシス誘導メカニズム

KATO-III 細胞では、Vitex 処理により酸化ストレスを介したアポトーシスが進行することを明らかにした³⁵⁾。しかしながら、他の細胞株に対するアポトーシス誘導メカニズムが同様に酸化ストレスを介するかにについては明らかになっていない。そこで、KATO-III 細胞と同様に消化器がん由来細胞株であり、Vitex 処理によりアポトーシスが誘導される COLO 201 細胞（大腸がん細胞）に対する Vitex によるアポトーシス誘導メカニズムの解析を行った。まず、COLO 201 細胞に対する Vitex 処理によるアポトーシス誘導および caspase の活性化について検討した。その結果、COLO 201 細胞では、Vitex 処理 24 時間後から明確な DNA 断片化が観察された³⁹⁾。さらに、Vitex 処理 6 時間後に有意な caspase-9 の活性化が認められ、Vitex 処理 12 時間後から有意な caspase-3 の活性化が認められた (Fig. 5)³⁹⁾。一方、COLO 201 細胞では caspase-8 の活性化は認められなかった (Fig. 5)³⁹⁾。次に、酸化ストレス依存

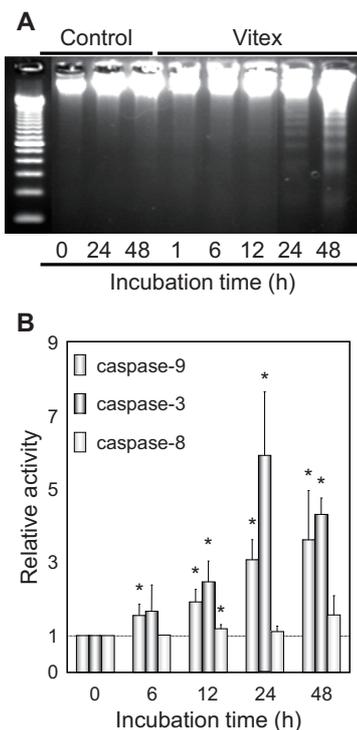


Fig. 5. COLO 201 細胞における Vitex 処理による caspase 活性化³⁹⁾

COLO 201 細胞に 100 μ g/ml の Vitex を処理し、48 時間まで培養した。それぞれの処理時間の細胞からタンパク質を抽出した。Caspase-3、caspase-8 および caspase-9 活性は、caspase fluorometric assay kit (BioVision 社) を用いて測定した。データは平均 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。* は Student's t-test の p 値が 5 % 未満であることを示す。文献 39 一部改変

性を明らかにするため、NAC 共存による影響を検討したところ、COLO 201 細胞では Vitex 処理による増殖抑制は NAC 共存により回復しなかった⁴⁰⁾。さらに、酸化ストレス関連因子の mRNA 発現に及ぼす影響を検討したところ、KATO-III と同様に HO-1 mRNA 発現の増加が認められた (Fig. 6)⁴⁰⁾。一方、酸化ストレス消去系の mRNA 発現に影響は認められなかった (Fig. 6)⁴⁰⁾。よって、COLO 201 細胞に対する Vitex 処理では酸化ストレス非依存的なアポトーシスが進行することが示唆された。よって、COLO 201 細胞では、KATO-III 細胞とは異なり、caspase-8 非依存的かつ酸化ストレス非依存的なアポトーシスが誘導されることが示された。

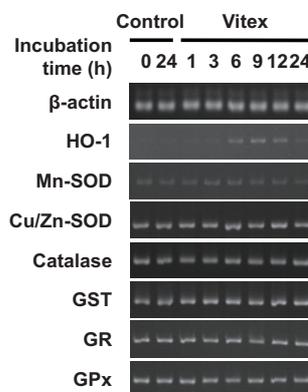


Fig. 6. COLO 201 細胞における Vitex 処理による酸化ストレス関連 mRNA 発現の変化⁴⁰⁾

COLO 201 細胞に 50 μ g/ml の Vitex を処理し、24 時間まで培養した。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により酸化ストレス関連 mRNA 発現を解析した。

GST: glutathione S-transferase; GR: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase

アポトーシス誘導は、酸化ストレス以外にも、タンパク質のフォールディングの異常による小胞体ストレスや DNA 傷害により誘導されることが報告されている^{41, 42)}。小胞体ストレスのマーカーとして、熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) ファミリーが報告されている^{43, 44)}。また、酸化ストレスや小胞体ストレスなどのストレスにより、ストレス応答キナーゼである JNK や p38 のような MAPK の活性化が知られており、Vitex に含有される主要成分である luteolin によるアポトーシス誘導にも JNK の関与が報告されている⁴⁵⁾。そこで次に、小胞体ストレス関連遺伝子の mRNA 発現に及ぼす Vitex 処理による影響を検討した。その結果、小胞体ストレスマーカーである HO-1、CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) および 78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78) の mRNA 発現は、Vitex 処理により増加した (Fig. 7)³⁹⁾。よって、Vitex 処理による COLO 201

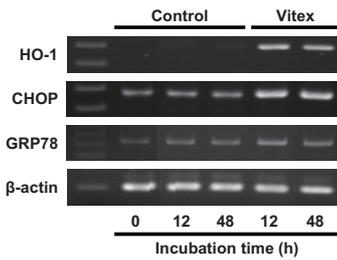


Fig. 7. COLO 201 細胞における Vitex 処理による小胞体ストレス関連 mRNA 発現の変化³⁹⁾

COLO 201 細胞に 100 μg/ml の Vitex を処理し、48 時間まで培養した。細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により小胞体ストレス関連 mRNA 発現を解析した。

細胞のアポトーシスに小胞体ストレスが関与する可能性が示された。そこで次に、ストレス応答キナーゼである JNK および p38 の関与を明らかにするため、JNK および p38 阻害剤 (SP600125 および SB203580) 共存による影響を検討した。Vitex が誘導する DNA 断片化は、JNK 阻害剤共存により阻害されたが、p38 阻害剤共存により影響を受けなかった³⁹⁾。また、Vitex 処理による caspase-3 の活性化は JNK 阻害剤の共存により有意に減弱した (Fig. 8)³⁹⁾。よって、Vitex 処理により誘導される COLO 201 細胞のアポトーシスは、小胞体ストレスに依存し、JNK の活性化を介して進行することが示された。また、Vitex 処理によるアポトーシス誘導経路は、大腸がんや胃がんといった消化器がんの間でも異なるメカニズムで進行することが示された。

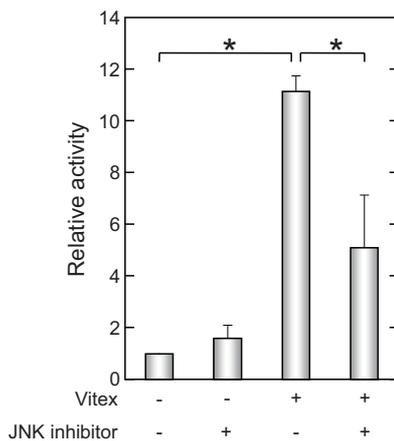


Fig. 8. COLO 201 細胞における Vitex 処理による caspase-3 活性化に及ぼす JNK 阻害剤の影響³⁹⁾

COLO 201 細胞に JNK 阻害剤 (SP600125) 共存あるいは非共存化 100 μg/ml の Vitex を処理し、48 時間培養した。細胞からタンパク質を抽出し、Caspase-3 活性は、caspase fluorometric assay kit (BioVision 社) を用いて測定した。データは平均 ± 標準偏差 (S.D.) で示した。* は Student's t-test の p 値が 5 % 未満であることを示す。文献 39 一部改変

4. 担がんマウスを用いた Vitex の抗腫瘍作用

Vitex は、*in vitro* で種々のがん細胞に対して増殖抑制作用を示すこと、さらに胃がんおよび大腸がんに対するアポトーシス誘導メカニズムが明らかになった。しかしながら、*in vivo* での作用は明らかになっていない。そこで、担がんマウスを作製し、Vitex 投与による抗腫瘍作用を検討した。雄性 KSN/Slc マウスに COLO 201 細胞を皮下注射により移植し、担がんマウスを作製した。移植 2 週間より Vitex を連日腹腔内投与し、腫瘍径を測定した。その結果、Vitex 未投与マウスと比較して Vitex 投与マウスでは腫瘍体積が減少した³⁹⁾。さらに、Vitex 投与 4 週後に腫瘍を摘出し、重量を測定したところ、Vitex 未投与マウスと比較して Vitex 投与マウスでは有意な腫瘍重量の減少が認められた (Fig. 9)³⁹⁾。以上のことから、Vitex によるがん細胞に対する増殖抑制が *in vitro* のみならず、*in vivo* でも認められることが明らかになった。

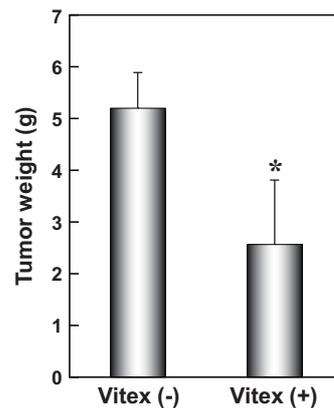


Fig. 9. COLO 201 細胞における Vitex 処理による caspase-3 活性化に及ぼす阻害剤の影響³⁹⁾

KSN ノードマウスに 5×10^6 cells の COLO 201 細胞を皮下移植し、2 週間飼育した。Vitex を連日 1 mg 腹腔内投与し、4 週間飼育した。マウスを安楽死後、腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。データは平均 ± 標準偏差 (S.D.) で示した。* は Student's t-test の p 値が 5 % 未満であることを示す。文献 39 一部改変

5. Vitex と既存の抗がん剤との比較・併用

最後に、既存の抗がん剤と Vitex による増殖抑制作用の強さを比較した。既存の抗がん剤として、消化器がん用に用いられるフッ化ピリミジン製剤である 5-FU および白金製剤である CDDP を選択した。まず、COLO 201 細胞に対する増殖抑制作用を検討した結果、5-FU および CDDP は 1 ~ 100 μM の範囲で有意な増殖抑制作用を示した⁴⁶⁾。その程度は、100 μg/ml の Vitex では約 70% 増殖を抑制したが、100 μM の 5-FU (13 μg/ml)

では約 50%、100 μ M (30 μ g/ml) の CDDP では約 90% 増殖を抑制した。さらに、アポトーシス誘導能を検討したところ、Vitex および CDDP 処理では DNA 断片化が観察されたが、5-FU 処理では DNA 断片化は認められなかった (Fig. 10)⁴⁶⁾。以上のことから、Vitex および CDDP は、COLO 201 細胞に対してアポトーシス依存的な増殖抑制を示すが、5-FU はアポトーシス非依存的に細胞増殖を抑制することが示された。さらに、10 μ g/ml の Vitex と 5-FU あるいは CDDP との併用による増殖抑制作用を検討した。その結果、10 μ M 5-FU と 10 μ g/ml Vitex の併用処理により 5-FU 単独時と比較して有意に増殖抑制作用の増強が認められたが、他の濃度の 5-FU との併用では有意な増強は認められなかった (Fig. 11)⁴⁶⁾。また、10 μ M 5-FU と 10 μ g/ml Vitex の併用による増殖抑制は、100 μ M 5-FU 単独処理での増殖抑制の程度と同程度であった。よって、両薬物の併用は、5-FU を 10 分の 1 に減量できることから 5-FU の副作用を軽減できる可能性が示された。一方、CDDP と Vitex の併用では有意な細胞増殖抑制作用の増強は認められなかった。以上のことから、Vitex は 5-FU ある

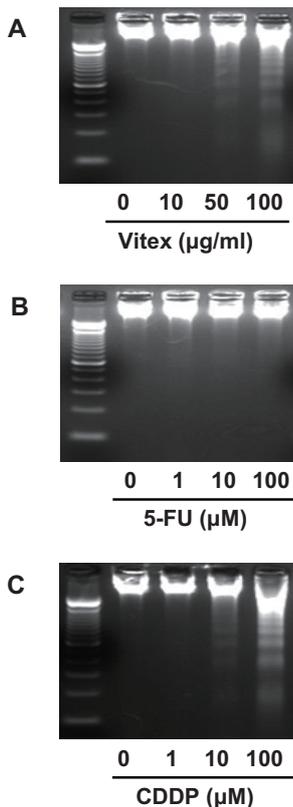


Fig. 10. COLO 201 細胞における Vitex、5-FU あるいは CDDP 処理によるアポトーシス誘導⁴⁶⁾

COLO 201 細胞に 1~100 μ g/ml の Vitex、1~100 μ M の 5-FU (0.13~13 μ g/ml) あるいは 1~100 μ M の CDDP (0.3~30 μ g/ml) を処理し、48 時間培養した。細胞から DNA を抽出し、DNA 断片化分析を行った。文献 46 一部改変

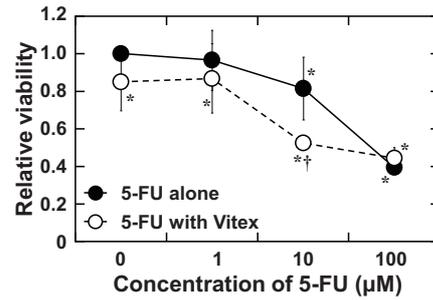


Fig. 11. COLO 201 細胞における 5-FU および Vitex 併用処理による細胞増殖抑制作用⁴⁶⁾

COLO 201 細胞に 10 μ g/ml の Vitex 存在下あるいは非存在下 1~100 μ M の 5-FU を処理し、48 時間培養した。細胞生存率を XTT 法により測定した。5-FU 単独は ● および 5-FU と Vitex の併用は ○ で示した。データは平均 \pm 標準偏差 (S.D.) で示した。* および † は Student's *t*-test の *p* 値が 5% 未満であることを示し、それぞれ control および 5-FU 単独と比較した結果を示す。文献 46 一部改変

いは CDDP より高い濃度 (μ g/ml) ではあるが COLO 201 細胞の増殖を抑制することが明らかになり、さらに 5-FU と Vitex の併用は 5-FU の減量を可能とすることが示唆された。5-FU の臨床での投与量としては、一般的な成人男性 (体重 60 kg) に対して、300~600 mg が投与されている。また、ヨーロッパでは Vitex の婦人科領域での投与量として、一日 20 mg が実際に経口投与されている²³⁾。Vitex の併用により 5-FU の投与量を 30~60 mg に減量して用いることで、5-FU の悪心・嘔吐などの主要な副作用が軽減できる可能性が示唆された。

おわりに

がんに対する治療薬の候補薬物の探索は、がん治療のために重要である。また、候補薬物として天然物由来物質に注目が集まっており、その抗腫瘍メカニズムの研究は分子標的薬のターゲット分子の探求にも有用であると考えられる。また、大腸がん、胃がんなど消化器系のがんによる死亡率が世界的にも高いことから、本稿では、*V. agnus-castus* 果実のエタノール抽出物 (Vitex) が消化器系がんの細胞増殖に及ぼす影響について概説した。Vitex は、*in vitro* で KATO-III および COLO 201 細胞に対してアポトーシスを誘導し、それぞれ酸化的ストレスおよび小胞体ストレスが関与することが明らかにした。また、Vitex の腹腔内投与により COLO 201 担がんマウスの腫瘍の増殖を抑制した。さらに、Vitex と 5-FU の併用処理は、COLO 201 細胞の増殖を 5-FU の処理濃度を 10 分の 1 に減量できることが明らかになった。*V. agnus-castus* からの抽出物は、欧州では婦人科領域における疾患の治療に臨床で用いられており⁴⁷⁾、副作用も軽微であることが報告されている²³⁾。よって、*V. agnus-castus* 果実の抽出物は、安全性の高い抗がん剤

あるいは抗がん剤との併用薬としての応用が期待される。

近年、すでに医薬品として用いられている天然物あるいは化合物を他の薬効を有する医薬品として開発する「ドラッグリポジショニング」の概念に基づいた研究が行われている。本稿で概説した *V. agnus-castus* の抗がん剤への応用研究もその一つである。これまでにプロポリスに含まれる caffeic acid phenethyl ester (CAPE) とその誘導体が脂質異常症改善作用を有することを報告しており⁴⁸⁾、CAPE 誘導体の難治がんへの

応用について検討を行っている。ドラッグリポジショニングを考慮した抗がん剤の探索を行うことで、安全な抗がん剤の開発につながるものと考えている。

謝辞

平成 27 年度星薬科大学大谷記念研究助成金を賜り、理事長の 大谷卓男先生ならびに学長の 田中隆治先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 厚生労働省. “人口動態統計”: < <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001138000>>, cited 5 September, 2016.
- 2) Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A., Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.*, **66**, 7-30 (2016)
- 3) Thirion P., Michiels S., Pignon J.P., Buyse M., Braud A.C., Carlson R.W., O'Connell M., Sargent P., Piedbois P., Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: an updated meta-analysis. *J. Clin. Oncol.*, **22**, 3766-3775 (2004)
- 4) Colucci G., Gebbia V., Paoletti G., Giuliani F., Caruso M., Gebbia N., Carteni G., Agostara B., Pezzella G., Manzione L., Borsellino N., Misino A., Romito S., Durini E., Cordio S., Di Seri M., Lopez M., Maiello E., Montemurro S., Cramarossa A., Lorusso V., Di Bisceglie M., Chiarenza M., Valerio M.R., Guida T., Leonardi V., Pisconti S., Rosati G., Carrozza F., Netti G., Valdesi M., Filippelli G., Fortunato S., Mancarella S., Brunetti C., Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J. Clin. Oncol.*, **23**, 4866-4875 (2005)
- 5) Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F., Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 2335-2342 (2004)
- 6) Meyerhardt J.A., Mayer R.J., Systemic therapy for colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, **352**, 476-487 (2005)
- 7) Rossi M., Negri E., Talamini R., Bosetti C., Parpinel M., Gnagnarella P., Franceschi S., Dal Maso L., Montella M., Giacosa A., La Vecchia C., Flavonoids and colorectal cancer in Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**, 1555-1558 (2006)
- 8) Aklilu M., Kindler H.L., Donehower R.C., Mani S., Vokes E.E., Phase II study of flavopiridol in patients with advanced colorectal cancer. *Ann. Oncol.*, **14**, 1270-1273 (2003)
- 9) Vickers A.J., How to design a phase I trial of an anticancer botanical. *J. Soc. Integr. Oncol.*, **4**, 46-51 (2006)
- 10) Toyama Y., Tanaka K., Konishi N., Mohri Y., Tonouchi H., Miki C., Kusunoki M., Administration sequence-dependent antitumor effects of paclitaxel and 5-fluorouracil in the human gastric cancer cell line MKN45. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **57**, 368-375 (2006)
- 11) Huerta S., Goulet E.J., Livingston E. H., Colon cancer and apoptosis. *Am. J. Surg.*, **191**, 517-526 (2006)
- 12) Zhu K., Fukasawa I., Furuno M., Inaba F., Yamazaki T., Kamemori T., Kousaka N., Ota Y., Hayashi M., Maehama T., Inaba N., Inhibitory effects of herbal drugs on the growth of human ovarian cancer cell lines through the induction of apoptosis. *Gynecol. Oncol.*, **97**, 405-409 (2005)
- 13) Tillman D.M., Petak I., Houghton J.A., A Fas-dependent component in 5-fluorouracil/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.*, **5**, 425-430 (1999)
- 14) Ko C.H., Shen S.C., Lee T.J., Chen Y.C., Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, **4**, 281-290 (2005)
- 15) Wai P.Y., Mi Z., Guo H., Sarraf-Yazdi S., Gao C., Wei J., Marroquin C.E., Clary B., Kuo P.C., Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses in vitro and in vivo CT26 murine colon adenocarcinoma metastasis. *Carcinogenesis*, **26**, 741-751 (2005)
- 16) Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S., Ferrara N., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, **362**, 841-844 (1993)
- 17) Huang S.M., Bock J.M., Harari P.M., Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.*, **59**, 1935-1940 (1999)
- 18) Kim R., Emi M., Arihiro K., Tanabe K., Uchida Y., Toge T., Chemosensitization by STI571 targeting the platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor-signaling pathway in the tumor progression and angiogenesis of gastric carcinoma. *Cancer*, **103**, 1800-1809 (2005)
- 19) Agarwal B., Bhendwal S., Halmos B., Moss S.F., Ramey W.G., Holt P.R., Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, **5**, 2223-2229 (1999)
- 20) Chen X.X., Lai M.D., Zhang Y.L., Huang Q., Less cytotoxicity to combination therapy of 5-fluorouracil and cisplatin than 5-fluorouracil alone in human colon cancer cell lines. *World J. Gastroenterol.*, **8**, 841-846 (2002)

- 21) Roemheld-Hamm B., Chasteberry. *Am. Fam. Physician.*, **72**, 821-824 (2005)
- 22) Hobbs C., "Vitex: The Women's Herbs", ed. By Miovic, M., Botanica Press in CA (1996)
- 23) Schellenberg R., Treatment for the premenstrual syndrome with agnus castus fruit extract: prospective, randomised, placebo controlled study. *BMJ*, **322**, 134-137 (2001)
- 24) Hirobe C., Palevitch D., Takeya K., Itokawa H., Screening test for antitumor activity of crude drugs. *Natural Medicines*, **48**, 168-170 (1994)
- 25) Hirobe C., Qiao Z.S., Takeya K., Itokawa H., Cytotoxic flavonoids from Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*, **46**, 521-524 (1997)
- 26) Kuruüzüm-Uz A., Ströch K., Demirezer L.Ö., Zeeck A., Glucosides from Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*, **63**, 959-964 (2003)
- 27) Ohyama K., Akaike T., Hirobe C., Yamakawa T., Cytotoxicity and apoptotic inducibility of Vitex agnus-castus fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 10-18 (2003)
- 28) Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, **26**, 239-257 (1972)
- 29) Vaux D.L., Korsmeyer S. J., Cell death in development. *Cell*, **96**, 245-254 (1999)
- 30) Wyllie A.H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556 (1980)
- 31) Thompson C.B., Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1459 (1995)
- 32) Proskuryakov S.Y., Konoplyannikov A.G., Gabai V.L., Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp. Cell Res.*, **283**, 1-16 (2003)
- 33) Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.*, **148**, 2207-2216 (1992)
- 34) Cohen G.M., Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, **326**, 1-16 (1997)
- 35) Ohyama K., Akaike T., Imai M., Toyoda H., Hirobe C., Bessho T., Human gastric signet ring carcinoma (KATO-III) cell apoptosis induced by Vitex agnus-castus fruit extract through intracellular oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1496-1510 (2005)
- 36) Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Krammer P.H., Peter M.E., Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, **17**, 1675-1687 (1998)
- 37) Kaufmann S.H., Hengartner M.O., Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.*, **11**, 526-534 (2001)
- 38) Rao R.V., Hermel E., Castro-Obregon S., del Rio G., Ellerby L.M., Ellerby H.M., Bredesen D.E., Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33869-33874 (2001)
- 39) Imai M., Yuan B., Kikuchi H., Saito M., Ohyama K., Hirobe C., Oshima T., Hosoya T., Morita H., Toyoda H., Growth inhibition of a human colon carcinoma cell, COLO 201, by a natural product, Vitex agnus-castus fruits extract, in vivo and in vitro. *Adv. Biol. Chem.*, **2**, 20-28 (2012)
- 40) Imai M., Kikuchi H., Denda T., Ohyama K., Hirobe C., Toyoda H., Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: a potential natural anti-cancer substance. *Cancer Lett.*, **276**, 74-80 (2009)
- 41) Berridge M.J., The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, **32**, 235-249, (2002)
- 42) Leung H.W., Wu C.H., Lin C.H., Lee H.Z., Luteolin induced DNA damage leading to human lung squamous carcinoma CH27 cell apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.*, **508**, 77-83 (2005)
- 43) Liu X., Peyton K.J., Ensenat D., Wang H., Schafer A.I., Alam J., Durante W., Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle. Role in cell survival. *J. Biol. Chem.*, **280**, 872-877 (2005)
- 44) Shen Y., Meunier L., Hendershot L.M., Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15947-15956 (2002)
- 45) Lee H.J., Wang C.J., Kuo H.C., Chou F.P., Jean L.F., Tseng T.H., Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **203**, 124-131 (2005)
- 46) Imai M., Kikuchi H., Yuan B., Aihara Y., Mizokuchi A., Ohyama K., Hirobe C., Toyoda H., Enhanced growth inhibitory effect of 5-fluorouracil in combination with Vitex agnus-castus fruits extract against a human colon adenocarcinoma cell line, COLO 201. *J. Chin. Clin. Med.*, **6**, 14-19 (2011)
- 47) Berger D., Schaffner W., Schrader E., Meier B., Brattström A., Efficacy of Vitex agnus castus L. extract Ze 440 in patients with pre-menstrual syndrome (PMS). *Arch. Gynecol. Obstet.*, **264**, 150-153 (2000)
- 48) Imai M., Kumaoka T., Hosaka M., Sato Y., Li C., Sudoh M., Tamada Y., Yokoe H., Saito S., Tsubuki M., Takahashi N. Inhibitory effects of hydroxylated cinnamoyl esters on lipid absorption and accumulation. *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 3788-3795 (2015)

Apoptosis induction by natural products in cancer cells

Masahiko IMAI

Affiliation: Department of Health Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences

Vitex agnus-castus is a shrub of the Lamiaceae family (previously known as Verbenaceae family) and found naturally in the Middle East and Southern Europe. Ripe fruit of *V. agnus-castus* has been used to treat patients with various obstetric and gynecological disorders in Europe. An extract from dried ripe *V. agnus-castus* (Vitex) exhibits cytotoxic activities against various types of solid tumor cells, such as KATO-III and COLO 201 cells. The mechanism of apoptosis induction in KATO-III cells was intracellular oxidative stress and mitochondrial membrane damage with Vitex-treatment. On the other hand, Vitex induced apoptosis mediated through endoplasmic reticulum stress in COLO 201 cells. In addition, the administration of Vitex significantly suppressed tumor growth in COLO 201 xenografted mice. Furthermore, an enhanced antiproliferative effect was achieved by a combinational use of 5-FU and Vitex. These results suggest that Vitex is a promising candidate supplement for enhancing clinical efficacy of conventional anticancer agents in order to reduce side effects of these agents.

【利益相反】

開示すべき利益相反はない