生薬抽出エキスおよび生薬由来化合物による終末糖化産物蓄積化膵癌株化細胞の GSK-3β 発現の抑制効果およびジェムシタビンの奏効率の上昇

（申請代表者）　高田尊信　金沢医科大学総合医学研究所
先端医療研究領域糖化制御研究分野　助教
（共同研究者）　竹内正義　金沢医科大学総合医学研究所
先端医療研究領域糖化制御研究分野　教授
（共同研究者）　元雄良治　金沢医科大学医学部腫瘍内科学講座　教授

【背景・目的】

近年、GSK-3βと癌の関連性について、従来の説とは異なる新たな報告がなされた (Cancer Sci. 98: 1388, 2007)。従来は、GSK-3βはβ-cateninを抑制することで癌を抑制する蛋白質であると考えられていたが、GSK-3β自身が癌促進に作用する可能性があるという報告である。□-cateninは細胞質から一部が核内移行し、遺伝子発現を誘導し細胞増殖を誘導する。この□-cateninは、Wntシグナルが活性化していない状態では、GSK-3□-Axin-casein kinase (CK)-Adenomatous polyposis coil (APC) の複合体を形成して、リン酸化される。□-cateninは複合体から離れた後でもリン酸化状態を保っており、ユビキチン化を受け分解されていく。GSK-3βによる□-cateninの抑制とは、このユビキチン化分解促進によるものであり、この作用機序によってGSK-3βは癌抑制因子と考えられていた。それに対して、GSK-3βが□-cateninとは異なる経路で癌促進の機能を持つ可能性が提唱され、株化結腸癌細胞や株化膵管癌細胞を用いたin vitro実験においてGSK-3βを阻害することにより癌細胞の増殖を抑制したという報告がなされた (Cancer Sci. 98: 1388, 2007; J. Gastroenterol. 47: 321, 2012)。

一方で、報告者は終末糖化産物が人体に及ぼす影響を研究している。特に高血糖患者において終末糖化産物が、多くの臓器に有害作用をもたらすことに着目し、中でも膵臓細胞内で終末糖化産物が生成・蓄積することで生じる現象をin vitroで研究をしている。

そこで、本研究においては、「終末糖化産物を蓄積した株化膵管癌細胞」 (以下、AGEs蓄積細胞) に対して、GSK-3β発現抑制およびジェムシタビンの奏効率の上昇を誘導する生薬抽出エキスおよび生薬由来化合物を探索することを『最終目標』に据え、生薬抽出エキスおよび生薬由来化合物の細胞毒性スクリーニングから研究を始めることとした。

【結果・考察】

膵癌の90%を占めるのは膵管癌であることから、今回の実験にはPANC-1ヒト膵管癌由来培養細胞を用いることとした。

96 well plateに播種したPANC-1に終末糖化産物を蓄積させてAGEs蓄積細胞とし、その後に生薬抽出エキスおよび生薬由来化合物 (以下、生薬エキス等) を添加し、さらにジェムシタビンを添加した後にWST-8試薬を添加して吸光度測定により求める計画であった。

報告者は、最初に生薬エキス等そのもののPANC-1 (AGEs蓄積細胞ではない、通常のPANC-1。以下同じ) に対する細胞毒性を調べる必要があると判断した。

生薬エキス等がGSK-3β発現抑制作用を有するのであれば、その単独添加においても抗癌作用を示すはずであるから、スクリーニング段階で強い細胞毒性を示した生薬エキス等をGSK-3β発現抑制作用検討の候補とすることとした。

一方、生薬エキス等の単独添加のみでも細胞生存率が大幅に低下する状態であると、ジェムシタビンを添加した場合に、吸光度測定の時点では細胞がほとんど生存しない結果になる可能性もあり、この場合は生薬エキス等プレトリートメントによるジェムシタビンの効果を検討するのに不適当である。

対して高濃度でPANC-1に添加しても、ほとんど細胞毒性を示さないか、弱い毒性しか示さない生薬エキス等は、そのままの濃度でAGEs蓄積細胞に対してプレトリートメントとして添加し、さらにジェムシタビンを添加する実験を実施できる可能性が高いと判断した。
このため、生薬エキス等を細胞に添加するのに適した濃度の検討が必要となり、最初にスクリーニング実験を行うこととした。96 well plateに播種したPANC-1に対して、生薬エキス等を添加して細胞生存率を測定することとした。
また、細胞毒性の強弱のみのスクリーニングで生薬抽出エキスをグループ化するだけでなく、高血糖状態が、血液内や細胞内の終末糖化産物の増加をもたらすことから、「血糖降下作用」を持つとされる生薬抽出エキスについてはスクリーニングの後、優先してn=3の細胞毒性試験を行った。
なお、高血糖患者モデルの実験系とするために、PANC-1の継代および実験時に使用した培地は「高グルコース培地 (4.5 g/LのD-MEM)」を選択した。

(生薬抽出エキス)
生薬抽出エキスは、富山大学和漢医薬学総合研究所より10 mg/mlの水溶液の状態で提供された。第1段階として、すべての生薬抽出エキスを0.22 µmのフィルターでろ過滅菌した。第2段階として、96 well plateに1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) になるようにPANC-1を播種して、最終濃度300 µg/mlの生薬抽出エキス (112種) を添加して細胞毒性を調べた。具体的にはPANC-1を播種してから24時間後に培地を除去し、97 µlの新しい培地を加え、controlとしての滅菌水および生薬抽出エキスを3.0µl加えた。この時、細胞が存在しない培地のみのplateにも生薬抽出エキスを加えてblank用とした (以下の実験操作でも同じ)。300 µg/mlという濃度設定は、生薬抽出エキスとしての細胞毒性の検討に用いられる一般的な濃度および、培地中に含まれることになる滅菌水が細胞に与える影響を考慮して決定した。
この結果、インチンコウ (1)、オウゴン (6)、オウレン (8)、ガイヨウ (10)、ケイケットウ (25)、コウボク (31)、ジコッピ (49)、ソヨウ (65)、ダイオウ (66)、タンジン (69)、チョウコウトウ (73)、ビンロウジ (93)、マオウ (101)、モッコウ (104)、レンギョウ (112) は、細胞生存率0%～28%という強い細胞毒性を示した (Table 1)。

Table 1 300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加した1500 cells/wellのPANC-1の細胞生存率

番号	生薬抽出エキス	細胞生存率 (%)
1	インチンコウ	6
6	オウゴン	8
8	オウレン	0
10	ガイヨウ	9
25	ケイケットウ	12
31	コウボク	7
49	ジコッピ	12
65	ソヨウ	9
66	ダイオウ	12
69	タンジン	15
73	チョウコウトウ	28
93	ビンロウジ	7
101	マオウ	5
104	モッコウ	1
112	レンギョウ	0

最終濃度300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。

次に、上記の15種の生薬抽出エキスについて、1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) のPANC-1に対し最終濃度10, 30, 100, 300 µg/mlの4つの濃度における細胞毒性試験を行った。100 µg/mlの濃度では細胞生存率70%未満になったのは13種であり、細胞生存率50%未満になったのはインチンコウ (1)、オウゴン (6)、ガイヨウ (10)、

ケイケットウ (25)、コウボク (31)、ジコッピ (49)、レンギョウ (112) の 7種であった。10 μg/mlの濃度で、細胞生存率80%未満を示したのはインチンコウ (1) とモッコウ (104) のみであった (Table 2)。

Table 2　10, 30, 100, 300 μg/mlの生薬抽出エキスを添加した1500 cells/wellのPANC-1の細胞生存率 (N=1)

番号	生薬抽出エキス	エキス濃度 (μg/ml)	細胞生存率 (%)	番号	生薬抽出エキス	エキス濃度 (μg/ml)	細胞生存率 (%)
1	インチンコウ	10	79	66	ダイオウ	10	107
		30	102			30	145
		100	38			100	60
		300	0			300	18
6	オウゴン	10	84	69	タンジン	10	84
		30	101			30	120
		100	44			100	69
		300	0			300	13
8	オウレン	10	89	73	チョウコウトウ	10	98
		30	126			30	122
		100	67			100	66
		300	0			300	0
10	ガイヨウ	10	100	93	ビンロウジ	10	95
		30	100			30	116
		100	15			100	92
		300	7			300	19
25	ケイケットウ	10	119	101	マオウ	10	118
		30	81			30	68
		100	12			100	10
		300	12			300	155
31	コウボク	10	119	104	モッコウ	10	79
		30	113			30	105
		100	4			100	92
		300	8			300	12
49	ジコッピ	10	113	112	レンギョウ	10	93
		30	118			30	118
		100	3			100	14
		300	1			300	7
65	ソヨウ	10	119				
		30	103				
		100	64				
		300	0				

最終濃度10, 30, 100, 300 μg/mlの生薬抽出エキスを添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。

続いて、plateへの細胞播種を2倍にした場合の、上記15種の生薬抽出エキスの濃度依存的な細胞毒性のスクリーニングを行った。3000 cells/well (9.6×104 cells/cm2) のPANC-1に対し最終濃度10, 30, 100, 300 μg/mlの4つの濃度における細胞毒性試験を行った。300 μg/mlの濃度で60%未満の細胞生存率を示したのは、オウゴン (6)、オウレン (8)、ガイヨウ (10)、ケイケットウ (25)、コウボク (31)、ジコッピ (49)、レンギョウ (112) の7種であった。

オウゴン (6)、コウボク (31)、ジコッピ (49) の細胞毒性は大変強く、300 µg/mlの濃度で細胞生存率は0%～4%であった (Table 3)。

Table 3 10, 30, 100, 300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加した3000 cells/wellのPANC-1の細胞生存率 (N=1)

番号	生薬抽出エキス	エキス濃度 (µg/ml)	細胞生存率 (%)	番号	生薬抽出エキス	エキス濃度 (µg/ml)	細胞生存率 (%)
1	インチンコウ	10	124	66	ダイオウ	10	119
		30	134			30	126
		100	190			100	171
		300	150			300	153
6	オウゴン	10	118	69	タンジン	10	165
		30	97			30	142
		100	3			100	154
		300	1			300	136
8	オウレン	10	114	73	チョウコウトウ	10	130
		30	127			30	127
		100	77			100	150
		300	55			300	196
10	ガイヨウ	10	134	93	ビンロウジ	10	142
		30	119			30	122
		100	144			100	128
		300	12			300	68
25	ケイケットウ	10	134	101	マオウ	10	191
		30	162			30	124
		100	122			100	149
		300	24			300	155
31	コウボク	10	184	104	モッコウ	10	143
		30	179			30	107
		100	147			100	104
		300	4			300	113
49	ジコッピ	10	152	112	レンギョウ	10	100
		30	151			30	84
		100	75			100	84
		300	0			300	0
65	ソヨウ	10	145				
		30	171				
		100	135				
		300	98				

最終濃度10, 30, 100, 300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。

インチンコウ (1)、ダイオウ (66)、タンジン (67)、チョウコウトウ (73)、マオウ (101)、モッコウ (104) の6種は300 µg/mlの濃度において、113%～196%の細胞生存率を示した。wellに播種された細胞数が2倍になることで、同じく300 µg/mlという高濃度であっても細胞毒性を示さず、むしろ細胞増殖率が向上する可能性が示唆された。こ

れらの結果から、生薬抽出エキスの濃度の条件だけでなく、細胞播種数の条件検討も必要であることが考えられた。

次に、1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) に対する最終濃度300 µg/mlのスクリーニングにおいて細胞毒性を示さず、逆に強い細胞増殖も示すことがなかった生薬抽出エキス14種について、n=3で細胞毒性試験を行った。細胞増殖を示した生薬抽出エキスを除外したのは、癌促進傾向の可能性があるものを除外するためである。ガジュツ (12)、カッコン (13)、キョウカツ (20)、サンシチニンジン (42)、サンソウニン (45)、ジオウ (47)、センブリ (60)、チクセツニンジン (70)、チモ (71)、テンマ (76)、トウキ (78)、トウジン (79)、ハンゲ (89)、ヤクチ (106)の14種の細胞毒性試験の結果、いずれも細胞毒性も細胞増殖促進作用も認められなかった (Table 4)。

Table 4 300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加した1500 cells/wellのPANC-1の細胞生存率

番号	生薬抽出エキス	細胞生存率 (%)	Dunnet-t
12	ガジュツ	101	N.S.
13	カッコン	93	N.S.
24	キョウカツ	111	N.S.
42	サンシチニンジン	105	N.S.
45	サンソウニン	106	N.S.
47	ジオウ	91	N.S.
64	センブリ	121	N.S.
70	チクセツニンジン	95	N.S.
71	チモ	107	N.S.
76	テンマ	111	N.S.
78	トウキ	111	N.S.
79	トウジン	90	N.S.
106	ヤクチ	103	N.S.

最終濃度300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。Dunnet-t検定で統計処理を行い、データは平均値を表示した (N=3、N.S.; non significant)。

最後に、血糖降下作用を持つ生薬抽出エキスについて、n=3で細胞毒性試験を行った。ニンジン (84)、ブクリョウ (94)、レイシ (111) をサンプルとした。1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) のPANC-1に対して、3サンプルとも最終濃度300 µg/ml の条件を設定したが、同濃度のスクリーニングでレイシ (111) には強い細胞毒性が認められたため 最終濃度150 µg/mlの条件でも実験を行った。ニンジン (84) とブクリョウ (94) は細胞毒性を示さなかった。レイシ (111) は300 µg/mlでは細胞生存率が64% ($p<0.05$) であった。しかし濃度を150 µg/mlでは細胞毒性は認められなかった (Table 5)。

Table 5 300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加した1500 cells/wellのPANC-1の細胞生存率

番号	生薬抽出エキス	エキス濃度 (µg/ml)	細胞生存率 (%)	Dunnet-t
84	ニンジン	300	113	N.S.
94	ブクリョウ	300	107	N.S.
111	レイシ	150	100	N.S.
		300	64	$p<0.05$

最終濃度300 µg/mlの生薬抽出エキスを添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。Dunnet-t検定で統計処理を行い、データは平均値を表示した (N=3、N.S.; non significant)。

（生薬由来化合物）
生薬由来化合物94種 (当初の実験計画では96種であったが、欠品が2種) について、1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) のPANC-1に対するスクリーニングによる細胞毒性試験を行った。富山大学和漢医薬学総合研究所より送付された生薬抽出化合物は10 mMの濃度でDMSOに溶解されていたため、細胞毒性試験に適した生薬化合物の濃度および培地中に含まれるDMSO濃度を考慮して、最終濃度50 µMになるように96 well plateに添加した (DMSOの最終濃度が0.5%になるようにPBSで生薬由来化合物のDMSO溶液を希釈してからplateに添加した)。その結果、細胞生存率が67%以下になった生薬由来化合物は42種であった (Table 6)。

Table 6 50 µMの生薬由来化合物を添加した1500 cells/wellのPANC-1の細胞生存率　(N=1)

番号	生薬由来化合物	細胞生存率 (%)	番号	生薬由来化合物	細胞生存率 (%)
3	アリソールA	61	43	エボジアミン	64
4	アリソールB	11	44	(E)-フェルラ酸	62
5	アルカニン	9	53	ギンセンノシドRe	65
8	アストラガロシドIV	63	54	グラブリジン	8
11	硫酸アトロピン	66	59	ヒルスチン	31
12	アウクビン	63	60	ホノキオール	2
13	バイカレイン	10	62	イカリイン	61
14	バイカリン	7	64	イソカリンコフィリン	65
16	塩酸ベリルドイルメサコリン	67	69	ルテオリン	42
20	ブファリン	3	70	マグノロール	5
21	ブタホリン	8	72	ナリンギン	60
25	(E)-クロルゲン酸	47	77	ペオノール	64
27	シノブファギン	5	83	ロスマリン酸	5
28	シノブタホリン	9	84	サイコサポニンa	6
29	塩化コブチシン	67	85	サイコサポニンb2	53
30	コリダリン	63	86	サイコサポニンc	67
31	コスツノリド	6	87	サイコサポニンd	3
32	クルクミン	44	93	シノメニン	62
34	デヒドロコスツラクトン	6	94	スウェルチアマリン	67
35	デメトキシクルクミン	26	95	チモサポニンA-III	59
39	没食子酸エピガロカテキン	8	96	オウゴニン	63

最終濃度50 µMの生薬由来化合物を添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。

続いて、3000 cells/well　(9.6×104 cells/cm2) のPANC-1に対する、最終濃度50 µMの生薬由来化合物のスクリーニングによる細胞毒性試験を行った。細胞生存率が67%以下になった生薬由来化合物はアリソールB (4)、アルカニン (5)、バイカレイン (13)、バイカリン (14)、ブファリン (20)、ブタホリン (21)、シノブファギン (27)、シノブホタリン (28)、コスツノリド (31)、クルクミン (32)、デヒドロコスツラクトン (34)、没食子酸エピガロカテキン (39)、[6]-ギングロール (48)、グラブリジン (54)、ヒルスチン (59)、ホノキオール (60)、イカリイン (62)、マグノロール (70)、ナリンギン (72)、ペリルアルデヒド (79)、プラエルプトリン (80)、ロスマリン酸 (83)、サイコサポニンa (84)、サイコサポニンd (87) の23種であった (Table 7)。

Table 7 50 µMの生薬由来化合物を添加した3000 cells/wellのPANC-1の細胞生存率　(N=1)

番号	生薬由来化合物	細胞生存率 (%)

4	アリソールB	1
5	アルカニン	1
13	バイカレイン	9
14	バイカリン	5
20	ブファリン	4
21	ブタホリン	9
27	シノブファギン	4
28	シノブタホリン	3
31	コスツノリド	4
32	クルクミン	64
34	デヒドロコスツラクトン	2
39	没食子酸エピガロカテキン	6
48	[6]-ギングロール	53
54	グラブリジン	3
59	ヒルスチン	65
60	オノキオール	2
70	マグノロール	13
72	ナリンギン	57
79	ペリルアルデヒド	2
80	プラエルプトリンA	50
83	ロスマリン酸	57
84	サイコサポニンa	0
87	サイコサポニンd	57

最終濃度50 µMの生薬由来化合物を添加して24時間後に培地交換をし、マイクロプレートリダーにより450 nmと650 nmの吸収波長を測定し、(sampleのA450-A650)／(controlのA450-A650)×100をcontrolに対する細胞生存率とした。

バイカレイン (13) とバイカリン (14) の細胞毒性は強力で、3000 cells/well (9.6×104 cells/cm2) においても、それぞれ細胞生存率が9%と5%であった。両化合物は生薬抽出エキス「オウゴン (6)」に含有されることが知られる化合物であり、オウゴンエキスが強力な細胞毒性を示した事実との相関が示唆される。

1500 cells/well (4.8×104 cells/cm2) のPANC-1に対して、サンシチニンジン (42)、チクセツニンジン (70)、ニンジン (84)、トウジン (79) などのジンセンノシド類やサイコサポニン類を含有する生薬抽出エキスが300 µg/mlの濃度でも細胞毒性を示さなかったにも関わらず、それらに含有されるジンセンノシドRe (53)、サイコサポニンa (84)、サイコサポニンb2 (85)、サイコサポニンc (86)、サイコサポニンd (87) を添加した場合に細胞生存率が67%以下になったこと、3000 cells/well (9.6×104 cells/cm2) のPANC-1に対する細胞毒性試験でもサイコサポニンa (84) とサイコサポニンd (87) は細胞生存率が67%以下になったことから、今後の生薬抽出エキスと生薬由来化合物を関連付けて実験を実施するためには、濃度の検討が必要であることが示唆された。

【結論】

3000 cells/well (9.6×104 cells/cm2) のPANC-1に対し最終濃度300 µg/mlの濃度で細胞生存率60%未満を示した生薬抽出エキスはオウゴン (8)、ガイヨウ (10)、ケイケットウ (25)、コウボク (31)、ジコッピ (49)、レンギョウ (112) の7種であった。3000 cells/well (9.6×104 cells/cm2) のPANC-1に対し最終濃度50 µMの濃度で細胞生存率が67%以下になった生薬由来化合物はアリソールB (4)、アルカニン (5)、バイカレイン (13)、バイカリン (14)、ブファリン (20)、ブタホリン (21)、シノブファギン (27)、シノブホタリン (28)、コスツノリド (31)、クルクミン (32)、デヒドロコスツラクトン (34)、没食子酸エピガロカテキン (39)、[6]-ギングロール (48)、グラブリジン (54)、ヒルスチン (59)、ホノキオール (60)、イカリイン (62)、マグノロール (70)、ナリンギン (72)、ペリルアルデヒド (79)、プラエルプトリン (80)、ロスマリン酸 (83)、サイコサポニンa (84)、サイコサポニンd (87) の23種であった。これら

の生薬抽出エキスおよび生薬由来化合物に、GSK-3β阻害作用があるかを今後検討すべきである。
TAGE蓄積細胞に対して、「細胞毒性を示さない生薬抽出エキスによるプレトリートメント実験」を実施する場合に、最終濃度300 μg/mlのままで実施可能な生薬抽出エキス候補として、ガシュツ (12)、カッコン (13)、キョウカツ (20)、サンシチニンジン (42)、サンソウニン (45)、ジオウ (47)、センブリ (60)、チクセツニンジン (70)、チモ (71)、テンマ (76)、トウキ (78)、トウジン (79)、ニンジン (84)、ハンゲ (89)、ブクリョウ (94)、ヤクチ (106) の16種が挙げられる。今後、TAGE蓄積化PANC-1において同様の実験を行う必要がある。
オウゴン抽出エキス (6) は強力な細胞毒性を示し、オウゴンから単離された化合物であるバイカレイン (13) とバイカリン (14) もまた強力な細胞毒性を示した。バイカレイン (13) およびバイカリン (14) がBx-PC3ヒト株化膵腺癌細胞に対して細胞毒性をもつことはすでに報告されており (Cancer Lett. 86: 91, 1994)、本研究において強い細胞毒性を示したオウゴン(6) の細胞毒性の活性物質が、バイカレイン (13) やバイカリン (14) である可能性も今後検討すべきである。