秋田県産の海藻・果実の抽出物による

マスト細胞とがん細胞に対する増殖抑制効果

応用生物科学科　泉　睦勝
伊藤　亮伯
吹谷　芳博
指導教員　阿部　達也
吉澤　結子

１．はじめに

果実はビタミン C やフラボノイドなど生理活性物質を多く含んでいて、果実などの抽出物による細胞を使った生理活性物質検索の研究は現在でも多く行われている。

秋田県産の植物についての研究は、２２種類の食用山菜抽出物による HL60 細胞の分化誘導活性が調べられている。果実、海藻の抽出物によるマスト細胞の脱顆粒抑制効果は既に一部調べられているが今回は、秋田県産の果実、海藻の抽出物の中にマスト細胞（MC/9）やがん細胞(HL60、LS174T)の増殖抑制効果を持つ物質が存在するかどうかを調べる試験的な研究をした。

このレポートでは今回のサンプルの中で興味深いデータを出したマタタビに注目し、マタタビの抽出物は HL60 細胞にアポトーシスを誘導することを報告する。

２．材料と方法

・果実・海藻抽出物

すべての果実・海藻は秋田県内で収穫した。果実・海藻 10ｇ当りに 30mlPBS を加えミキサーで均一に破砕した。この破砕液をろ紙で濾過したものをストック溶液とし、-30℃で保存しておいた。実験で使用する際には､このストック溶液を 0.2μm のフィルターで滅菌した。

・細胞

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 は秋田県総合食品研究所の畠恵司氏から頂いた。ヒト結腸がん細胞株 LS 174T ,ヒト正常表皮繊維芽細胞は大日本製薬から購入した。マウス胎児の肝臓から得られたマスト細胞 MC/9 は American Type Culture Collectio から購入した。それぞれの細胞は指示された最適条件で培養維持された。

・細胞増殖測定法 (MTT assay)

細胞の増殖は、比色法のひとつである MTT 法により測定した。96 well プレートに果実・海藻の PBS 抽出液を 1 well 当り 0.02ml ずつ入れた。コントロールに PBS のみを用いた。各 well に６-８×10^4cell/ml medium の細胞懸濁液を 0.2 ml 加え　CO_2インキュベーターで３日間培養した。その後、各 well に 0.02 ml の MTT 溶液 ,3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma,5mg/ml in PBS)を加え CO_2インキュベーターでさらに 4 時間培養した。96 well プレートを遠心し、各 well から上清を 0.15ml 除いた。PBS 0.15ml で各 well 中の沈殿を洗い再び

遠心した。上清を 0.15ml 除き 0.04N HCl in isopropanol を 0.15ml 加え 10-20 分よく攪拌して沈殿を溶かした。Microplate reader Model 550 (Bio-Rad, Japan) をもちいて各 well 中の溶液の吸光度　A_{570} を測定し、%Inhibition をもとめた。

% Inhibition=[1－(サンプルの A_{570}－ブランクの A_{570})/(コントロールの A_{570}－ブランクの A_{570})]×100　　　(ブランクは PBS のみ)

・マタタビ中の活性物質の特徴

マタタビ抽出液を０℃、３７℃、９８℃で三十分加熱し、その後加熱したマタタビ抽出液の HL-60 に対する増殖抑制活性を MTT 法により測定した。別のマタタビ抽出液をセファデックス G25-column(PD-10,Pharmacia)を使い、分子量の大きいフラクションと小さいフラクションに分けた。各フラクションの HL-60 に対する増殖抑制活性を測定した。

・アポトーシスの検出

24 well プレートにて HL-60 の培地懸濁液(2.5×10^5 cells / ml) 2ml に異なる濃度のマタタビ抽出液 0.2 ml を加え、CO_2 インキュベーターで２日間培養した。その後、細胞をチューブに移して遠心した後、 2% glutaraldehyde で固定した。これを Hoechst 33342 (1mg/ml, Sigma) 1 μで染色し核の形態的な変化を蛍光顕微鏡 (Nicon,Eclipse E800,Japan)で観察した。

別の試験では、HL-60　DNA のマタタビ抽出液による断片化を調べた。マタタビ抽出液を加えた培地で培養した HL-60　10^6 cells をから常法により DNA を抽出した。抽出 DNA をアガロースゲル電気泳動にかけた後 ethidium bromide で染色しイメージアナライザー LAS-1000plus (Fujifilm,Japan)により写真を撮影した。

マタタビ抽出液で処理した HL-60 を TUNEL 法により調べ、アポトーシスの確認をした。TUNEL 法は In Situ Cell Death Detection Kit ,Fluorescein (Boehringer　Mannheim,Tokyo)を用いて行い、アポトーシスの度合いをフローサイトメトリー (FACSCalibur,Becton Dickinson,USA)で測定した。

３．結果

今回の研究で比較的強い細胞増殖阻害活性があったのは果実ではマタタビ、ナツハゼ、コマガタケスグリ、クロスグリ、海藻ではケウルシグサ、テングサ、マクサ、オゴノリ、ツルアラメ、オキツノリ、アカモク、ウミトラノオ、ヨレモク、アマモとマカブであった(Table 1)。特に活性の強かったマタタビに注目し、さらに検討した。はじめに、マタタビ抽出液の濃度・ HL-60 の培養日数を変化させたときの、増殖抑制活性をみた(Fig-1)。 Fig-1 に示したようにマタタビ抽出液は濃度と時間に依存して HL-60 に対する増殖抑制効果をもつことがわかった。

マタタビ抽出液を 0℃､37℃､98℃で加熱したあとの増殖抑制効果を Table 2 に示す。この結果と Sephadex G-column にてマタタビ抽出液を高分子量・低分子量の分画に分けたときの各分画の増殖抑制活性の測定結果から、マタタビに含まれる活性物質は、熱に強く､低分子量であることが分かった。

Table 1 MTT 法による HL60 細胞増殖阻害活性測定

果実		海藻	
植物名	活性	植物名	活性
マタタビ(北海道産)	98.7 ±1.2	ミル	55.3 ±7.2
マタタビ(阿仁町産)	98.8 ±0.7	コノハノリ	-0.8 ±15.5
マタタビ（モクテンリョウ）	98.6 ±0.7	ケウルシグサ	83.9 ±15.5
ブルーベリー	33.7 ±12.3	アミジグサ	20.8 ±6.1
ナツハゼ	97.0 ±3.2	エゾヤハズ	41.5 ±47.0
マルスグリ(完熟)	76.9 ±18.4	テングサ	80.3 ±2.2
マルスグリ(半熟)	43.8 ±23.8	マクサ	92.7 ±1.4
マルスグリ(未熟)	56.9 ±34.1	ツノマタ	1.5 ±5.2
コマガタケスグリ	97.4 ±1.5	オゴノリ	97.4 ±0.7
エゾスグリ	43.3 ±4.1	フダラク	4.3 ±7.9
クロスグリ	80.2 ±22.5	ツルアラメ	95.7 ±0.3
フサスグリ	39.9 ±28.0	オキツノリ	81.9 ±18.5
スモモ	8.7 ±16.8	イソムラサキ	17.0 ±8.5
アンズ	22.7 ±5.4	アカモク	89.1 ±11.2
キョホウ	47.2 ±20.1	イソモク	51.1 ±27.1
		ウミトラノオ	99.1 ±0.8
		フシスジモク	81.4 ±6.0
		ヨレモク	89.1 ±12.7
		アナアオサ	-7.0 ±10.0
		アマモ	90.3 ±8.3
		マカブ	83.3 ±7.3

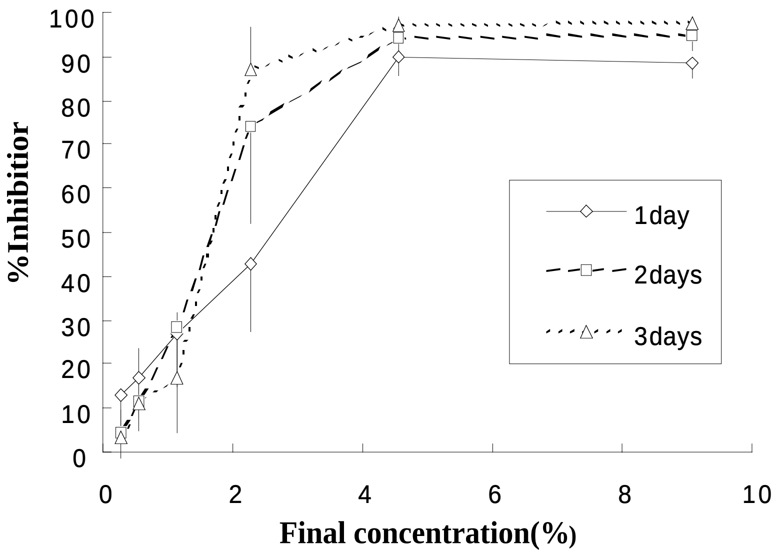


Fig 1 時間とマタタビ抽出液濃度を変えて活性を測定した結果

Table 2 マタタビ抽出液の熱処理による増殖阻害活性の変化

熱処理 (°C)	HL60 細胞の増殖阻害活性（%）
0	82.3 ± 8.4
37	72.6 ± 13.1
98	96.2 ± 8.6

マタタビ抽出液の、ヒト結腸がん細胞株 LS 174T、ヒト正常表皮繊維芽細胞、マウスのマスト細胞、MC/9、に対する増殖抑制活性も調べたが(Fig.2A-2C)、その活性は HL-60 に対する活性より低かった。4.5%濃度のマタタビ抽出液の各細胞に対する % Inhibition は HL-60 で 94-99% ,LS174T で 18%, MC/9 で 35%,ヒト正常表皮繊維芽細胞で 30%だった。MC/9 に関しては低濃度のマタタビ抽出液で処理すると、逆に増殖が促進される結果となった。

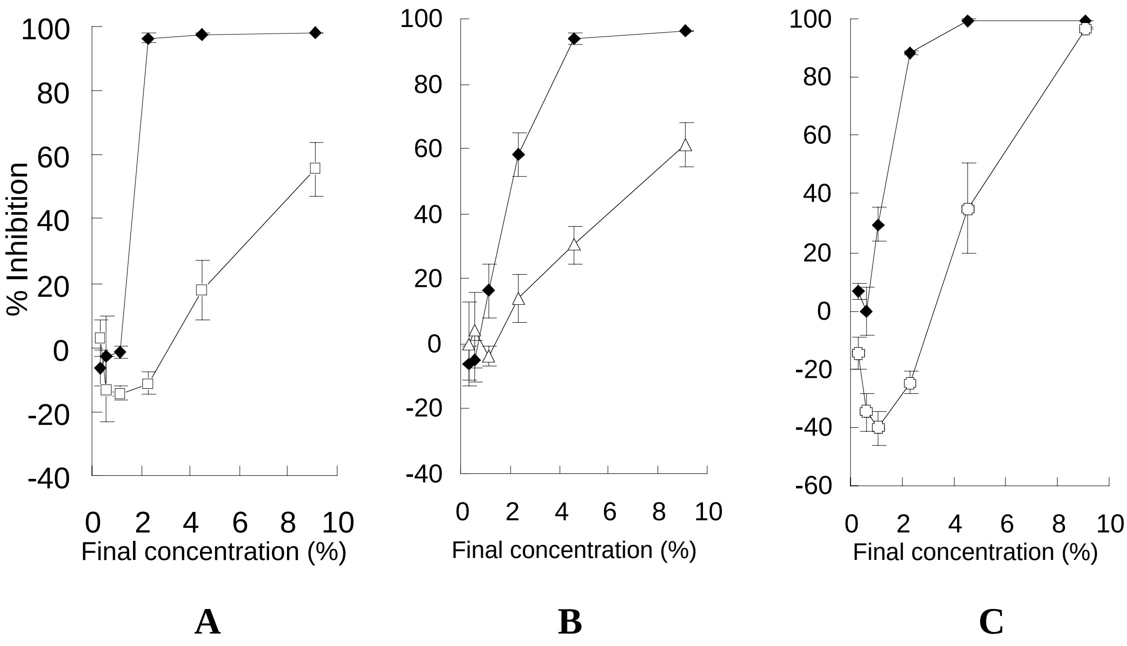
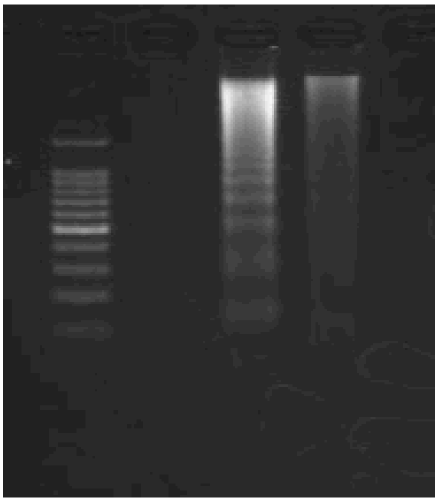


Fig 2 マタタビ抽出液で処理した HL60 細胞【◆】と他の細胞との増殖阻害の違い。
（A）はＬＳ174T 細胞【□】と比較。（B）は正常細胞（ヒト繊維芽細胞）【△】と比較。
（C）は MC/9 細胞【○】と比較。

マタタビ抽出液の HL-60 に対する増殖抑制効果が、アポトーシスの誘導によるもなのかを調べた DNA の電気泳動では DNA ラダーがみられた (Fig-3)。また蛍光顕微鏡による観察では核の断片化が見られた (Fig-4)。TUNEL 法の結果は Table 3 に示す。これらの結果は全てアポトーシスに特徴的なものである。



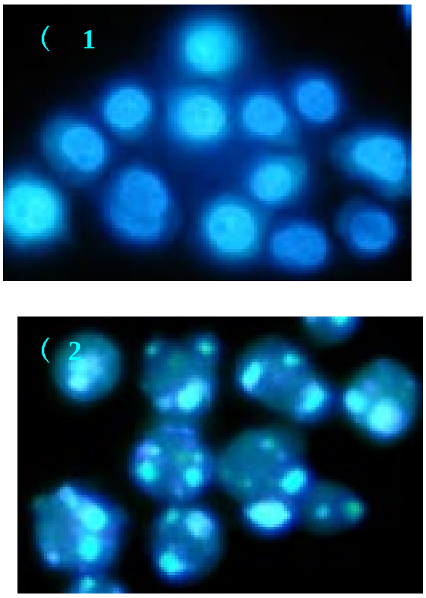


Fig 3 アガロースゲル電気泳動による DNA ラダーの検出
M：マーカー（100bp）、㈰：マタタビ抽出液で処理した細胞から抽出した DNA、㈪：何も処理してない細胞から抽出した

Fig 4 蛍光染色による核の凝縮の確認。
（1）：何も処理していない細胞を蛍光染色で染めたもの。
（2）：マタタビ抽出液で処理した細胞蛍光染色で染めたもの。

Table 3 TUNEL 法によるアポトーシスの検出結果

処理	ターミナルトランスフェラーゼ（酵素）	蛍光強度(%)	Difference (%)
マタタビ抽出液	+	49.8	49.8
	−	0.04	
コントロール（PBS）	+	0.28	0.2
	−	0.04	

４．考察

今回の実験では、マタタビ抽出液がヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 に対する強力な増殖抑制効果ををつことを示し、これがアポトーシス誘導によるものであることがわかった。この活性は LS 174T，MC/9，ヒト正常表皮繊維芽細胞 に対してはほとんどみられなかった。HL-60 にアポトーシスを起こす物質は低分子量で、熱に強いことがわかったが、物質を特定できず詳細な構造までは知ることができなかった。HL-60 にアポトーシスを起こすシグナル伝達経路は CD95 を通したものや、カスパーゼや cAMP 依存的なプロテインキナーゼ A による経路が知られているが、このシグナル伝達経路を知るためにも、HL-60 にアポトーシスを起こすマタタビの成分を特定する必要がある。我々の推測ではこの物質は HL-60 にアポトーシスを誘導し、白血病の治

療薬として期待されるレチノイン酸とは異なる。なぜならばレチノイン酸は熱に弱いからである。マタタビ抽出液が生体内でどのように作用するかについては現段階では十分な実験を行っていないが、予備実験でマタタビ抽出液をマウスに腹腔注射したところさほど毒性は見られなかった。これからの課題としてはヌードマウス腹腔にがん細胞を移入し生体内での作用はどのようになるかなどが考えられる。

マタタビにはビタミン C やフラボノイドなど含まれているので、がん細胞傷害以外にも生理活性作用が期待されるが、マタタビを食品の価値という点から考えると、マタタビを生食することがなかなかないので果実酒として飲用するか乾燥させて漢方薬として使用するのが一般的である。

マタタビ以外の果実・海藻について今回は詳しく調べなかったが、いくつかに HL-60 に対する強い増殖抑制活性がみられ、これらについても調査によっては興味深い結果が得られるだろう。

5．謝辞

HL60 細胞の入手に御協力頂いた、秋田県総合食品研究所 畠恵司氏に感謝致します。

6．参考文献

1）動物実験代替法マニュアル　培養細胞を用いた理論と応用，大野忠夫編著，共立出版
2）日本薬草全集，水野瑞夫監修，田中俊弘編集，新日本法規
3）アポトーシス実験プロトコール，田沼靖一編集，秀潤社
4）フローサイトメトリー自由自在，中内啓光監修，秀潤社
5）新アポトーシスの分子医学，橋本嘉幸，山田武編，羊土社
6）アポトーシスと医学，田沼靖一編集，羊土社