

|         |   |         |       |
|---------|---|---------|-------|
| 氏名      | 李 克娟 (Kejuan LI)  |         |       |
| 学位の種類   | 博 士 (環境学)   |         |       |
| 学位記番号   | 博 甲 第 7574 号  |         |       |
| 学位授与年月日 | 平成 27 年 11 月 30 日   |         |       |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当  |         |       |
| 審査研究科   | 生命環境科学研究科   |         |       |
| 学位論文題目  | Study on <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> Anticancer Activity of <i>Helicteres angustifolia</i> L. Root and Its Anticancer Mechanisms<br>( <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> におけるヤンバルゴマ根抽出物の抗癌活性及びその抗癌メカニズム) |         |       |
| 主査      | 筑波大学 教授   | 博士 (農学) | 張 振亜  |
| 副査      | 筑波大学准教授   | 博士 (農学) | 山路 恵子 |
| 副査      | 筑波大学准教授   | 博士 (理学) | 内海 真生 |
| 副査      | 筑波大学准教授   | 工学 博士   | 雷 中方  |

## 論 文 の 要 旨

癌は悪性の腫瘍として知られ、体の他の部分に侵略するが、または転移することによって異常な細胞成長を引き起こす病気の一つである。現在、放射線治療や化学療法が癌の主流治療法であるが、それらの副作用や限られた効果などの理由から、天然植物資源から低副作用、高い治療効果を持つ抗癌剤の研究開発が注目されている。ここで、*Helicteres angustifolia* L. は山ゴマの一種で、ラオスや中国において風邪、糖尿病、下痢などの治療用草薬として使われてきた。しかしながらこれらの抗癌作用に関する科学研究やその抗癌メカニズムの究明は殆ど行われていない。本研究は、*H. angustifolia* L. の根の抽出物の抗癌作用を究明するため、*in vitro* 及び *in vivo* モデル系を用い、その抗癌の分子生物学的メカニズムの解明を行った。

まず、*H. angustifolia* L. の根の水抽出物とエタノール抽出物 (HARaq と HARet) を用いて、*in vitro* モデルで抗酸化作用や抗癌作用を評価した。ラジカル消去活性、鉄キレート活性、還元力を評価した結果、HARet より HARaq の方が低い IC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub> 値と強い還元力を示した。また、抗癌活性を、3つのヒト癌細胞ラインと1つの正常細胞ラインを用いて評価した結果、HARet より HARaq の方が高い抗癌活性を示し、ヒト癌細胞である DLD-1、A549、および HepG2 に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 82.31±9.62、62.50±6.99、および 127.49±2.9 µg/mL であった。さらに、HARaq はヒト正常細胞 TIG3 に対する低い細胞毒性を示した。

次に、BALB/c ノードマウスモデルを用いて HARaq の抗癌作用を評価した。21日間、100、200、および 400mg/kg/d 経口で HARaq を投与した結果、線維肉腫細胞 Ht1080 の増殖と転移を効果的に抑制し、100、200、400mg/kg 投与の場合の腫瘍抑制率はそれぞれ 50.17±18.62%、66.73±3.48%、および 82.93±11.26%と、強い腫瘍増殖と腫瘍脈管形成抑制を示した。さらに、正常マウスに対する毒性を全く示さなかった。

HARaq の抗癌メカニズムを究明するため、人の骨肉腫 (U2OS) 細胞および正常な線維芽細胞 (TIG3) 細胞に対する増殖抑制、DNA ダメージ誘導、細胞サイクル分布およびアポトーシス誘導効果を検討した。さらに、関連たんぱく質表現レベルについて、western blotting 解析と免疫細胞化学分析で検討した。HARaq は効果的に U2OS の増殖を抑制した。コメットアッセイにより HARaq の U2OS 細胞への DNA ダメージ、フローサイトメトリック分析により HARaq の細胞サイクル (G2/M) への阻止およびアポトーシス誘導が確認されたが TIG3 細胞に対する誘導はなかった。一連の結果を元に抗癌の分子機構を解析した結果、HARaq の存在により up-regulating-

p53 たんぱく質及び p21 と down-regulating サイクリン B1 たんぱく質及び pRb の作用を通して、HARaq の bcl-2 のファミリーたんぱく質の調節に伴う PARP の分裂およびカスパーゼの活性化が誘導されたと考える。

HARaq に対し、さらにエタノール画分 (EF) と水画分 (WF) に分画し、それらの抗酸化活性、免疫調節活性および抗癌活性を解析した結果、EF のヒト肺癌細胞ラインに対する抗癌作用について時間的かつ投与量的に依存し、顕著な抑制効果があることが観察された。それに対し、WF はマクロファージ細胞に対して強い抗酸化活性と免疫調節活性を示した。EF の投入量が 12.5  $\mu\text{g/mL}$  のマクロファージ細胞の増殖は  $292.76 \pm 31.42\%$ 、貪食活性や酸化窒素発生量はそれぞれ  $0.38 \pm 0.02$  (optical density O.D.) と  $14.89 \pm 1.02 \mu\text{M}$  に達した。さらに WF には doxorubicin によるマクロファージ細胞へのダメージを軽減や保護する作用があることが確認された。

最後に EF を HP 20 樹脂カラムを用いて、5つの画分に分画した。それから、細胞の抗癌メカニズムについて、cucurbitacin B を対照系として調べた結果、他の画分より 40%エタノール画分の方がヒト肺癌細胞に対して誘導された DNA のダメージ、G2/M 期の停止及び細胞のアポトーシスは強いと観察されたことから、その抑制効果は cucurbitacin B に類似すると考えられた。

結論として、*H. angustifolia* L. の根の抽出物の抗癌活性は *in vitro* と *in vivo* において顕著な抗癌作用が確認できた。本研究で始めて *H. angustifolia* L. の根の抽出物の抗癌メカニズムを解明し、癌細胞増殖の抑制、DNA ダメージ、G2/M 期の停止に関与し、p53 シグナル pathway 及び bcl-2 ファミリー pathway によるアポトーシスが誘導された。本研究では *H. angustifolia* L. の抽出物に対する抗癌作用やそのメカニズムを明らかにした。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、*H. angustifolia* L. の根の抽出物の抗癌作用を究明するため、*in vitro* 及び *in vivo* モデルで評価し、始めてその抗癌の分子機構を解明したものである。

特に、HARaq がヒト正常細胞 TIG3 に対して低い細胞毒性を示したこと、BALB/c ノードマウスモデルを用いた HARaq の抗癌作用実験から強い腫瘍増殖と腫瘍脈管形成抑制が示されたこと、正常マウスに対して毒性が全く示さなかったこと、などの成果が得られたから、癌の転移の抑制や免疫活性強化のある天然物由来薬品の研究開発に重要な情報が得られた。

本研究から得られた貴重な実験データはオリジナリティに富む研究として高く評価でき、天然物である *H. angustifolia* L. の抗癌活性やその抗癌の分子生物機構の解明に資する重要な研究成果と考えられ、天然物由来の抗癌薬や免疫強化薬研究開発分野への応用に科学的かつ技術的な助言が提供できた。

平成 27 年 10 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査および最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判断された。

よって、著者は博士 (環境学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。