

アシュワガンダ葉由来の MethoxyWithaferinA  
と WithaferinA の生理活性の比較

2015 年 1 月

黄 川

アシュワガンダ葉由来の MethoxyWithaferinA  
と WithaferinA の生理活性の比較

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生命産業科学専攻  
博士(生物工学)学位論文

黄 川

# 目次

## 要旨

## 略語一覧

第1章 序論 .....	1
図表 .....	7
第2章 がん細胞における Withaferin A とメトキシ Withaferin A の分子 機構 .....	11
2-1 緒言.....	11
2-2 方法.....	12
2-2-1 細胞培養 .....	12
2-2-2 MTT アッセイ .....	14
2-2-3 コロニー形成アッセイ.....	13
2-2-4 免疫染色.....	13
2-2-5 細胞タンパク質の測定.....	14
2-2-6 ウェスタンブロット.....	15
2-2-7 トータル RNA 精製 .....	15
2-2-8 ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) .....	16

2-3	結果と分析	16
2-3-1	細胞毒性と細胞生存率	16
2-3-2	免疫染色 (ICC)	17
2-3-3	ウエスタンブロット	17
2-3-4	ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	18
2-3-5	データの統計分析	19
2-3-6	p53 と p21 <sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路による細胞周期への影響	19
2-3-7	p53 を増加させる要因—Mortalin と CARF タンパク質の作用	21
2-3-8	NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化的ストレス応答への影響	22
2-3-9	PARP、Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響	23
2-3-10	p53、Bax、Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響	23
2-4	考察	24
	図表	26
第 3 章	正常細胞における Withaferin A とメトキシ Withaferin A の分子機構	45
3-1	緒言	45
3-2	方法	45
3-2-1	細胞培養	46
3-2-2	MTT アッセイ	46

3-2-3	コロニー形成アッセイ	46
3-2-4	免疫染色	46
3-2-5	細胞タンパク質の測定	46
3-2-6	ウエスタンブロット	46
3-2-7	トータル RNA 精製	46
3-2-8	ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	47
3-3	結果と分析	47
3-3-1	細胞毒性と細胞生存率	47
3-3-2	免疫染色 (ICC)	47
3-3-3	ウエスタンブロット	48
3-3-4	ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	48
3-3-5	データの統計分析	49
3-3-6	p53 と p21 <sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路による細胞周期への影響	50
3-3-7	p53 を増加させる要因—Mortalin と CARF タンパク質の作用	51
3-3-8	NRF2 と KEAP1 シグナル伝達通路による細胞酸化ストレス応答への影響	52
3-3-9	PARP、Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響	53
3-3-10	p53、Bax、Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響	54
3-4	考察	54
	図表	57

第 4 章 総括.....74

参考文献 .....77

謝辞 .....82

## 要旨

アシュワガンダ (*Withania somnifera*) は、インドの伝統的アーユルヴェーダ医学から由来する薬草の一つで、古くから「若返りの妙薬」として用いられて、滋養強壯を目的に、健康と長寿の維持として、使われていた。現在まで同定された主なアシュワガンダの有効成分はステロイドラグトン類とステロイドグラス類に分類される。このステロイドラグトン類の中に、WithaferinA, WithanolideA, Withanoside と Withanone などの成分がある。その中に Withaferin A (WA) のがん細胞増殖抑制効果があると報告されていた。だが、Withaferin A の分子構造の近いメトキシ化合物 (2,3 - dihydro -3-methoxywithaferin A, mWA) に対し、その細胞毒性の分子メカニズムはいまだに完全に解かされていない。そのため、本研究の目的は、アシュワガンダ葉抽出物から分子構造同定された成分の MethoxyWithaferinA について、WithaferinA と比較し、一連の正常ヒト細胞とヒトがん細胞アッセイを行い、MethoxyWithaferinA の生理活性を究明し、MethoxyWithaferinA の生物資源としての有効利用や新規機能性素材の開発の可能性を検討したものである。

ヒトがん細胞細胞 U2OS に対し、細胞分子機構アッセイを通して、以下のことを明確した。1) WA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 を活性化したため、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用があると示唆されたことに対し、mWA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 の影響が少ないため、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用が少なかったと考える。2) WA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の発現量を減少させるため、がん細胞の抗酸化ストレス能力を低下させることを示唆されたことに対し、mWA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の影響が少ないため、がん細胞の抗酸化ストレス能力の低下効

果が少なかったと考える。3)WAによる処理組はDNA障害修復因子のPARP、Gadd45の発現量を減少させるため、がん細胞のDNA障害修復を阻止することを示唆されたことに対し、mWAによる処理組は細胞DNA障害修復因子PARPの影響が少なかった、Gadd45の発現量が増加させたため、がん細胞DNA障害修復に促進を示唆された。4)WAによる処理組はアポトーシスに促進する因子Baxの発現量を増加させ、抑制因子Bcl-2の発現量が減少させるため、がん細胞のアポトーシスの促進を示唆されたことに対し、mWAによる処理組はアポトーシスに関連する因子のBaxの影響が少なかった、Bcl-2の発現量が増加させたため、がん細胞のアポトーシスの抑制を示唆された。このように、ヒトがん細胞において、細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA障害修復、アポトーシスの分子機構が既知のWithaferin Aの分子機構と異なることがはじめてわかった。細胞生存アッセイにおいて、MTTアッセイの結果に、WAが0.6~1 $\mu$ g/mlの範囲でがん細胞に毒性があることに対し、mWAは、その10倍以上高い濃度でがん細胞に毒性があると明確した。コロニー形成アッセイに、WAを投入した組が0.3 $\mu$ g/mlの濃度から、細胞は基本的にコロニー形成が困難であり、コロニー形成の数が50%減少した。一方、mWAの投入組が3.0 $\mu$ g/mlまでの濃度まで、コロニー形成への影響が少なかった。つまり、mWAのがん細胞増殖抑制効果があるが、WAと比べ、かなり弱いと明らかにした。

ヒト正常細胞TIG3に対し、細胞分子機構アッセイを通して、以下のことを明確した。1)WAによる処理組は目標タンパク質p53とp21を活性化したため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用があると示唆されたことに対し、mWAによる処理組は目標タンパク質p53とp21の影響が少ないため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用が少なかったと考える。2)WAによる処理組は酸化ストレス応答因子のNRF2の発現量を減少させるため、正常細胞の抗酸化ストレス能力を



低下させることを示唆されたことに対し、mWA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の発現量を増加させるため、正常細胞の抗酸化ストレス能力の増強効果があると示唆された。3) WA による処理組は DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 の発現量を減少させるため、正常細胞の DNA 障害修復を阻止することを示唆されたことに対し、mWA による処理組は細胞 DNA 障害修復因子 PARP の発現量が増加させたため、正常細胞 DNA 障害修復に促進を示唆された。4) WA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が減少させるため、正常細胞のアポトーシスの促進を示唆されたことに対し、mWA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が増加させたため、正常細胞のアポトーシスの抑制を示唆された。このように、ヒト正常細胞において、細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることがはじめてわかった。細胞生存アッセイにおいて、MTT アッセイの結果に、WA を投入した組は、1.5 $\mu$ g/ml の濃度から、正常細胞に 50%以上の致死率を達したことに対し、mWA を投入した組は正常細胞の致死率が 0.6 $\mu$ g/ml までの濃度に 20%しか達してなかった、さらに 6 $\mu$ g/ml までの濃度で正常細胞増殖の促進することを明らかにした。コロニー形成アッセイに、WA を投入した組は 0.3 $\mu$ g/ml の濃度から、コロニー形成率が 13%以下になった。強い正常細胞の増殖障害を確認したことに対し、mWA を投入した組はその 10 倍の 3.0 $\mu$ g/ml の濃度で、コロニー形成率がほぼ 20%に達した。WA を投入した組と比べ、非常に低い正常細胞の増殖障害を確認した。Withaferin A と比べ、かなり正常細胞にダメージをつけることが弱いと明確した。

また、本研究では Methoxywithaferin A の濃度が 0.6~6  $\mu$ g/ml の範囲に、正常細胞の保護作用があることと今回の細胞生存アッセイにより、確認した。今までの報告では、似たようなアシュワガンダ成分の Withanone と一定の割合

で WA と併用し、正常細胞への毒性が WA の単独使用の場合より緩和されたことが明らかにした。mWA の正常細胞の保護作用を着目し、WA と併用することによって正常細胞への毒性を低減する効果を十分期待できるという新しい知見を得た。

**略語**

<b>CARF:</b>	<b>Collaborator of ARF</b>
<b>CHK 1/2:</b>	<b>Checkpoint kinase 1/2</b>
<b>BSA:</b>	<b>Bovine serum albumin</b>
<b>PBS:</b>	<b>Phosphate-buffered saline</b>
<b>PCR:</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>PDs:</b>	<b>Population doublings</b>
<b><math>\gamma</math>H2AX:</b>	<b>Gamma histone variant H2AX</b>
<b>mM:</b>	<b>millimolar</b>
<b>ml:</b>	<b>milliliter</b>
<b>DMEM:</b>	<b>Dulbecco's modified eagle's medium</b>
<b>DMSO:</b>	<b>Dimethyl sulfoxide</b>
<b>DNA:</b>	<b>Deoxyribonucleic acid</b>
<b>ECL:</b>	<b>Enhanced chemiluminescence</b>
<b>FBS:</b>	<b>Fetal bovine serum</b>
<b>GFP:</b>	<b>Green fluorescent protein</b>
<b>RB:</b>	<b>Retinoblastoma</b>
<b>SDS:</b>	<b>Sodium dodecyl sulfate</b>
<b>RNA:</b>	<b>Ribonucleic acid</b>
<b>WA:</b>	<b>withaferin A</b>
<b>mWA</b>	<b>Methoxy-WithaferinA</b>
<b>DAPI:</b>	<b>4',6-diamidino-2-phenylindole</b>

## 第1章 序論

悪性新生物、がんは1981年以後日本人の死因で一位であり続け、現在、その三分の一を占めている（図1-1）。そのため、がんの発生原因を解明しがんの治療を可能にすることが最も重要なことである。

ヒトの身体は数十兆個の細胞からなっている。これらの細胞は、正常な状態では細胞数をほぼ一定に保つため、分裂・増殖しすぎないような制御機構が働いている。それに対して腫瘍は、生体の細胞の遺伝子に異常がおきて、正常なコントロールを受け付けなくなり自律的に増殖するようになったものである。勝手に増殖を続けると、発生部位周囲にしみ出るように広がる（浸潤）とともに、体のあちこちに散らばり（転移）し、次から次へと新しいがん組織を作り上げる<sup>(1, 2)</sup>。がん組織は、他の正常組織が摂取しようとする栄養を取ってしまい、体を衰弱させる。がんは基本的に、すべての臓器、組織に発生すると言われる。大きく分類されると、3種類のがんがある。造血器でできるもの、例：白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫である。上皮細胞でできる「癌、癌腫」、例：肺がん、乳がん、胃がん、大腸がんである。非上皮性細胞（間質細胞：支持組織を構成する細胞）でできる「肉腫」、例：骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫である。

がんの治療は基本的に「手術療法」「化学（薬物）療法」「放射線療法」の3種類があり、これを三大療法と呼んでいる。がんが比較的早期で見つかり、転移もなく、局所（発生した場所）にとどまっていれば、ほとんどの場合、まず手術や放射線治療等の局所治療が行われる。一方、ある程度進行してしまっており、転移がある場合や、周囲の組織に浸潤が見られ、転移の可能性がある場合には、手術や放射線療法による局所治療に加え、抗がん剤治療が検討されることになる。しかし、三大療法がそれぞれの問題点がある。まず、「手術療

法」は進行・再発した患者さんでは、すべてのがんを取り除くことは難しく、からだの中にがんが残ってしまうことも少なくない。「放射線療法」は正常細胞の殺傷を抑えるため、照射できる放射線の量には制限されども、少なからず副作用が出る場合もある。「化学（薬物）療法」は正常な細胞まで傷つけてしまうことも多々あるため、時には激しい副作用を伴う。

そのため、1990年代からがん分子標的治療が開始されるようになった。分子標的治療は、がん細胞自身が持っている、増殖や転移、血管の新生などに関与している分子の働きを阻害することで、がん細胞の増殖や転移を抑えて治療効果を発揮するというものである。そういった特徴を持たない正常細胞には障害を与えないという特色がある治療である。もちろん、この細胞の動きを関連する分子の作用とその分子の働きにより引き起こした細胞内シグナル伝達システムの変化がこの治療法の基礎と考えられる。

シグナル伝達とは、簡単にいえば、「細胞と細胞のコミュニケーション、情報交換」のことである。細胞は、外部環境の変化を感知し、それを細胞内シグナルへと変換するとともに、細胞内の様々な場所に正確に伝え、そしてどのように応答するのかを決める。したがって、その分子基盤を解析する「シグナル伝達研究」は、生命科学において最も関心の高い分野の一つである。情報の送信および処理は、異なる細胞および細胞型の協調機能を確保するために、多細胞生物に不可欠な要素である。そのような分化、増殖およびプログラム細胞死（アポトーシス）のような基本的な細胞運命決定をしっかりと細胞がその環境から受けるシグナルにより調節される。これらの信号は、最終的には個別の細胞挙動をもたらすように、複雑な細胞内シグナル伝達ネットワークによって処理される。細胞機能のほぼすべてがシグナル伝達系の制御を受けており、その破綻はがんなど多くの疾患を惹起すると考えられる

がんの場合は細胞のがん化の過程において様々ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が生じるが、その多くは増殖シグナル伝達の活性化とアポトーシスの制御シグナルの破綻（アポトーシスの抑制）を引き起す。これにより、がん細胞が無制限な分裂になる。そもそも、細胞分裂は、綿密なシグナル伝達システムによって制御されている。シグナル伝達システムが細胞分裂を制御することにより、細胞分裂は最小限に抑えられている（図 1-2）。しかし、がん細胞では、こうした綿密なシグナル伝達が損なわれ、無制限に細胞分裂が起こる。これを止める手段として、増殖を刺激しているシグナル伝達のどこかを止めてやれば、がん細胞の増殖を止めることができる。

一方、薬用植物は抗がん剤の有望な創薬資源となっていた。人間は自然から作れたもの、自然は人間の知恵を超えた多様な構造と活性をもった化合物を提供してくれるため、天然植物はシーズの宝庫である。何千年以来、世界各地において植物が薬用の資源として利用されてきた。長い間にわたって、人々へ実際に投与するという経験を通じて、世界各地の人間は植物の薬理効果について独自の知識を得てきた。中国の漢方医学やインドのアーユルヴェーダ医学など、各民俗医学の知識は世界各地で代々伝わり、またそれぞれの伝統薬体系として発展に寄与してきた。もちろん、薬用植物は抗がん剤の有望な創薬資源として各国に活用している。現在、天然植物に由来する医薬は大体 3 つの方法で医薬になる。

- (1) 天然植物から得られる化合物そのものを医薬とする
- (2) 天然植物から得られる化合物の構造を改変し、医薬とする  
(活性の改善、吸収性などの改善、製造法の改善など)

(3) 天然植物の標的タンパク質を解明し、その情報をもとに 人工の化合物を創製して医薬とする

この3つの方法により、抗がん作用が見つかっている生薬や薬草から、分子標的薬と同じようなメカニズムでがん細胞の増殖を阻害する成分が見つかることが可能になった。つまり、がん細胞で活性化している増殖シグナルを抑制する成分である。このような成分は、副作用が少なく、がん細胞の増殖を抑える薬草や生薬の抗がん作用を説明してくれる。この成分を見つけだすことと、天然植物から得られる成分を土台として、元の構造を改変し、より強いし、より副作用が少ない新化合物の合成することは、今こそ解決すべき急務の課題である。

近年以来、エトポシド、カンプトテシン、タキソール、ビンクリスチンなど多くの天然物由来の抗がん剤が開発されている。今、がんの治療に用いられている処方薬 121 種のうち 90 種は薬用植物由来であり、その中に、およそ 74% は民間伝承からの研究によってもたらされたものである<sup>(3)</sup>。

アシュワガンダ (学名 *Withania somnifera*)、冬チェリーまたは「インド人参」として知られている。インドをはじめ、パキスタン、アフガニスタン、スリランカ、コンゴ、南アフリカなどのアジア、アフリカの乾燥地域で分布している。ナス科に属し、常緑低木、高さ約 30~150 センチメートル、微細な星状綿毛を被って、根は、肉厚く、先細り、葉は卵形で、花は薄緑である。野生で成長し、また、インドの多くの地域で医薬用途のために栽培される。インドの伝統的アーユルヴェーダ医学から来ている薬草の一つで、古くから「若返りの妙薬」として用いられて、滋養強壯を目的に、健康と長寿の維持として、使わ

れていた。さらに、近年の研究で、抗炎症、抗ストレス、免疫調節、抗がんなどの作用があると徐々に明らかにされた。

現在まで同定された主なアシュワガンダの有効成分はステロイドラクトン類に分類される WithaferinA, WithanolideA, Withanoside と Withanone である (図 1-3)。これらのほとんどは、ヒトがん細胞に対して毒性である。だが、その細胞毒性の分子メカニズムはいまだに完全に解かされていない<sup>(5)</sup>。

Withaferin A (WA)、アシュワガンダから精製された活性成分の中にもっともがん細胞増殖抑制効果があると報告されている<sup>(6)</sup>。WA はがん細胞増殖抑制効果が報告されている。ヒト膵がん細胞を移植したマウスに WA を腹腔内注入した場合、腫瘍の大きさが対照組の半分ぐらいの大きさに抑えられる。これにより、WA が細胞をアポトーシス (細胞自己壊死) に誘導することと考えられる<sup>(7)</sup>。その原因は、がん細胞優位に働くシャペロンタンパク質である Hsp90 と結び、そのシャペロン機能を阻害し、がん細胞アポトーシスを誘導するという説がある<sup>(8)</sup>。そのほか、WA を投入した後 JNK や p38 などのアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路の活性化になり、がん細胞の増殖が抑制できる<sup>(9)</sup>。さらに、抗腫瘍、抗血管形成及び放射線増感活性<sup>(10,11)</sup>を有することが示された。前立腺癌細胞<sup>(12,13)</sup>、乳癌細胞<sup>(14)</sup>、白血病細胞<sup>(15)</sup>、およびメラノーマ細胞における抗がん活性も実証されていた。

しかし、がん細胞増殖抑制能力があるものの、正常細胞にも毒性が高い<sup>(4)</sup>、これが WA を臨床応用するまで、解決しなければならない課題である。

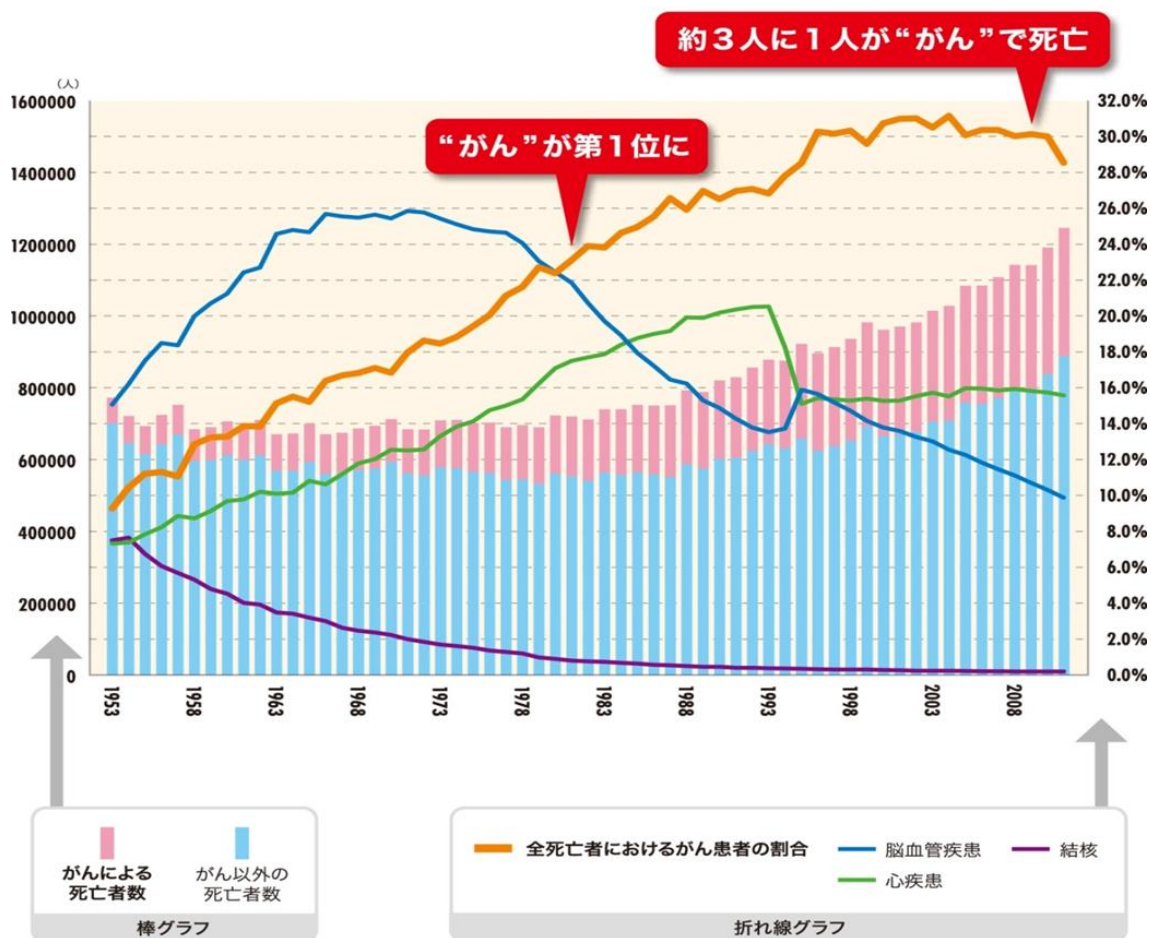
我が研究グループでは、正常細胞毒性に少ないアシュワガンダから提出されたもう一つ化合物の Withanone を使用し、一定の割合で WA と併用することを試していた。正常細胞への毒性が WA の単独使用の場合よりかなり弱めていた。WA の医薬への利用に一步を前進した。



そして、「天然植物から得られる化合物の構造を改変し、医薬とする」という天然植物創薬の理念から、Withaferin A (WA) の構造を改変するか、あるいは、構造に近い化合物を探すか、Withaferin A に構造に近い化合物を見つけ、その化合物の抗がん効果を検証したい。

アシュワガンダ葉の有効成分の中に、Methoxy Withaferin A (2,3 - dihydro-3- methoxywithaferin A) という化合物がある。Withaferin A のメトキシ化合物、化学構造が Withaferin A と非常に似ている (図 1-4)。

本研究はその Methoxy Withaferin A という化合物を着目した。正常細胞とがん細胞に対する効果を調べ、目標タンパク質の生物活性が変わるという想定をターゲットして、細胞内において、WA と対照しながら、効果について検証を行う。この研究は mWA の生理活性を究明し、mWA の生物資源としての有効利用や新規機能性素材の開発の可能性を検討したものである。



厚生労働省「H21年人口動態統計月報年報（概数）の概況」

図 1-1 がんによる死亡者数グラフ

悪性新生物、がんは1981年以後日本人の死因で一位であり続け、現在はその三分の一を占めている。

**細胞の癌化** = 細胞の自律的増殖から無限の細胞分裂

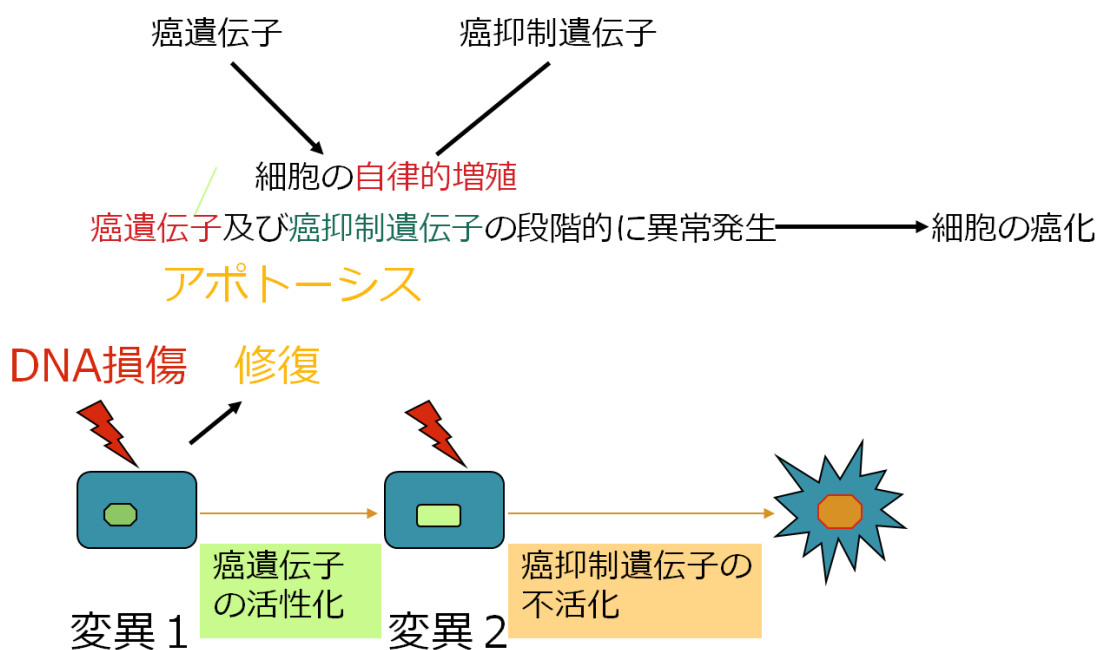


図 1-2 細胞がん化メカニズム

細胞のがん化の過程において様々ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が生じるが、その多くはアポトーシスの制御シグナルの破綻（アポトーシスの抑制）を引き起す。

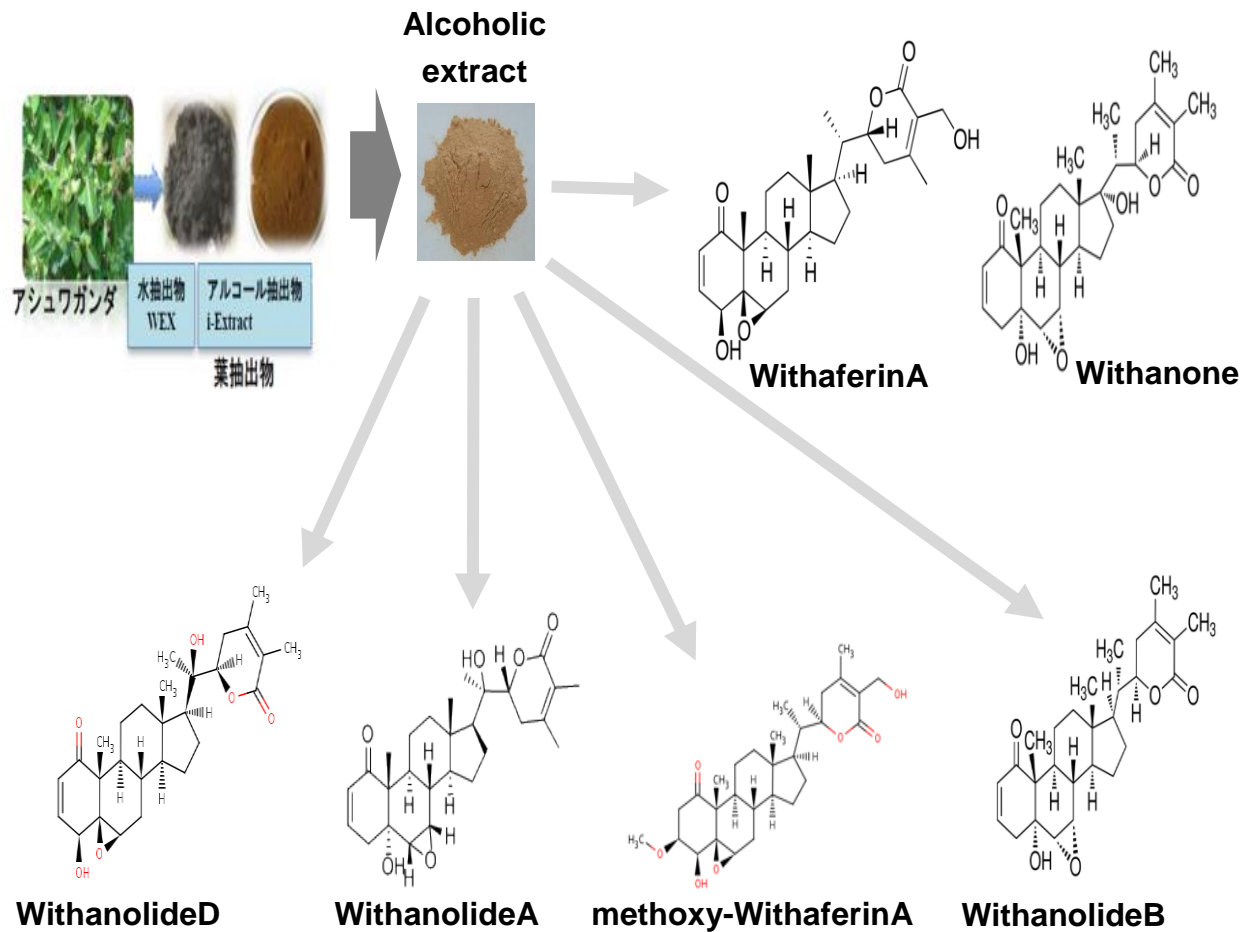
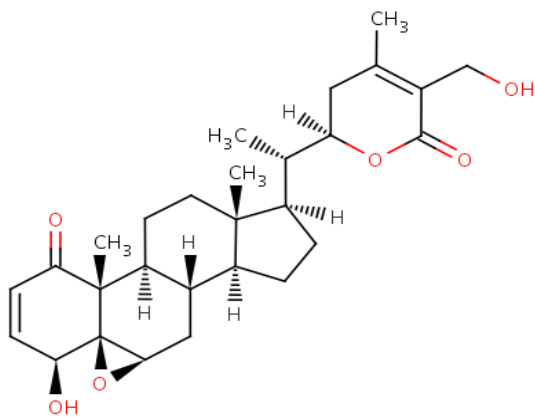
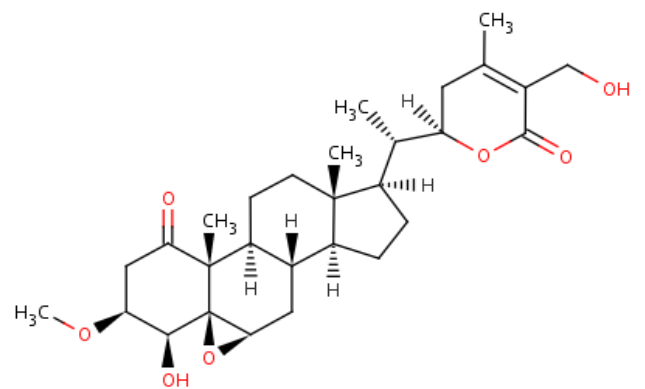


図 1-3 アシュワガンダのエタノール抽出物の成分

インドの薬草アシュワガンダ葉から水とアルコールを用いて、水抽出物 WEX とアルコール抽出物 i-Extract を得た。さらに、アルコール抽出物 i-Extract から WithaferinA、WithanolideA、WithanosideD、WithanosideB、Methoxy-WithaferinA と Withanone を精製された。



**Withaferin-A**



**methoxy-Withaferin-A**

図 1-4 Withaferin A と Methoxy Withaferin A の化学構造

## 第2章 がん細胞における Withaferin A とメトキシ Withaferin A の分子機構

### 2-1 緒言

悪性新生物、がんは1981年以後日本人の死因で一位であり続け、現在はその三分の一を占めている。その中に、若者の間に多発する骨肉腫は最も頻度の高い悪性骨腫瘍であり、10～20代の若年者の膝の周りや肩の周囲に発生することが多いが、高齢者にも発症する。主な症状は痛みだが、レントゲン検査で骨に変化があらわれるまで症状が出ない場合が多い。治療方法は抗がん剤治療と手術（外科治療）からなり、放射線治療はあまり効果がないと考えられる。

アシュワガンダ（学名 *Withania somnifera*）、冬チェリーまたは「インド人参」として知られている。インドをはじめ、パキスタン、アフガニスタン、スリランカ、コンゴ、南アフリカなどのアジア、アフリカの乾燥地域で分布している。ナス科に属し、常緑低木、高さ約30～150センチメートル、微細な星状綿毛を被って、根は、肉厚く、先細り、葉は卵形で、花は薄緑である。野生で成長し、また、インドの多くの地域で医薬用途のために栽培される。インドの伝統的アーユルヴェーダ医学から来ている薬草の一つで、古くから「若返りの妙薬」として用いられて、滋養強壯を目的に、健康と長寿の維持として、使われていた。さらに、近年の研究で、抗炎症、抗ストレス、免疫調節、抗がんなどの作用があると徐々に明らかにされた。

現在まで同定された主なアシュワガンダの有効成分 Withaferin A (WA) は、アシュワガンダから精製された活性成分の中にもっともがん細胞増殖抑制効果があると報告されている。しかし、正常細胞にも毒性が高いため、Withaferin A の細胞に対する効果のメカニズムの究明、さらに「天然植物から得られる化合

物の構造を改変し、医薬とする」という天然植物創薬の理念から、本研究は Withaferin A のメトキシ化合物 Methoxy Withaferin A を着目し、がん細胞に対する効果を調べた。細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスなどの面で、実験を展開し、研究を行う。

## 2-2 方法

### 2-2-1 細胞培養

細胞株のヒト骨肉腫細胞 U2OS は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。細胞を 10cm<sup>2</sup>ディッシュを用いて、10%ウシ胎児血清 (FBS) を加えて、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。細胞播種は以下のように行った。培地をアスピレーターで吸い出し、PBS(-)で細胞を洗浄し、終わったら、ドリプシン (EDTA) 1ml を加え、細胞表面に均等に広げ、37° C インキュベートした。細胞の剥離を確認できたら、DMEM 培地を 1ml に加え、細胞を懸濁した。必要な割合に分けて、新しいディッシュを移し、DMEM 培地 10ml を加え、継代数番号 (PD) を記入、37° C インキュベートした。まだ、-80° C で、冷凍保存する。ちなみに、本研究で使う正常細胞とがん細胞はすべての継代数は 24 (PD24) である。以上、本研究の細胞培養はすべてこの条件で行った。

### 2-2-2 MTT アッセイ

U2OS 細胞を 4000 ずつ 96 ウェル培養プレートに播種し、180  $\mu$ l DMEM を加え、一晩で培養した。80%~90%程度で成長された場合、WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、各濃度 6 ウェルずつに注入した。24 時間後(図 2-1)、

0.5mg/mlMTT の PBS 溶液を各ウェルに 20  $\mu$ l 加え、4 時間 37° C インキュベートした。その後、培養液をアスピレーターで吸い取り、DMSO を 100  $\mu$ l 加え、37° C インキュベートし、572nm で吸光度を測定した。吸光度に従って、グラフを作り、細胞増殖抑制曲線を作った (図 2-2)。

### 2-2-3 コロニー形成アッセイ

6 ウェルプレートに 500 の U2OS 細胞/ウェル播種し、2 mL/ウェルの割合で 10%FBS の DMEM 培地を加え、37°C で 48 時間にインキュベートした。WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で注入した。顕微鏡で観察し、コロニー形成したら、染色した。24 時間後、乾かし、スキャナを用いて、画像を作成した。

### 2-2-4 免疫染色

12 ウェル培養プレート上でカバーガラスに広げ、U2OS 細胞を 40000 ずつ培養プレートに播種し、1ml DMEM を加え、一晩で培養した。70%~80%程度で成長すればよい、WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、各濃度 1 ウェルずつに注入した。24 時間を 37° C インキュベートした。処理した U2OS 細胞を冷した PBS で 2、3 回洗い、冷却した Methanol : Acetone (1 : 1) を各ウェル 1ml で細胞を固定した。固定した細胞を PBS、PBST で 10 分振とうし水和した。そして、2%BSA/PBS で 10 分振とうし、ブロッキングした。カバーガラスを培養プレートの中から取り出し、1<sup>st</sup> 抗体を含む 2%BSA/PBS の上にを載せ、室温 1 時間においた。その後、スライドガラスを培養プレートに再び移し、シェーカーの上に、PBST で 10 分、3 回洗った。そして、同じように、カバーガラスを 2<sup>nd</sup> 抗体を含む 2% BSA/PBS に載せ、30 分間アルミホイルで覆い、室温で暗くした。そ



の後、シェーカーの上に、PBSTで10分、3回洗った。そして、DAPI(in PBS)を各ウェル入れ、二分後に吸い取り、PBST、PBS、MQを各10洗った。最後、カバーガラスをスライドグラスに載せ、乾かしたら、顕微鏡で図像を調整し、最終デダを作った

### 2-2-5 細胞タンパク質の測定

6 ウェルプレートに80000のU2OS細胞/ウェル播種し、2ml/ウェルの割合で10%FBSのDMEM培地を加え、37°Cで24時間にインキュベートした。細胞が80~90%に成長したら、WAとmWAを0、0.3、0.6、1.5、3.0 $\mu$ g/mlの濃度で注入した。さらに、37°Cで24時間にインキュベートした。処理したU2OS細胞の培養プレートから培養液をアスピレーターで吸出し、PBSを入れ、細胞を2回に洗浄した。ドリプシン(EDTA)1mlを加え、細胞表面に均等に広げ、37°Cインキュベートした。細胞の剥離を確認できたら、DMEM培地を1mlに加え、細胞を懸濁した。500rpmで5分間遠心して、DMEM培地を吸出し、PBS(-)を1mlに加え、500rpmで5分間遠心し、細胞を洗浄した。PBSを吸出し、RIPAバッファーを細胞の量を見ながら、70~100 $\mu$ lを加え、スクレイパーで1分間を擦り、細胞を氷の上に20分間インキュベートした。1300rpmで10分間遠心し、新しいエッペンチューブに上清を移った。

回収したタンパク質はBCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific社)を用いて、タンパク質量を測定した。試薬のAとBを50:1の割合で混ぜ、各ウェルを200 $\mu$ lずつにいれ、BSAサンプルとタンパク質を3 $\mu$ lずつに入れ、37°Cで30分間にインキュベートした。その後、562nmで吸光度を測定した。BSAスタンダードの吸光度で、検量線を作り上げ、それを従って、タンパク質を定量した。

### 2-2-6 ウェスタンブロット

10%と12%のアクリルアミドゲル溶液を作り、ピペットを使用し、ゆっくり Separating ゲル溶液と Stacking ゲル溶液を20分の間隔でガラスプレートに注入した。ゲル溶液を固定したら、ガラスプレートを電気泳動セットに組み立ち、Running バッファーを注入した。20~30  $\mu$ l の SB バッファー、Milli-Q water、タンパク質を含む溶液を、100° C で 5 min 熱変性を行った後、ガラスプレートに入れ、70V で3~4h 泳動した。

転写は半乾式法で行った。ニトロセルロース膜をメタノールに2分間に浸し、ろ紙と転写バッファーに入れ、浸した。泳動したゲルをはずし、ろ紙二枚、ニトロセルロース膜、ゲル、ろ紙二枚の順にして、転写装置のマイナス極板に置き、120V で2H 転写した。

プラスチック容器に3% BSA を入れる TBST (0.1% Tween-20 Tris-buffered Salines) で1h 室温にブロッキングした。洗浄し、一次抗体を加え、1h 室温あるいは一晩4° C でインキュベートした。TBST で、10分3回ずつ洗浄し、二次抗体を加え、45分~1h に室温でインキュベートした。TBST で、10分3回ずつ洗浄し、現像に移った。

ECL (enhanced chemiluminescence) 化学発光液を用いて、A、B 液1:1の割合で混合し、膜の上に乗せた。1分間後、カメラ (LAS3000 ミニ、富士フィルム) で現像した。

### 2-2-7 トータル RNA 精製

細胞を10cm<sup>2</sup>ディッシュ培養し、80~90%程度に成長させ、WA と mWA を0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で注入した。37° C で24時間にインキュベートした。

処理した U2OS 細胞を剥離し、懸濁した。500rpm で 5 分間遠心して、DMEM 培地を吸出し、PBS(-)で洗い、PBS を吸出した。残った U2OS 細胞団を次の過程に使用するか、まだ $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍する。

次に、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて、操作説明書に従って、細胞のトータル RNA を精製した。精製した RNA を NanoDrop 1000  $1\mu\text{L}$  分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) で吸光度を測定し、濃度を算出した。

### 2-2-8 ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

ThermoScript™ RT-PCR システム (Life technologies) の使用説明書に従って、 $50\mu\text{M}$  Oligo(dT)20、精製した RNA、 $10\text{mM}$  dNTP Mix と DEPC 処理水を用いて、RNA を変性させ、5XcDNA 合成 Buffer、DTT ( $0.1\text{M}$ )、RNaseOUT™、ThermoScript™ RT、DEPC 処理水を用いて、逆転写反応を行い、cDNA を調製した。この cDNA を  $10\text{X}$  PCR Buffer、順逆プライマー、 $10\text{mM}$  dNTP mix PCR、Taq DNA ポリメラーゼ、ヌクレアーゼフリー水を用いて、PCR 反応液の合成を完成した。 $94^{\circ}\text{C}$ 10 分を 1 回、 $94^{\circ}\text{C}$ 30 秒・ $55^{\circ}\text{C}$ 30 秒・ $72^{\circ}\text{C}$ 1 分を 25 回、PCR 反応を行った。

アガロース粉末  $0.5\text{g}$  を  $1\times$  TAE 溶液に電子レンジで溶かせ、10 分間程度冷やし、 $10\text{mg}/\text{ml}$  EtBr 溶液を  $2.5\mu\text{l}$  入れた。溶液を泳動槽に流し、固まるまで待った。得られた PCR 産物をアガロースゲル泳動にいれ、 $100\text{V}$  で 20 分に泳動した。カメラで (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System、Bio-Rad) で撮影した。

## 2-3 結果と分析

### 2-3-1 細胞毒性と細胞生存率

まず、WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、MTT アッセイにより、細胞障害を測定した。使用細胞は U2OS のほか、G361（ヒト悪性黒色腫細胞）、MCF7（ヒト乳ガン細胞）、HT1080（ヒト繊維肉腫細胞）3 種類であった。その結果、WA を投入した組に対し、非常に強いがん細胞に対する障害が起こることが明らかにした。WA と比べ、mWA の投入組ががん細胞に対し、有効な障害を引き起こらなかった。3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、WA による処理されたがん細胞らが全部半数以上の致死率を達成したことに対し、mWA による処理されたがん細胞の致死率がほぼ 20%未満であった（図 2-2、3、4）。

つぎ、WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、コロニー形成アッセイにより、細胞の増殖状況を確定した。WA を投入した組が 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、細胞は基本的にコロニー形成が困難であり、コロニー形成の数が 50%減少した。一方、MWA の投入組が 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度まで、コロニー形成への影響が少なかった（図 2-5）。

### 2-3-2 免疫染色 (ICC)

12 ウェル培養プレートに WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup> の染色強度が WA 濃度に従って、濃度が高くなると強くなったため、タンパク質の発見が上昇だと判断した。mWA の投入組が染色強度の変化がわずかであり、有意義なタンパク質の変化をみられなかった。

### 2-3-3 ウェスタンブロット

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、ゲルに注入し、実験を行った。ニトロセルロース膜に履く感光線の濃さにより、各タンパク質の量を

判断した。p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、CARF、Bax、感光線の強度が WA 濃度に従って、高くなったため、タンパク質の発見量が上昇したと判断された。かわりに、Mortalin、PARP、Gadd45、NRF2、Bcl-2、感光線の強度が WA 濃度の上昇に反して、弱くなったため、タンパク質の発見量が下降したと判断された。mWA の投入組に NRF2 が mWA の濃度の上昇に従って感光線強度が弱くなったため、タンパク質の発見量が下降したと判断された。

#### 2-3-4 ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0、6.0  $\mu$ g/ml の濃度で、PCR 産物をゲルに注入し、実験を行った。ゲルの感光線の濃さにより、各プライマーにより、mRNA の量を判断した。各プライマーは以下のように、すべて

p53 (+ 5' -CTGCCCTCAACAAGATGTTTTG-3'

p53 (-) 5' -CTATCTGAGCAGCGCTCATGG-3

p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (+) 5' -ATGAAATTCACCCCTTTCC-3'

p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (-) 5' -CCCTAGGCTGTGCTCACTTC-3' ,

Bcl-2 (+) 5' - GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA -3'

Bcl-2 (-) 5' - AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3'

GAPDH (+) 5' -ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3

GAPDH (-) 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' .

GADD45 (+) 5' -CGTTTTGCTGCGAGAACGAC -3'

GADD45 (-) 5' -GAACCCATTGATCCATGTAG -3'

NRF2 (+) 5' -GCGACGGAAAGAGTACGAC-3'

NRF2 (−) 5′ -GTTGGCAGATCCACTGGTTT-3′

CARF (+) 5′ -TCAAAGTGACAGATGCTCCA-3′

CARF (−) 5′ -CGTTGGAAGTGTTCCTGCT-3′

p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、CARF 感光線の強度が WA 濃度に従って、濃度が高くなると強くなったため、各プライマーなりの mRNA の発見が上昇したと判断された。かわりに、Mortalin、Gadd45、NRF2、Bcl-2、感光線の強度が WA 濃度に反して、濃度が高くなると弱くなったため、各プライマーなりの mRNA の発見が下降したと判断された。mWA の投入組に Gadd45 の感光線の強度が mWA 濃度に従って強くなった。

### 2-3-5 データの統計分析

すべての実験は 3 回以上を行った。実験結果の統計処理には Mann-Whitney Test を用いた。統計は統計解析ソフト StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) を用いて解析した。

### 2-3-6 p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路による細胞周期への影響

p53 遺伝子は、ヒトの染色体では 17p13.1 に位置し、腫瘍抑制遺伝子として知られている。その産物である p53 タンパク質は、分子量 53000 Da、393 アミノ酸から成り、細胞周期の制御やアポトーシスのような細胞死の進行に関与する転写因子として機能している<sup>(17)</sup>。p53 遺伝子の変異はヒトのがんにおける最も多く見られる遺伝子異常である。p53 遺伝子の産物である p53 タンパク質が発がん抑制において、中心的な役割を果たしていることが明らかになった<sup>(18)</sup>。p53

蛋白質は p21 などの遺伝子の発現を制御する転写因子である。p21 は、転写因子である p53 が活性化されることにより、発現を誘導され、主に CDK2 と結合し、CDK2 の機能を抑制するので、細胞周期の G1 期から S 期の停止に関わる (図 7)。

この研究は WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、U2OS 骨肉腫細胞に投入し、p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> の発見は免疫染色、ウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。WA による処理した U2OS 細胞における p53 の免疫染色化学分析に、0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の用量で、細胞の大部分において p53 による核の染色が非常に強くなることを明らかにした。WA による処理したと、細胞質の p53 タンパク質が細胞核に移し、転写因子として機能した。いわば、p53 の活性化を示唆した。注目すべきは、mWA 処理した細胞の p53 染色強度は 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで、ようやく核の染色を見られた。大きな変化を示さなかった (図 2-6)。ウエスタンブロットの結果も同じく、WA による処理された U2OS 細胞に 0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度の低用量で p53 タンパク質の量がアップレギュレートされたことが発見した。一方、mWA の処理した細胞でも 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度の高い用量で p53 タンパク質の発現レベルの変化を示さなかった。このように、WA による処理された U2OS 細胞の p53 タンパク質の発現が WA の濃度に従って上昇した。mWA の処理した U2OS 細胞の p53 タンパク質の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 2-8)。そして、p53 遺伝子の mRNA 量が RT-PCR 法により解析した。WA による処理した U2OS 細胞において、p53 遺伝子の mRNA 量が有意なアップレギュレーションを見出した。一方、mWA の処理した U2OS 細胞の p53 遺伝子の mRNA 量の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 2-9)。p53 遺伝子 mRNA 量のアップレギュレーションにより、その産物である p53 タンパク質の増加につながると示唆した。

p21<sup>CIP1/WAF1</sup> のタンパク質の免疫染色、ウエスタンブロットによる解析の結果が p53 と同じく、WA による処理された U2OS 細胞の p21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質の発現が WA の濃度に従って上昇した。mWA の処理した U2OS 細胞の p21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 2-7、8)。RT-PCR 法により解析の結果に、WA と mWA による処理された U2OS 細胞 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> 遺伝子の mRNA 量の変化が見られなかった (図 2-9)。p21<sup>CIP1/WAF1</sup> のタンパク質量の増加は p53 タンパク質の誘導によると考えられる。

### 2-3-7 p53 を増加させる要因—Mortalin と CARF タンパク質の作用

Mortalin は細胞寿命決定に関連するタンパク質として同定された Hsp70 ファミリーに属するタンパク質である。Mortalin は p53 と相互作用をして、この相互作用によって核活性を阻害し、細胞質における p53 の隔離を促進することが示唆された<sup>(19, 20)</sup>。CARF タンパク質のアップレギュレーションは、p53 経路の活性化を介して、正常細胞の早期老化とヒトがん細胞の増殖停止を引き起こすことが示された<sup>(21)</sup>。

本研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、U2OS 骨肉腫細胞に投入し、Mortalin と CARF タンパク質の発現はウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。ウエスタンブロット実験に、WA による処理した U2OS 細胞における Mortalin タンパク質量が濃度に従って減少し、CARF タンパク質量が濃度に従って、増加した。mWA の処理した U2OS 細胞の両タンパク質の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 2-10、11)。RT-PCR に、CARF 遺伝子の mRNA の発現量が増加した、mWA の処理組に有意義な効果がなかった (図 2-12)。Mortalin に対し、WA と mWA の処理組に有意義な結果を得なかった。これによって、細胞内の Mortalin タンパク質の減少したことと CARF タンパク質が細胞内



のアップレギュレーションしたことがわかった。この原因により、p53 タンパク質の活性化を引き起こし、さらに、p21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質のアップレギュレーションを決定することを示唆した。

### 2-3-8 NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化ストレス応答への影響

NRF2 は、細胞酸化ストレス応答の重要な調節因子である。解毒過程も関与し、細胞内の抗酸化応答を誘導することが示されている<sup>(31)</sup>。NRF2 は細胞質でアクチン結合性因子 KEAP1 と相互作用していて、その転写活性は抑制されている(図 8)。細胞が酸化ストレスに曝されると NRF2 と KEAP1 の結合が弱まり、NRF2 は安定して細胞核に移行することができるようになる。結果として、生体防御に関わる遺伝子群の転写が促進され、細胞は保護される。一方、がん細胞においては、NRF2 は恒常的に活性化したら、抗酸化酵素や解毒酵素の産生や活性が亢進している。そのため、がん細胞は酸化ストレスや細胞傷害性物質に対する抵抗性が亢進しており、これが抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性の原因になっている。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、U2OS 骨肉腫細胞に投入し、NRF2 の発現はウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。ウエスタンブロットに WA による処理した U2OS 細胞における NRF2 の発現が減少し、MWA 処理した U2OS 細胞の NRF2 も減少を見られた、WA と mWA の投入により NRF2 タンパク質の抑制に役に立つと示されている(図 2-13)。そして、NRF2 遺伝子の mRNA 量が RT-PCR 法により解析した。WA による処理した U2OS 細胞において、NRF2 遺伝子の mRNA 量が減少を見られ、mWA の処理組が小幅増加と見られる(図 2-14)。そのため、WA による処理した U2OS 細胞の NRF2 遺伝子 mRNA 量の減少により、その産物である NRF2 タンパク質の減少につながると示唆した。

### 2-3-9 PARP、Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響

PARP タンパク質は DNA の損傷領域付近のクロマチン構造を修飾することが知られている。Gadd45 タンパク質は放射線・UV・DNA 障害剤などにより発現が誘導され、DNA 修復に関与している<sup>(22、23、24)</sup>。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 の  $\mu\text{g/ml}$  濃度で、U2OS 骨肉腫細胞に投入し、PARP タンパクはウエスタンブロット、Gadd45 タンパク質はウエスタンブロットと RT-PCR による調べた。この結果、WA による処理した U2OS 細胞における PARP タンパク質、Gadd45 タンパク質のウエスタンブロットに、タンパク質量の発現が濃度の増加に反して、減少することを確認した。mWA の処理組の Gadd45 タンパク質量が濃度の増加に伴って、増加し、PARP タンパク質が有意な結果がなかった。(図 2-15、16)。Gadd45 遺伝子 mRNA の RT-PCR 実験にも同じく、mRNA の量が減少した。このように、WA による処理したとすると、DNA 修復に関与しているタンパク質とその遺伝子 mRNA の量が減少した。MWA の処理組に有意な変化がなかった。(図 2-17) いわゆる、細胞 DNA 損傷の修復に対し、何らかの障害が生じると示唆した。mWA の処理組に有意な細胞 DNA 障害の影響を見られなかった。

### 2-3-10 p53、Bax、Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

Bax は Bcl-2 ファミリーに属するタンパクで、アポトーシスの調節に関与し、細胞壊死を促進する機能を有している<sup>(25)</sup>。Bcl-2 タンパク質も Bcl-2 ファミリーに属する、抗アポトーシスタンパク質である<sup>(26)</sup>。このアポトーシスシグナル伝達通路の機能はアポトーシス誘導タンパク質の p53 やアポトーシスを調節す

る Bcl-2 ファミリータンパク質を介して、カスパーゼファミリーのタンパク質により、完成させるものである<sup>(27)</sup>。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、U2OS 骨肉腫細胞に投入し、Bcl-2 と Bax タンパク質にウエスタンブロットを行った。この結果、ウエスタンブロット実験に、WA による処理した U2OS 細胞における Bcl-2 タンパク質の発現が濃度に従って減少し、mWA による処理した U2OS 細胞における Bcl-2 タンパク質量が増えることが確認した (図 2-18)。これによって、WA による処理した U2OS 細胞における Bcl-2 タンパク質のアポトーシスの抑制が弱まっていた。逆に mWA の処理組が増強したことを示唆した。そして、Bax タンパク質のウエスタンブロット実験の結果には、WA の処理組のタンパク質量の発現も濃度の上昇に従って増加した (図 2-19)。mWA の処理組が有意義な結果が見られなかった。このように、WA による処理した U2OS 細胞にたいし、p53 タンパク質の表現量の増加に従って、Bcl-2 タンパク質の発現量が減り、Bax タンパク質発現量が増加したことにより、アポトーシスの促進することを示唆した。mWA の処理組が逆に抑制することを示した。

#### 2-4 考察

分子レベル実験の検証により、WA とそのメトキシ誘導体 mWA が標的タンパク質との相互作用を確認された。細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの面で、WA と比較して、mWA と標的タンパク質との相互作用がかなり低かったと推測できた。

WA の投入により、細胞核周辺の Mortalin タンパク質の減少したことになり、細胞質における p53 の隔離を解消させ、p53 タンパク質が細胞核に大量進出を果

たせ、活性化を引き起こした。CARF タンパク質発現の活性化により、p53 タンパク質の抑制因子を抑え、p53 を活性化した。この原因で、もっとも重要ながん抑制因子の p53 を活性化したことにより、p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路の促進によって、CDK2 の機能を抑制するので、細胞周期の G1 期から S 期の停止に誘導した。Bcl-2 ファミリーの Bcl-2 と Bax タンパク質を作用し、U2OS 細胞のアポトーシスを誘導した。そして、NRF2 細胞酸化ストレス応答因子の調節により、がん細胞の酸化ストレスや細胞傷害性物質に対する抵抗性を抑え、抗がん剤や放射線治療に対する抵抗力を低下させる可能性を示唆した。さらに、DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 タンパク質の作用を抑え、DNA 損傷の修復をされなくなり、細胞死が誘導される。

mWA の場合は、WA と同じ濃度で、有意義な標的タンパク質の結合かなり少なかった。U2OS 細胞に対する機能が 3.0  $\mu$ g/ml の濃度まで、非常に少ないと証明された。しかし、48  $\mu$ g/ml の濃度でがん細胞の半数致死を達した。WA と比べ、高い濃度の場合、mWA ががん細胞に強い障害をもたらした。

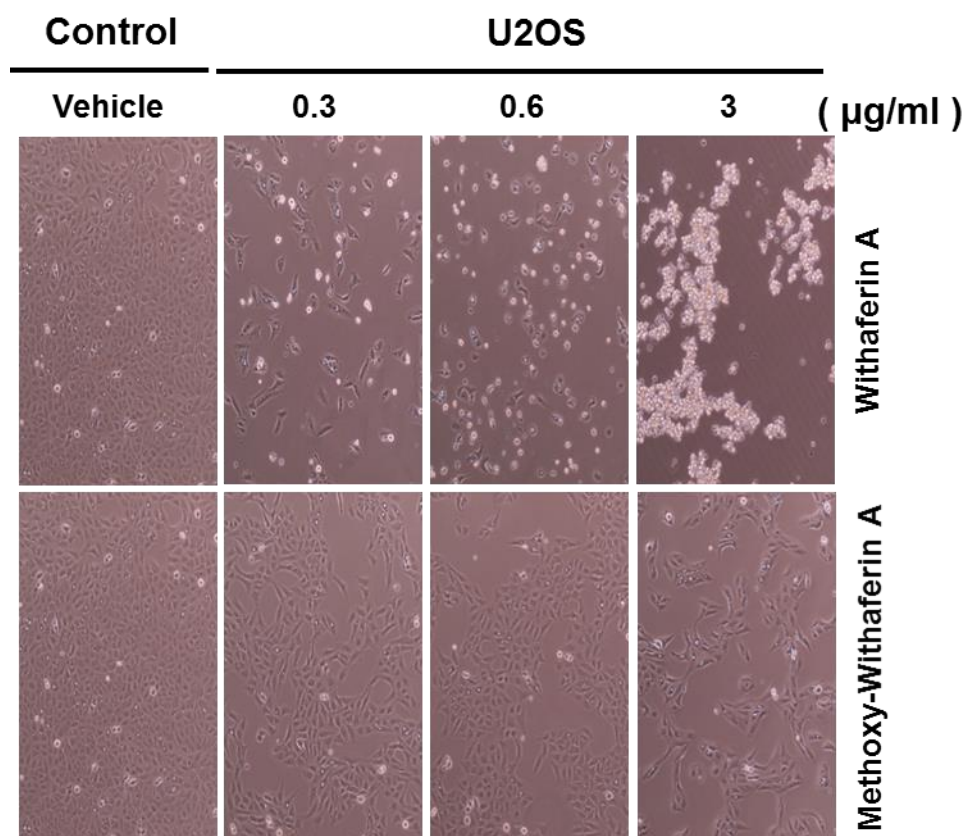


図 2-1 U2OS 細胞の電子顕微鏡像

U2OS 細胞を Withaferin A 及び Methoxy-WithaferinA で 48 時間に処理した。同条件で、Methoxy-WithaferinA に対し、WithaferinA が処理した U2OS 細胞の死亡が多いことが確認した。

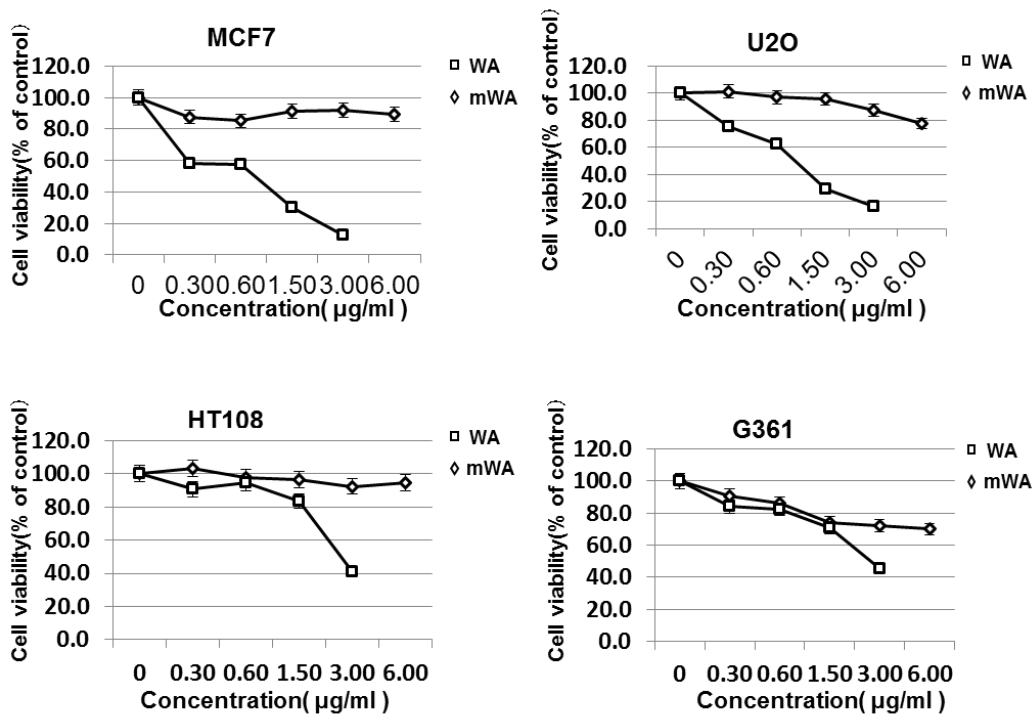


図 2-2 U20S 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度で、MTT アッセイによる細胞障害を測定した。使用細胞は U20S のほか、G361 (ヒト悪性黒色腫細胞)、MCF7 (ヒト乳ガン細胞)、HT1080 (ヒト繊維肉腫細胞) 3 種類であった。その結果、WA を投入した組に対し、非常に強いがん細胞に対する障害が起こることが明らかになった。WA と比べ、mWA の投入組ががん細胞に対し、有効な障害を引き起こらなかった。

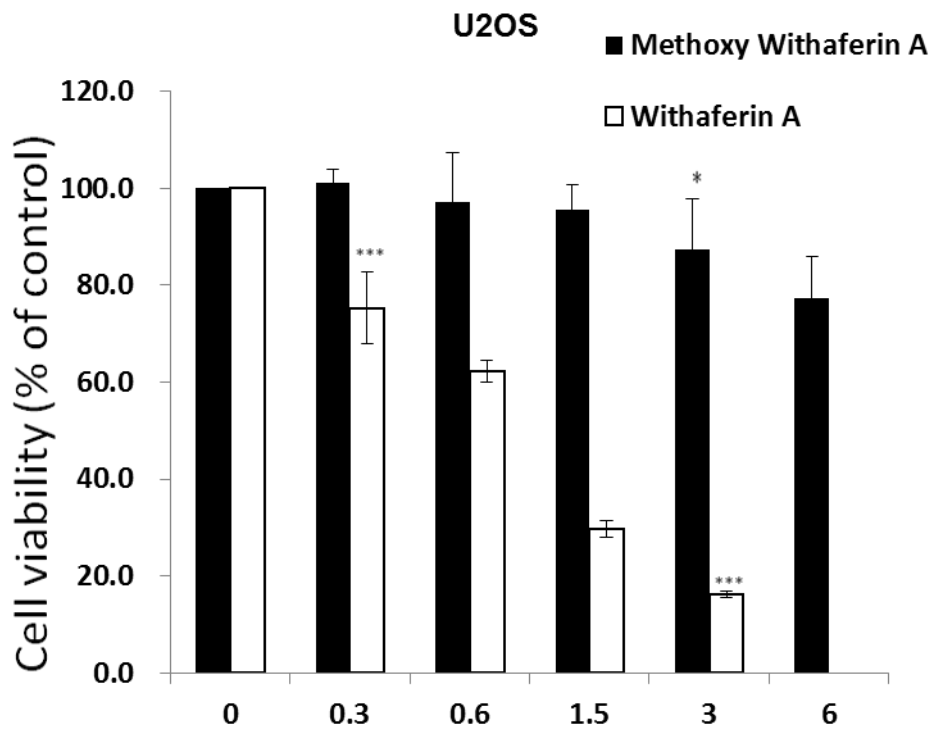


図 2-3 U2OS 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度で、MTT アッセイにより、細胞障害を測定した。3.0 µg/ml の濃度で、WA による処理されたがん細胞らが全部半数以上の致死率を達成したことに對し、mWA による処理されたがん細胞の致死率がほぼ 20%未満であった。

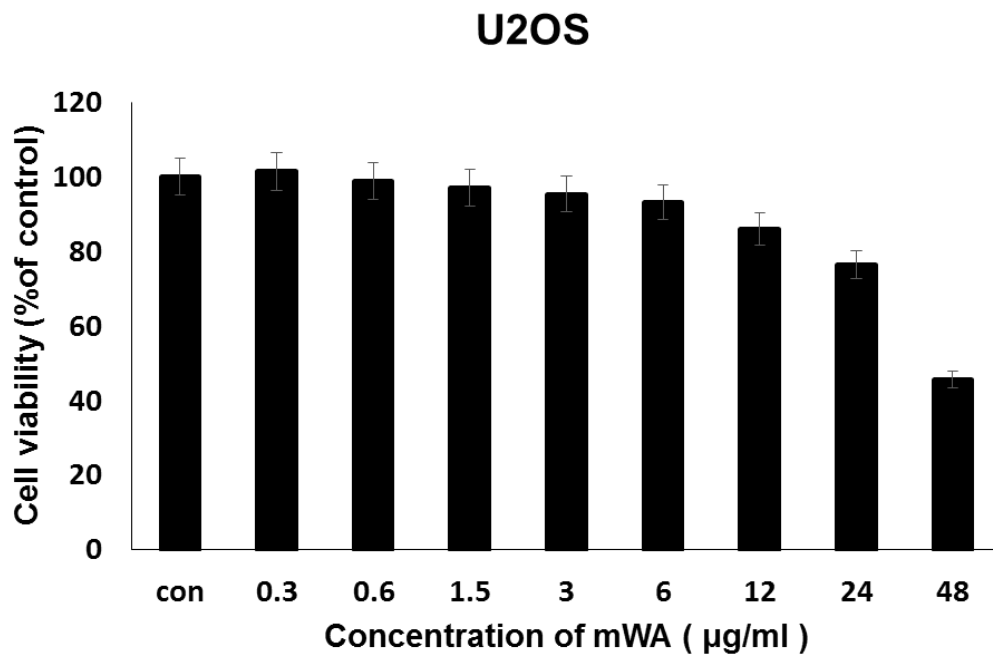


図 2-4 U2OS 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0、6.0、12、24、48  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、MTT アッセイにより、細胞障害を測定した。48  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で U2OS 細胞の半数致死率を達した。



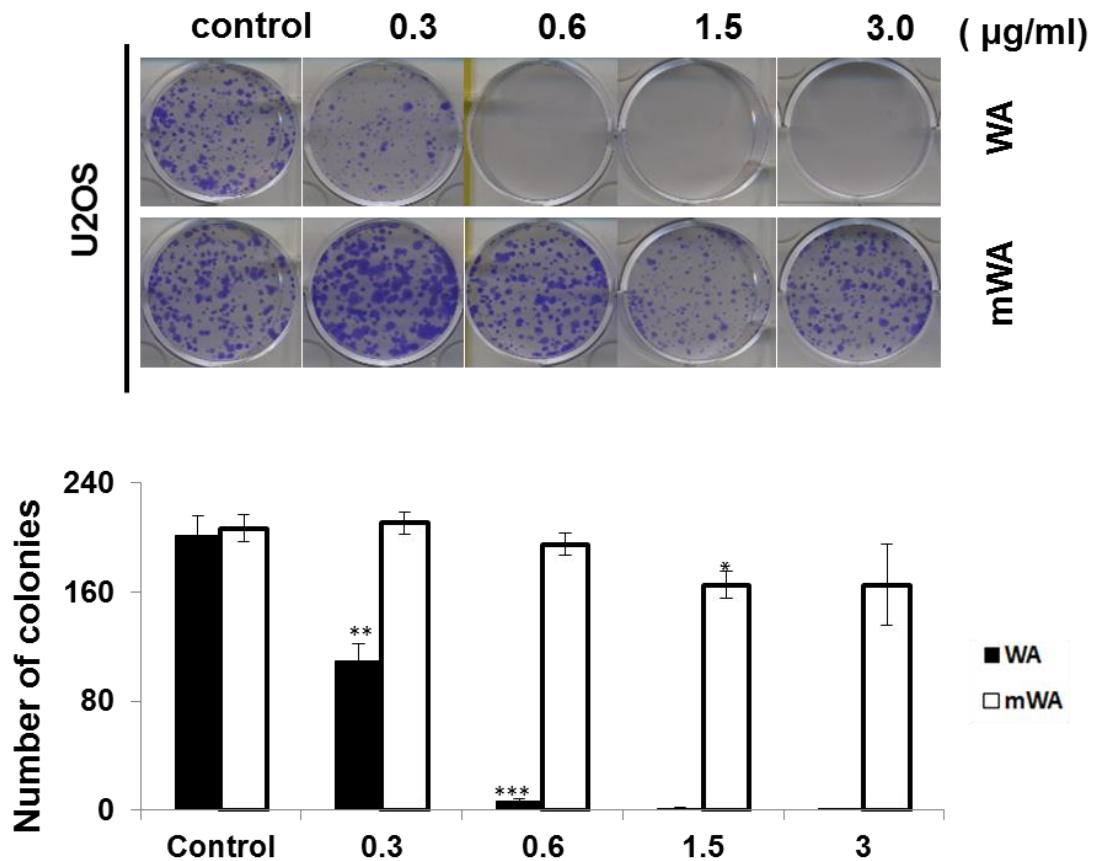


図 2-4 U2OS 細胞生存実験 (コロニー形成アッセイ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、コロニー形成アッセイにより、細胞の増殖状況を確定した。WA を投入した組が 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、細胞は基本的にコロニー形成できなかつた、死亡細胞が 90%以上である。一方、MWA の投入組が 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度で、コロニー形成できなかつた。

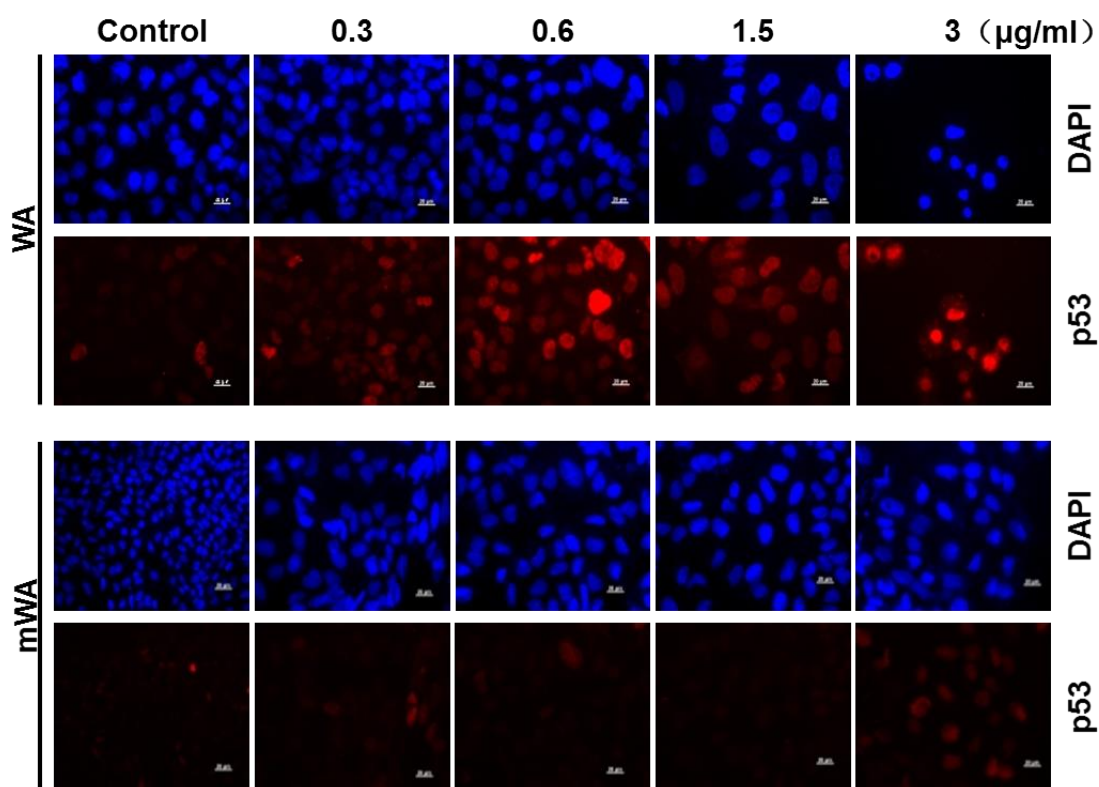


図 2-6 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響  
(U2OS 細胞免疫蛍光染色像)

WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した。WA による処理組における p53 の免疫染色化学分析に、0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の用量で、細胞核の染色が非常に強くなることを明らかにした。p53 と p21 染色強度は 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで、ようやく核の染色を見られた。

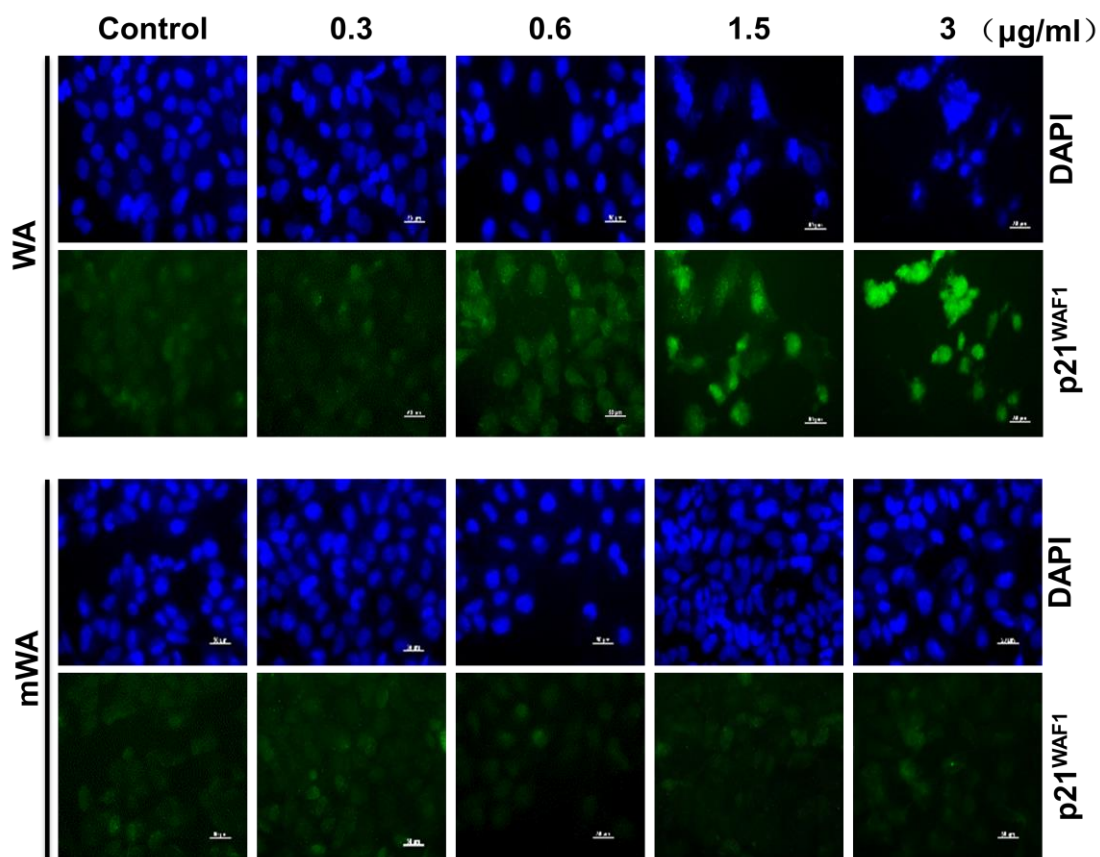


図 2-7 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響  
(U2OS 細胞免疫蛍光染色像)

WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した。WA による処理組における p21<sup>WAF1</sup> の免疫染色化学分析に、0.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の用量で、細胞核の染色が非常に強くなることを明らかにした。mWA の投入組が染色強度の変化がわずかであり、有意義なタンパク質の変化をみられなかった。

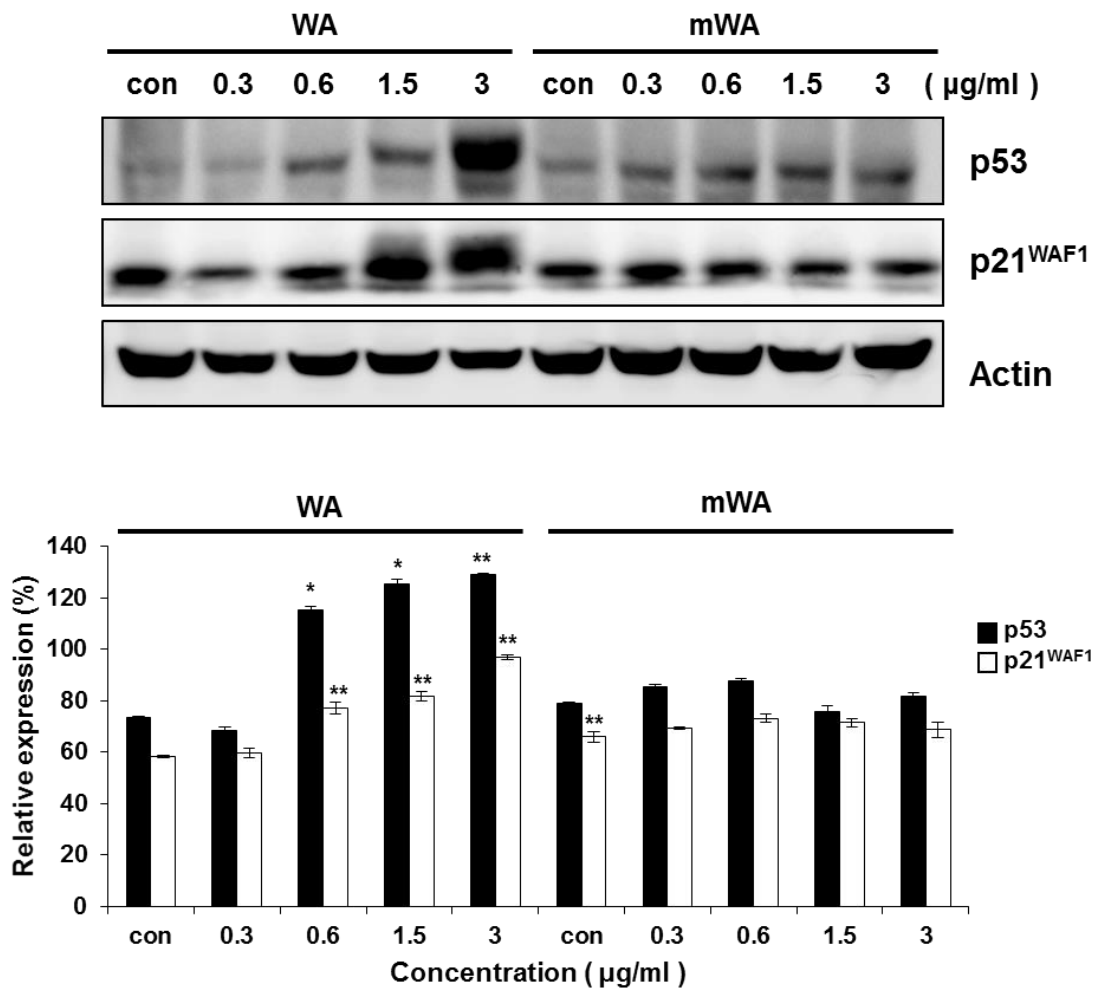


図 2-8 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理組に低用量で p53 と p21 タンパク質の量が上昇された。一方、MWA の処理組に高用量で p53 と p21 タンパク質の発現レベルの大きに変化を示さなかった。

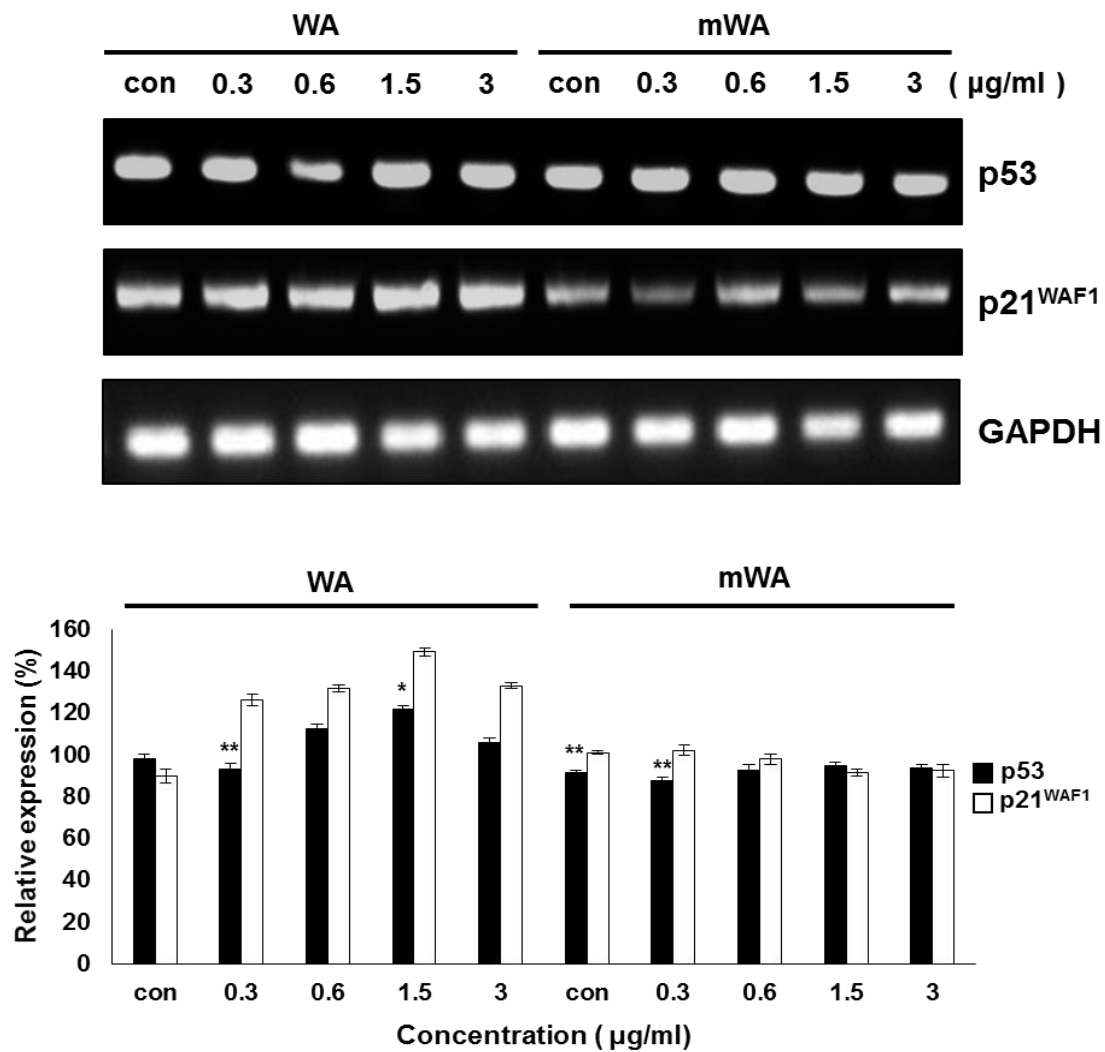


図 2-9 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(U2OS 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA による処理組において、p53 と p21 遺伝子の mRNA 量が有意な上昇を見出した。一方、mWA の処理組の p53 遺伝子の mRNA 量の発現が有意な変化が見られなかった。

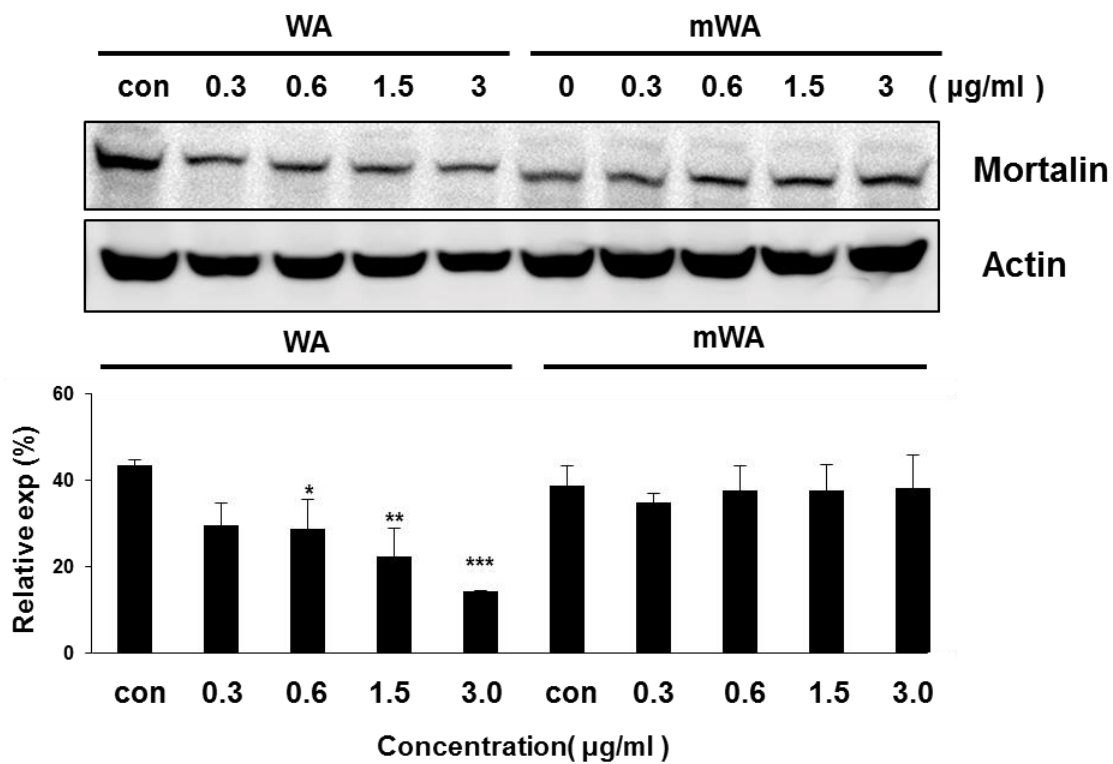


図 2-10 p53 を増加させる要因—Mortalin タンパク質の作用

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理した U2OS 細胞における Mortalin 発現量が濃度に従って増加した。MWA の処理した Mortalin タンパク質の発現量が mWA の濃度なりの変化が見られなかった。

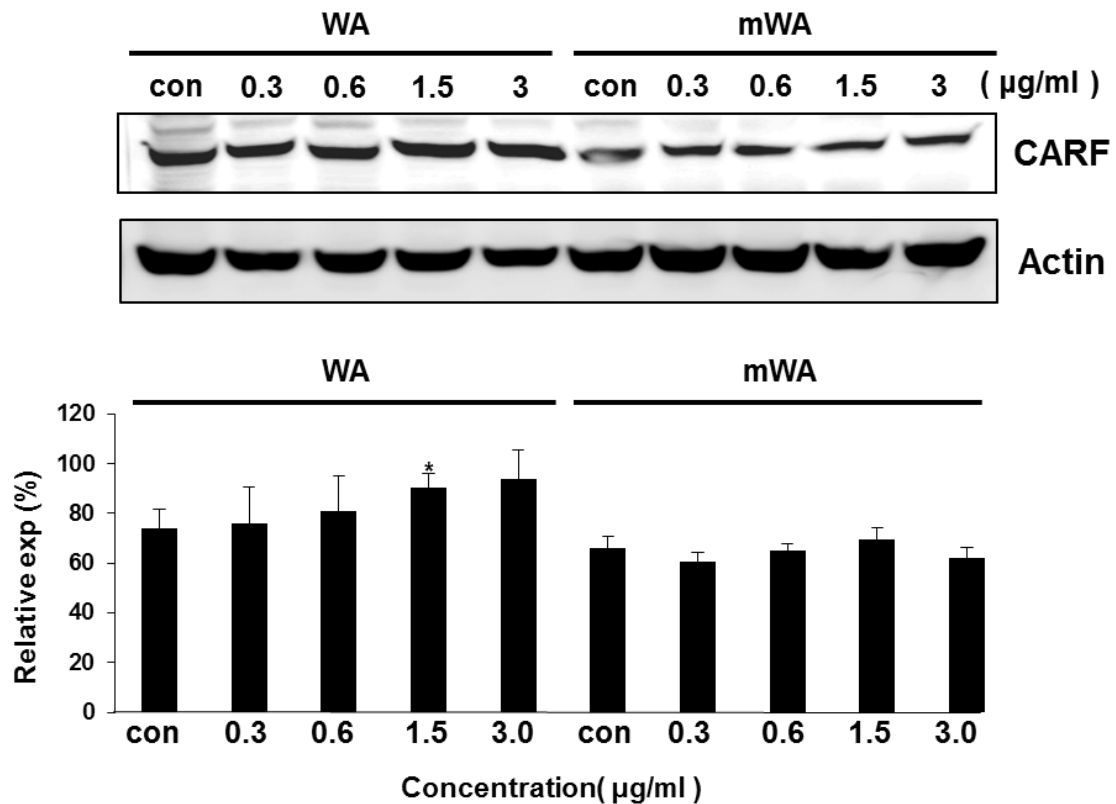


図 2-11 p53 を増加させる要因—CARF タンパク質の作用

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理した U2OS 細胞における CARF 発現量が濃度に従って増加した。mWA の処理した CARF タンパク質の発現量が mWA の濃度なりに有意義な変化が見られなかった。

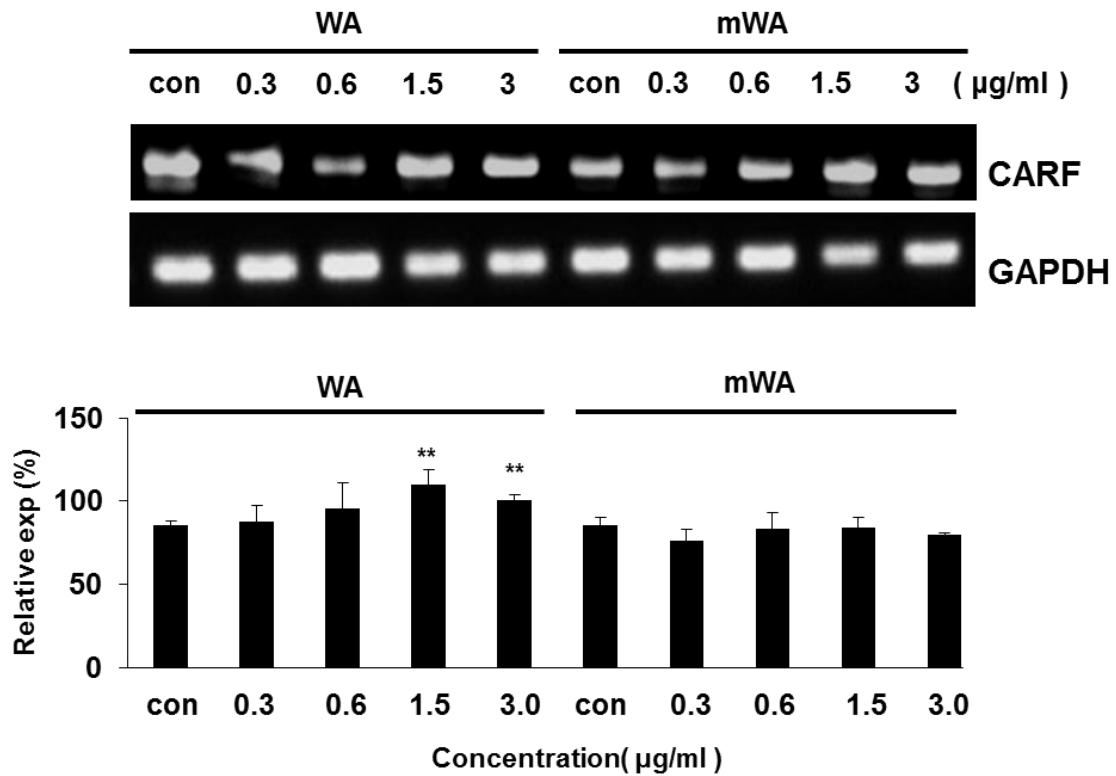


図 2-12 p53 を増加させる要因—CARF タンパク質の作用

(U2OS 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA による処理組において、mRNA の発現量が増加した、mWA の処理組に有意義な効果がなかった。



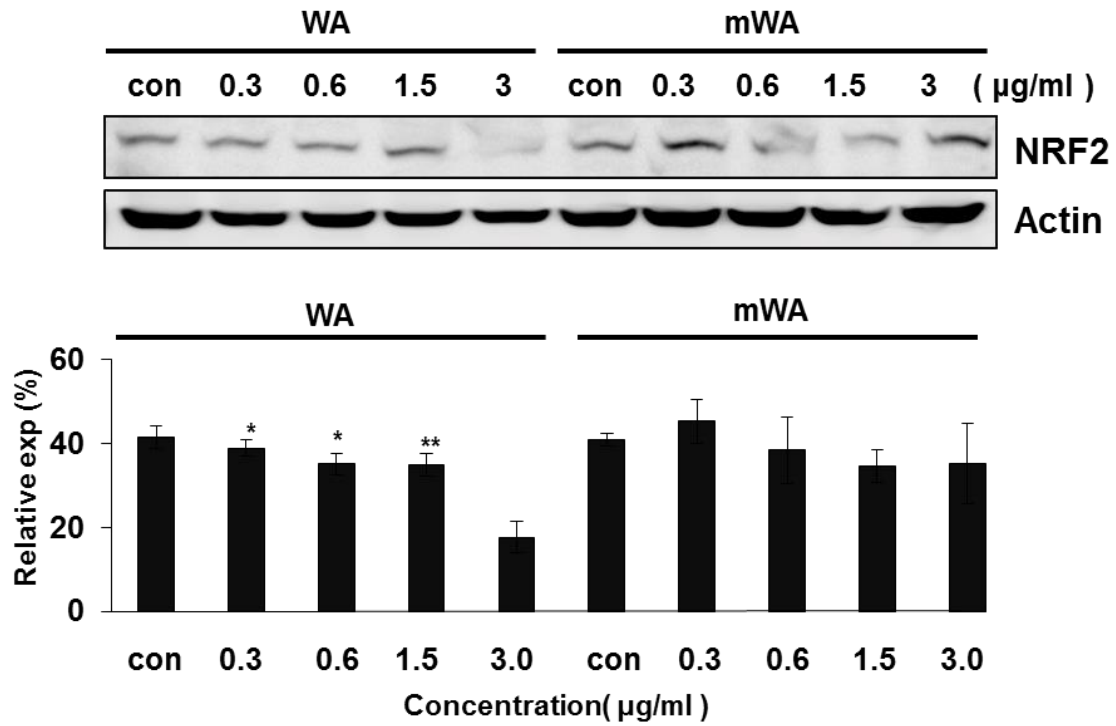


図 2-13 NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化ストレス応答  
(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA の処理組、NRF2 の発現量が濃度の増加に伴って減少し、mWA 処理した U2OS 細胞の NRF2 が有意義な変化が見られなかった。

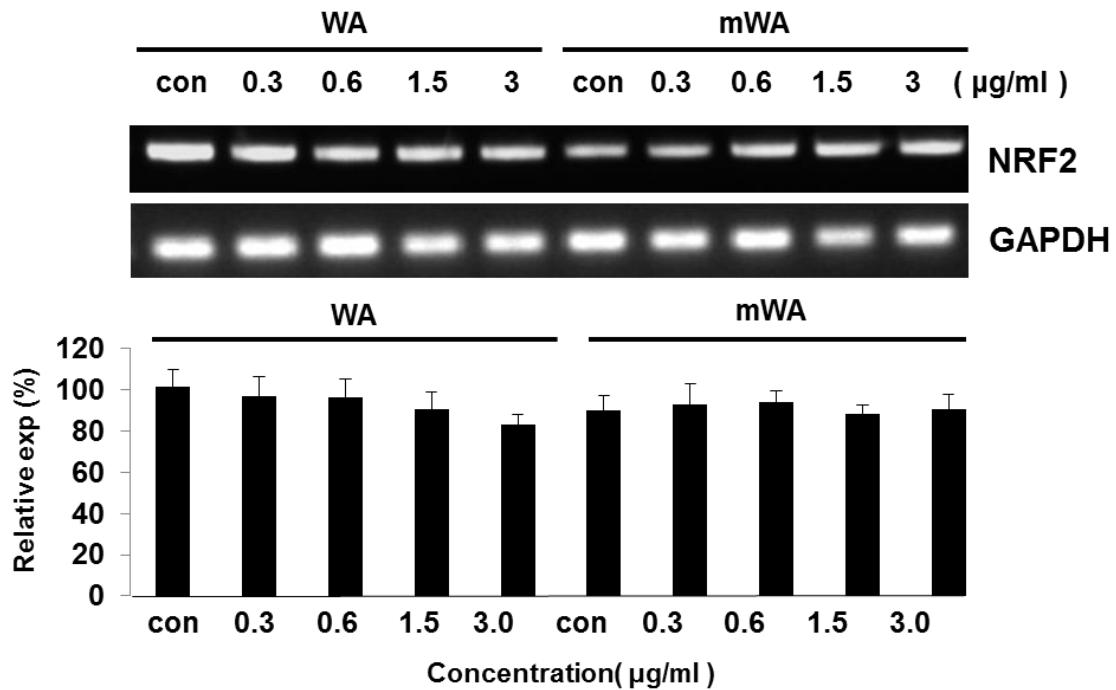


図 2-14 NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化的ストレス応答

(U2OS 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA の処理組の NRF2 の mRNA 発現量が濃度の増加に従って減少した、mWA の処理組が逆に増加した。

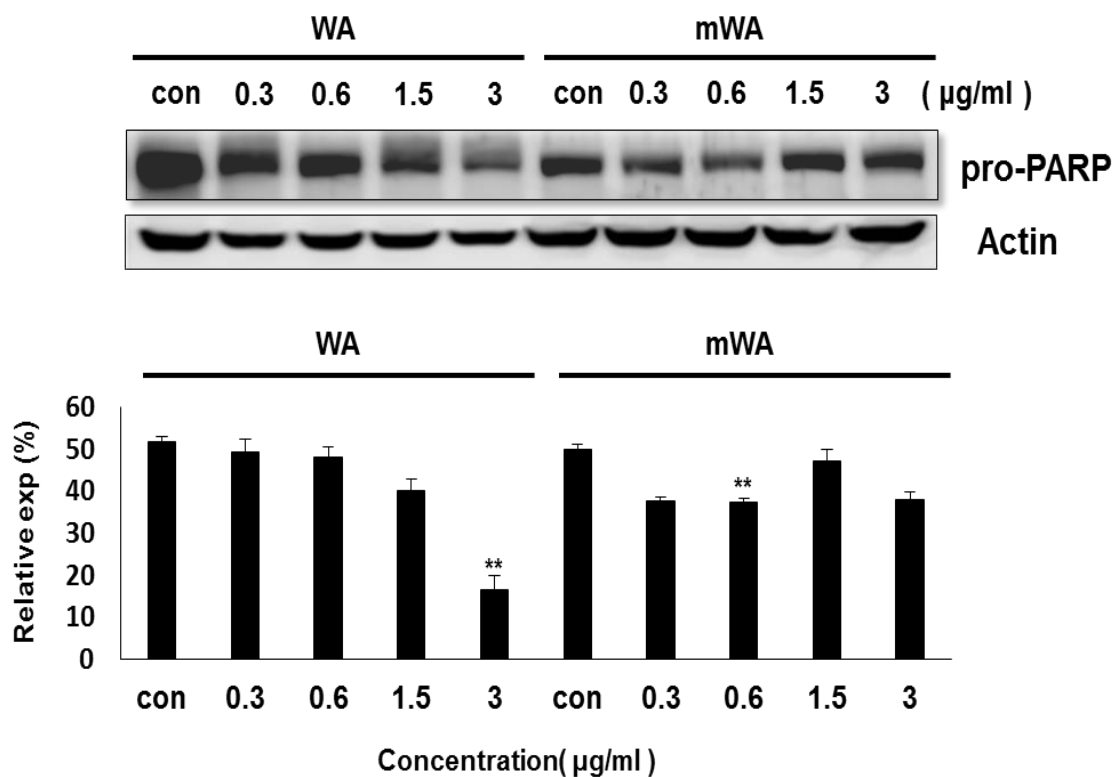


図 2-15 pro-PARP タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理した U2OS 細胞における pro-PARP タンパク質量の発現が濃度の増加に反して、減少することを確認した。mWA の処理組の有意義な結果がなかった。

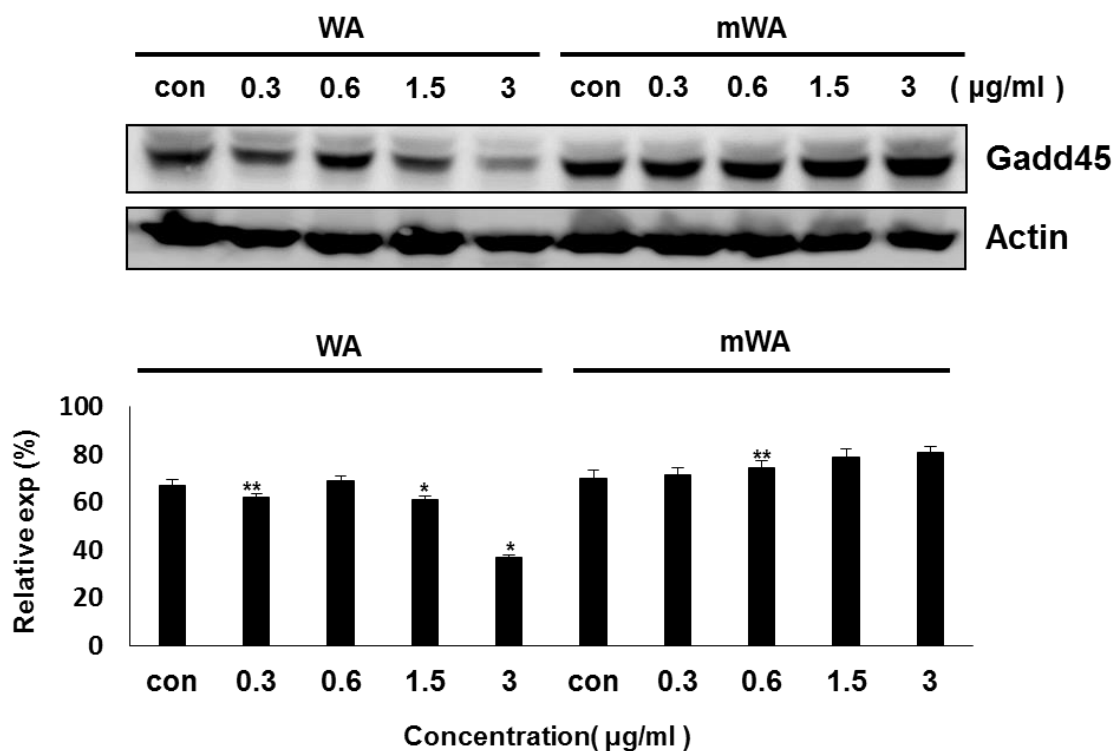


図 2-16 Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理した U2OS 細胞における Gadd45 タンパク質量の発現が濃度の増加に反して、減少した。MWA の処理組の Gadd45 タンパク質が増加した。

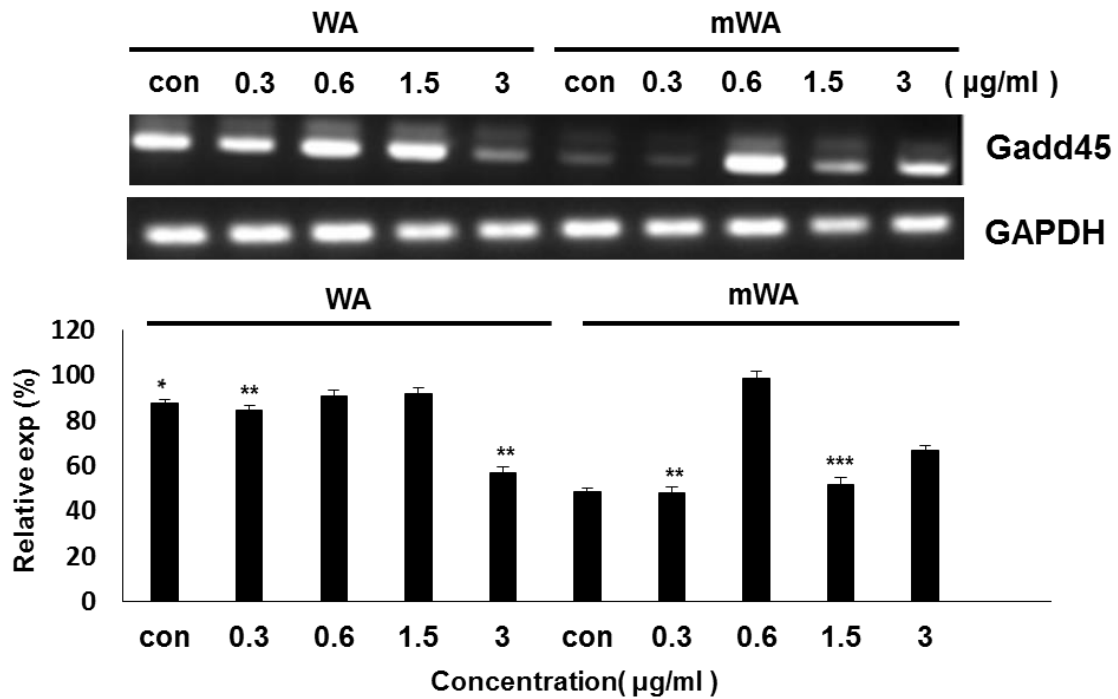


図 2-17 Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響

(U2OS 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA の処理組の Gadd45 遺伝子 mRNA の量が 3.0 μg/ml の濃度に減少した。MWA の処理組に有意義な変化がなかった。

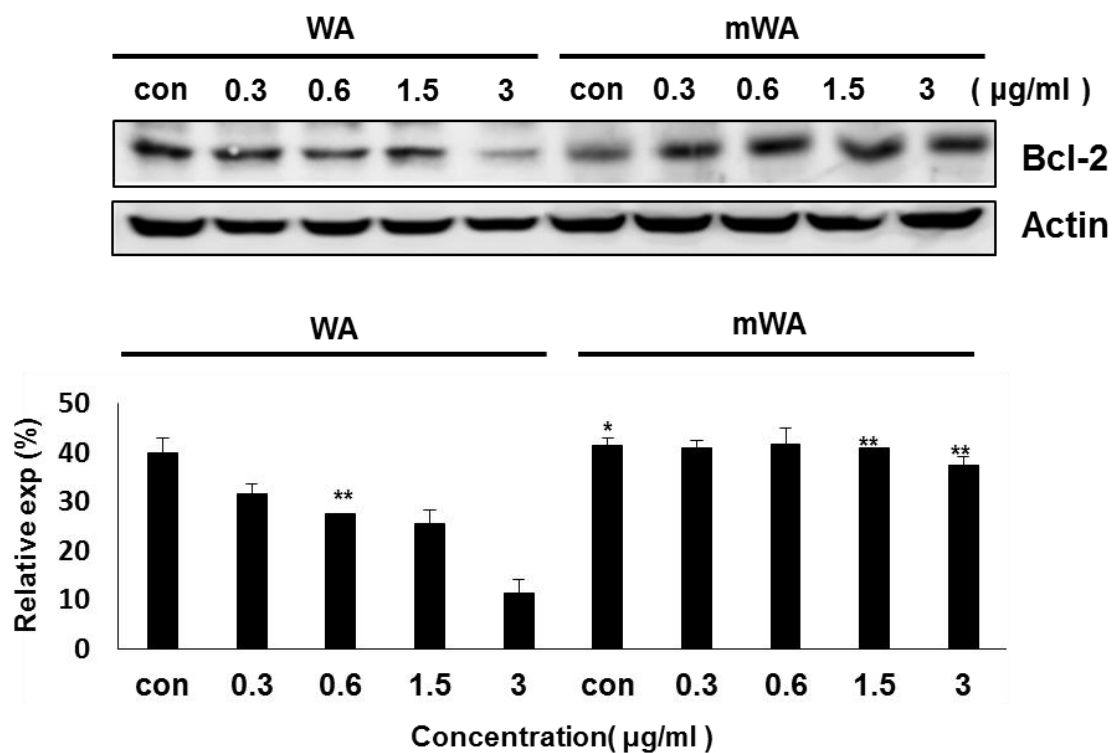


図 2-18 Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理組に Bcl-2 タンパク質の発現量が減少し、mWA による処理 Bcl-2 タンパク質の発現量が増えることが確認した。

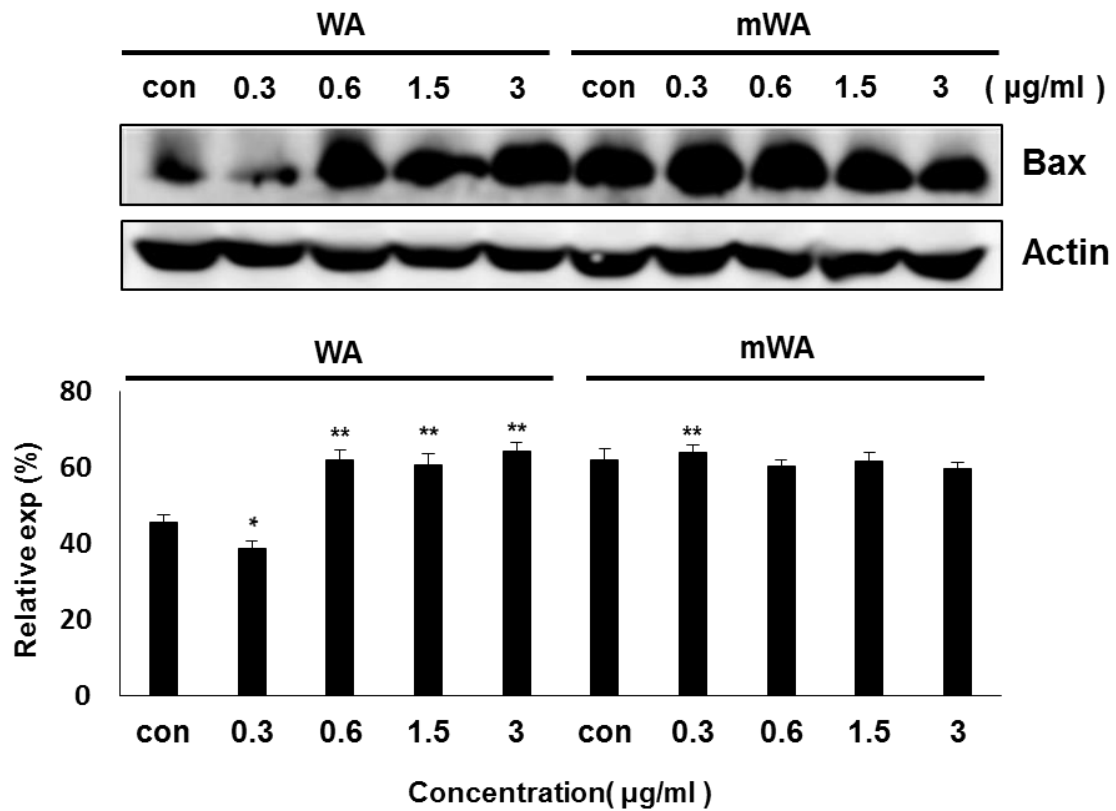


図 2-19 Bax シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

(U2OS 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理組に、Bax タンパク質発現量が増加した。mWA による処理した Bax タンパク質量の変化がみられなかった。

## 第3章 正常細胞における Withaferin A とメトキシ Withaferin A の分子機構

### 3-1 緒言

アシュワガンダ (*Withania somnifera*) は、インドの伝統的アーユルヴェーダ医学から伝わってきた薬草の一つで、古くから「若返りの妙薬」として用いられて、滋養強壯を目的に、健康と長寿の維持として、使われてきた。現在まで同定された主なアシュワガンダの有効成分はステロイドラクトン類とステロイドグラス類に分類される。このステロイドラクトン類の中に、WithaferinA, WithanolideA, Withanoside と Withanone などの成分がある。これらのほとんどは、ヒトがん細胞に対して毒性がある<sup>(3, 4, 5)</sup>。だが、その細胞毒性の分子メカニズムはいまだに完全に究明されていない。前節に、withaferin A (WA) およびそのメトキシ化合物 (mWA) のがん細胞に対する効果を調べ、WA が人骨肉腫細胞の U20S に対し、強い毒性があると判明した。これに対し、mWA ががん細胞に弱い毒性があると判明し、標的タンパク質との相互作用がかなり低かったと推測できた。本章では、withaferin A (WA) およびそのメトキシ化合物 (mWA) の正常細胞に対する効果を調べ、目標タンパク質の生物活性が変わるという想定をターゲットして、正常細胞内における WA と MWA の効果について検証を行った。ヒト線維芽細胞 TIG3 に対し、Withaferin A と対照しながら、細胞周期進行、酸化的ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの面で、研究を行った。

### 3-2 方法



### 3-2-1 細胞培養

細胞培養の細胞株ヒト胎児肺正常線維芽細胞 TIG3 は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。培養条件と方法が同 1-3-1 (図 3-1)

### 3-2-2 MTT Assay

TIG3 細胞を 5000 ずつ 96 ウェル培養プレートに播種した。実験条件と方法が同 1-3-2

### 3-2-3 コロニー形成アッセイ

実験条件と方法が同 1-3-3

### 3-2-4 免疫染色

12 ウェル培養プレート上でカバーガラスに広げ、細胞を 50000 ずつ培養プレートに播種した。実験条件と方法が同 1-3-4

### 3-2-5 細胞タンパク質の測定

6 ウェルプレートに 80000 の U2OS 細胞/ウェル播種した。実験条件と方法が同 1-3-5

### 3-2-6 ウェスタンブロット

実験条件と方法が同 1-3-6

### 3-2-7 トータル RNA 精製

実験条件と方法が同 1-3-7

### 3-2-8 ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

実験条件と方法が同 1-3-8

## 3-3 結果と分析

### 3-3-1 細胞毒性と細胞生存率

まず、WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、MTT アッセイにより、細胞障害を測定した。使用細胞は TIG3 のほか、MRC5 (ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞)、WI38 (ヒト胎児肺由来正常繊維芽細胞) 2 種類であった。その結果、WA を投入した組に対し、非常に強い正常細胞に対する障害が起こることが明らかにした (図 3-2)。WA と比べ、MWA の投入組ががん細胞に対し、有効な障害を引き起こらなかった。1.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、WA による処理された正常細胞らが全部半数以上の致死率を達成したことに対し、MWA による処理された正常細胞の致死率がほぼ検出しなかった (図 3-3、4)。

つぎ、WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、コロニー形成アッセイにより、細胞の増殖状況を確定した。WA を投入した組が 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、細胞は基本的にコロニー形成できない、死亡細胞が 90%以上である。強い増殖障害をもたらした。一方、mWA の投入組が 3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度で、コロニー形成できない。細胞の増殖障害があるものの、強くはなかった (図 3-5)。

### 3-3-2 免疫染色 (ICC)

12 ウェル培養プレートに WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>

染色強度が WA 濃度に従って、濃度が高くなると強くなったため、タンパク質の発見が上昇だと判断した。mWA の投入組が p53 の染色強度の変化が濃度に従って上昇することが分かったが、WA の投入組により、染色強度の変化程度が弱かった。

### 3-3-3 ウェスタンブロット

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、ゲルに注入し、実験を行った。ニトロセルロース膜に履く感光線の濃さにより、各タンパク質の量を判断した。p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、CARF、KEAP1、NRF2 感光線の強度が WA 濃度に従って、強度が高くなると強くなったため、タンパク質の発見が上昇したと判断された。かわりに、Mortalin、PARP、Gadd45、Bcl-2、感光線の強度が WA 濃度に反して、濃度が高くなると弱くなったため、タンパク質の発見が下降だと判断した。MWA の投入組が Mortalin、PARP、NRF2 濃度に従って、強度が高くとも強くなったため、タンパク質の発見が上昇したと判断された。p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、Gadd45、CARF、KEAP1 タンパク感光線の強度が変化が少なかったため、タンパク質の発見量増減の判断が不可能である。

### 3-3-4 ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0、6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、PCR 産物をゲルに注入し、実験を行った。ゲルの感光線の濃さにより、各プライマーにより、mRNA の量を判断した。各プライマーは以下のように、すべて

p53 (+ 5' -CTGCCCTCAACAAGATGTTTTG-3'  
 p53 (- 5' -CTATCTGAGCAGCGCTCATGG-3'  
 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (+) 5' -ATGAAATTCACCCCCTTTCC-3'  
 p21<sup>CIP1/WAF1</sup> (-) 5' -CCCTAGGCTGTGCTCACTTC-3' ,  
 Bcl-2 (+) 5' - GTGGAGGAGCTCTTCAGGGA -3'  
 Bcl-2 (-) 5' - AGGCACCCAGGGTGATGCAA-3'  
 GAPDH (+) 5' -ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3  
 GAPDH (-) 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' .  
 NRF2 (+) 5' -GCGACGGAAAGAGTACGAC-3'  
 NRF2 (-) 5' -GTTGGCAGATCCACTGGTTT-3'  
 CARF (+) 5' -TCAAAGTGACAGATGCTCCA-3'  
 CARF (-) 5' -CGTTGGAAGTGTTCCTGCT-3'

p53、p21<sup>CIP1/WAF1</sup>、CARF 感光線の強度が WA 濃度に従って、濃度が高くなると強くなったため、各プライマーなりの mRNA の発見が上昇したと判断された。かわりに、NRF2、Bcl-2、感光線の強度が WA 濃度に反して、濃度が高くなると弱くなったため、各プライマーなりの mRNA の発見が下降したと判断された。mWA の投入組が p21<sup>CIP1/WAF1</sup> NRF2 の感光線強度が濃度に従って下降した。本実験では p53 の強度による判断が不可能である。

### 3-3-5 データの統計分析

すべての実験は3回以上を行った。実験結果の統計処理には Mann-Whitney Test を用いた。統計は統計解析ソフト StatView (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) を用いて解析した。

### 3-3-6 p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路による細胞周期への影響

p53 遺伝子は、ヒトの染色体では 17p13.1 に位置し、腫瘍抑制遺伝子として知られている。その産物である p53 タンパク質は、分子量 53000Da、393 アミノ酸から成り、細胞周期の制御やアポトーシスのような細胞死の進行に関与する転写因子として機能している<sup>(17)</sup>。p53 遺伝子の産物である p53 タンパク質が発がん抑制において、中心的な役割を果たしていることが明らかになった<sup>(18)</sup>。p53 蛋白質は p21 などの遺伝子の発現を制御する転写因子である。p21 は、転写因子である p53 が活性化されることにより、発現を誘導され、主に CDK2 と結合し、CDK2 の機能を抑制するので、細胞周期の G1 期から S 期の停止に関わる。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で、TIG3 細胞に投入し、p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> の発見は免疫染色、ウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。WA による処理した TIG3 細胞における p53 の免疫染色化学分析に、用量に従って、細胞の大部分において p53 による核の染色が非常に強くなることを明らかにした。WA による処理したと、細胞質の p53 タンパク質が細胞核に移し、転写因子として機能した。いわば、p53 の活性化を示唆した。mWA 処理した TIG3 細胞の p53 染色強度は 0.6  $\mu\text{g/ml}$  の濃度から、核の染色が強くなるが見られた。大きな変化を示さなかった (図 3-6)。ウエスタンブロットの結果も同じく、WA による処理された TIG3 細胞に p53 タンパク質の量がアップレギュレートされたことが発見した。一方、mWA の処理した細胞でも 3.0  $\mu\text{g/ml}$  程度の高い用量で p53 タンパク質の発現レベルの変化を示さなかった (図 3-8)。

このように、WAによる処理された TIG3 細胞の p53 タンパク質の発現が WA の濃度に従って上昇した。mWA の処理した TIG3 細胞の p53 タンパク質の発現も mWA の濃度なりの変化が見られなかった。そして、p53 伝子の mRNA 量が RT-PCR 法により解析した。WA による処理した TIG3 細胞において、p53 遺伝子の mRNA 量が有意なアップレギュレーションになった。mWA の処理した TIG3 細胞の p53 遺伝子の mRNA 量の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 3-9)。p53 遺伝子 mRNA 量のアップレギュレーションにより、その産物である p53 タンパク質の増加につながると示唆した。

p 21<sup>CIP1/WAF1</sup> のタンパク質の免疫染色、ウエスタンブロットによる解析の結果が p53 と同じく、WA による処理された TIG3 細胞の p 21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質の発現が WA の濃度に従って上昇した。mmWA の処理した TIG3 細胞の p 21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 3-7、8)。RT-PCR 法により解析の結果に、WA、mWA による処理された TIG3 細胞 p 21<sup>CIP1/WAF1</sup> 遺伝子の mRNA 量の変化が見られなかった (図 3-9)。p 21<sup>CIP1/WAF1</sup> のタンパク質量の増加は p53 タンパク質の誘導によると考えられる。

### 3-3-7 p53 を増加させる要因—Mortalin と CARF タンパク質のアップレギュレーション

Mortalin は細胞寿命決定に関連するタンパク質として同定された Hsp70 ファミリーに属するタンパク質である。Mortalin は p53 と相互作用をして、この相互作用によって核活性を阻害し、細胞質における p53 の隔離を促進することが示唆された<sup>(19, 20)</sup>。CARF タンパク質のアップレギュレーションは、p53 経路の活性化を介して、正常細胞の早期老化とヒトがん細胞の増殖停止を引き起こすことが示された<sup>(21)</sup>。

本研究は WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、TIG3 細胞に投入し、Mortalin と CARF タンパク質の発現はウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。ウエスタンブロット実験に、WA による処理した TIG3 細胞における Mortalin タンパク質の量が濃度の増量と反して、減っていた。CARF タンパク質量が濃度に従って、増加した。mWA の処理した TIG 細胞の Mortalin タンパク質の発現が濃度に従って、強度が上がるのがわかった。CARF タンパク質の発現が mWA の濃度なりの変化が見られなかった (図 3-10)。RT-PCR に、WA と mWA の処理組に有意義な結果を得なかった (図 3-11)。これによって、WA の処理組に細胞の中に、Mortalin タンパク質の減少したと CARF タンパク質が細胞内のアップレギュレーションしたことがわかった。この原因により、p53 タンパク質の活性化を引き起こし、さらに、p21<sup>CIP1/WAF1</sup> タンパク質のアップレギュレーションを決定することを示唆した。mWA の処理組に Mortalin タンパク質の量が濃度に従って増加することにより、mWA が正常細胞において、p53 タンパク質発現量の減少につながることを示唆した。

### 3-3-8 NRF2 と KEAP1 シグナル伝達通路による細胞酸化ストレス応答への影響

NRF2 は、細胞酸化ストレス応答の重要な調節因子である。解毒過程も関与し、細胞内の抗酸化応答を誘導することが示されている<sup>(31)</sup>。NRF2 は細胞質でアクチン結合性因子 KEAP1 と相互作用していて、その転写活性は抑制されている。細胞が酸化ストレスに曝されると NRF2 と KEAP1 の結合が弱まり、NRF2 は安定して細胞核に移行することができるようになる。結果として、生体防御に関わる遺伝子群の転写が促進され、細胞は保護される。一方、がん細胞においては、NRF2 は恒常的に活性化したら、抗酸化酵素や解毒酵素の産生や活性が亢

進している。そのため、がん細胞は酸化ストレスや細胞傷害性物質に対する抵抗性が亢進しており、これが抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性の原因になっている。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、TIG3 細胞に投入し、NRF2 と KEAP1 の発現はウエスタンブロット、RT-PCR による調べた。ウエスタンブロットに WA と mWA による処理した TIG3 細胞における NRF2 の発現がいずれも上昇し、WA 処理した TIG3 細胞の KEAP1 も上昇を見られたが、MWA の処理組の KEAP1 の有意な変化が見られなかった。WA と mWA の投入により NRF2 タンパク質の誘導に役に立つと示されている (図 3-12)。そして、NRF2 遺伝子の mRNA 量が RT-PCR 法により解析した。WA による処理した TIG3 細胞において、NRF2 遺伝子の mRNA 量が減少を見られ、mWA の処理組が変化を見られなかった (図 3-13)。

### 3-3-9 PARP、Gadd45 タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響

PARP タンパク質は DNA の損傷領域付近のクロマチン構造を修飾することが知られている。Gadd45 タンパク質は放射線・UV・DNA 障害剤などにより発現が誘導され、DNA 修復に関与している。<sup>(22、23、24)</sup>

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、TIG3 細胞に投入し、ウエスタンブロットによる調べた。この結果、WA による処理した TIG3 細胞において、WA による処理した TIG3 細胞における PARP タンパク質、Gadd45 タンパク質のウエスタンブロットに、タンパク質量の発現が濃度の増加に反して、減少することを確認した。mWA による処理した PARP タンパク質の発現が濃度に従って、増加した (図 3-14)。このように、WA による処理したとすると、DNA 修復に関与しているタンパク質との量が減少した。いわゆる、細胞 DNA 損傷



の修復に対し、何らかの障害が生じると示唆した。mWA の処理組が逆に DNA 損傷修復因子の増加より、DNA 修復の関与に強くなった。

### 3-3-10 p53、Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

Bcl-2 タンパク質も Bcl-2 ファミリーに属する、抗アポトーシスタンパク質である<sup>(26)</sup>。このアポトーシスシグナル伝達通路の機能はアポトーシス誘導タンパク質の p53 やアポトーシスを調節する Bcl-2 ファミリータンパク質を介して、カスパーゼファミリーのタンパク質により、完成させるものである。

この研究は WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu$ g/ml の濃度で、TIG3 細胞に投入し、Bcl-2 タンパク質にウエスタンブロットと RT-PCR 実験を行った。この結果、ウエスタンブロット実験に、WA による処理した TIG3 細胞における Bcl-2 タンパク質の発現が濃度に従って減少し、RT-PCR 実験にも WA の処理組の遺伝子 mRNA 量の発現も減少した。mWA による処理した U2OS 細胞における Bcl-2 タンパク質量が増えることが確認した。RT-PCR 実験に mWA の処理組の遺伝子 mRNA 量に関しては有意義な結果がなかった (図 15、16)。これによって、WA による処理した TIG3 細胞における Bcl-2 タンパク質のアポトーシスの抑制が弱まっていた。逆に mWA の処理組が増強したことを示唆した。このように、WA による処理した TIG3 細胞にたいし、p53 タンパク質の表現量の増加に従って、Bcl-2 タンパク質の発現量が減少したことにより、アポトーシスの促進することを示唆した。mWA の処理組が逆に抑制することを示した。

### 3-4 考察

分子レベルの実験の検証により、TIG3 細胞における WA とそのメトキシ誘導体 mWA が標的タンパク質との相互作用を確認された。細胞周期進行、酸化的ストレ

ス応答、DNA 障害修復、アポトーシスなどの面で、WA と比較して、mWA と標的タンパク質との相互作用が低かったと推測できた。

WA は細胞核周辺の Mortalin タンパク質の減少したことにより、細胞質における p53 の隔離を解消させ、p53 タンパク質が細胞核に大量進出を果たせ、活性化を引き起こした。CARF タンパク質発現の活性化により、p53 タンパク質の抑制因子を抑え、p53 を活性化した。この原因で、細胞のアポトーシスと周期停止を誘導する p53 を活性化したことにより、p53 と p21<sup>CIP1/WAF1</sup> シグナル伝達通路の促進によって、CDK2 の機能を抑制するので、細胞周期の G1 期から S 期の停止に誘導した。Bcl-2 ファミリーの Bcl-2 と Bax タンパク質を作用し、TIG3 細胞のアポトーシスを誘導した。これが正常細胞の致死率が高いことと関係があると示した。しかし、NRF2 と KEAP1 細胞酸化ストレス応答因子の調節により、正常細胞の酸化ストレスや細胞傷害性物質に対する抵抗性を増強し、外界の刺激から正常細胞の抵抗性を高める可能性を示唆した。さらに、DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 タンパク質の作用を抑え、DNA 損傷の修復をされなくなり、細胞死が誘導される。これに反して、MWA による処理された組に DNA 損傷因子との相互作用が確認できなかった。

がん細胞の場合と同じく、mWA がアポトーシスと周期停止などの標的タンパク質の結合かなり少なかったため、アポトーシスと周期停止など正常細胞に対する致死率が非常に低いと証明された。

Methoxywithaferin A の濃度が 0.6~6  $\mu$ g/ml の範囲に、正常細胞の増殖促進作用があることと今回の細胞生存アッセイにより、確認した。今までの報告では、似たようなアシュワガンダ成分の Withanone が正常細胞への毒性がきわめて低いという長所はあるが、生体内での抗腫瘍効果が穏やかなものにとどまり、単独で抗癌剤として用いるためには不十分であった。一定の割合で WA と、併用

し、正常細胞への毒性が WA の単独使用の場合より緩和されたことが明らかにした（【特許文献】特開 2012-111713）（図 3-17）。mWA の正常細胞の保護作用を着目し、一定の割合で WA と併用することによって正常細胞への毒性を低減する効果を十分期待できる。

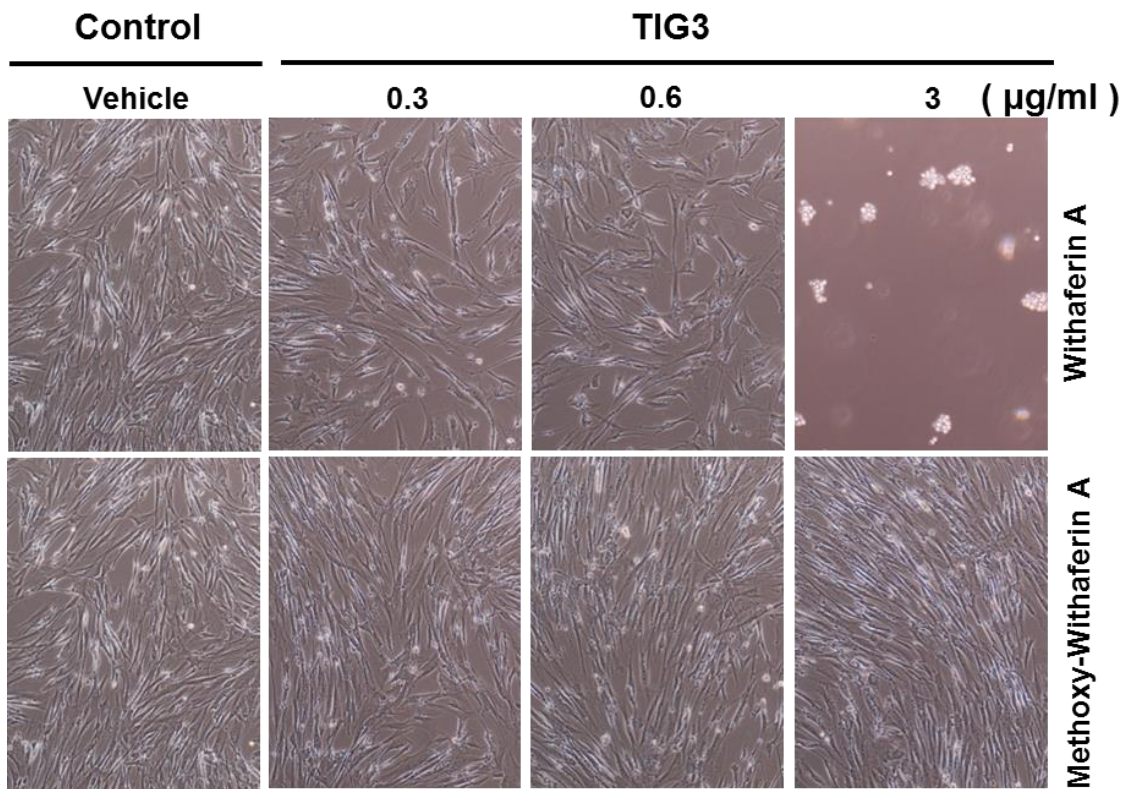


図 3-1 TIG3 細胞の電子顕微鏡像

TIG3 細胞を Withaferin A 及び Methoxy-WithaferinA で 48 時間に処理した。同条件で、Methoxy-WithaferinA に対し、WithaferinA が処理した TIG3 細胞の死亡が多いことが確認した。

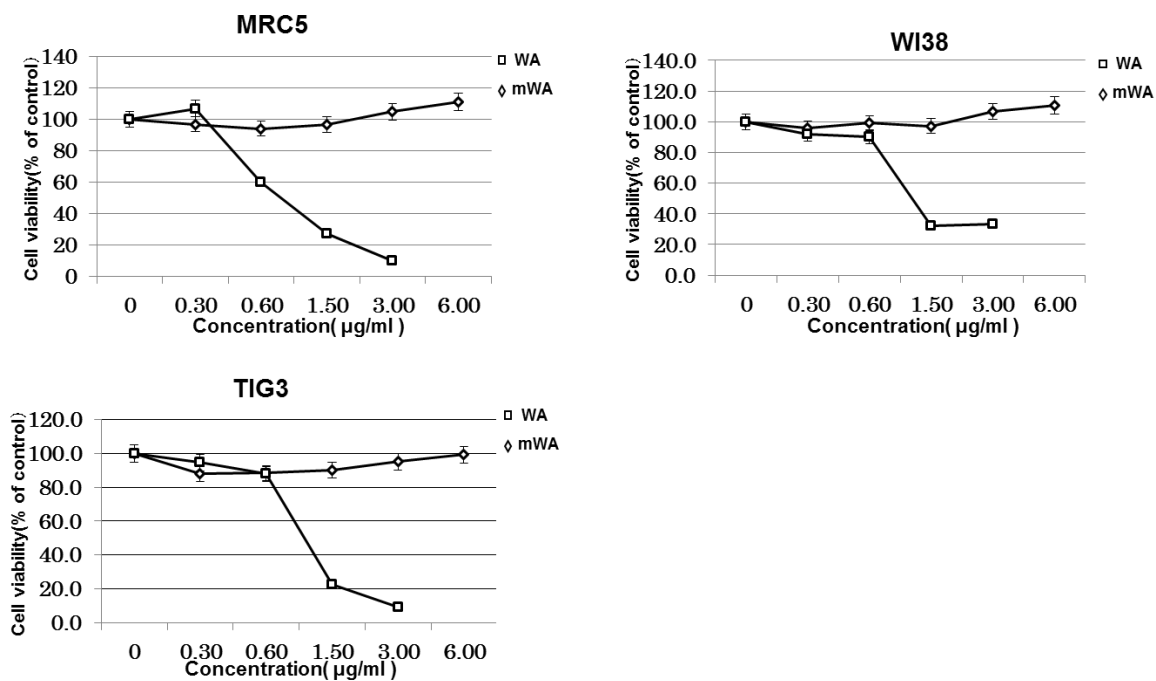


図 3-2 U2OS 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

使用細胞は TIG3 のほか、MRC5 (ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞)、WI38 (ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞) 2 種類であった。その結果、WA を投入した組に対し、非常に強い正常細胞に対する障害が起こることが明らかになった。

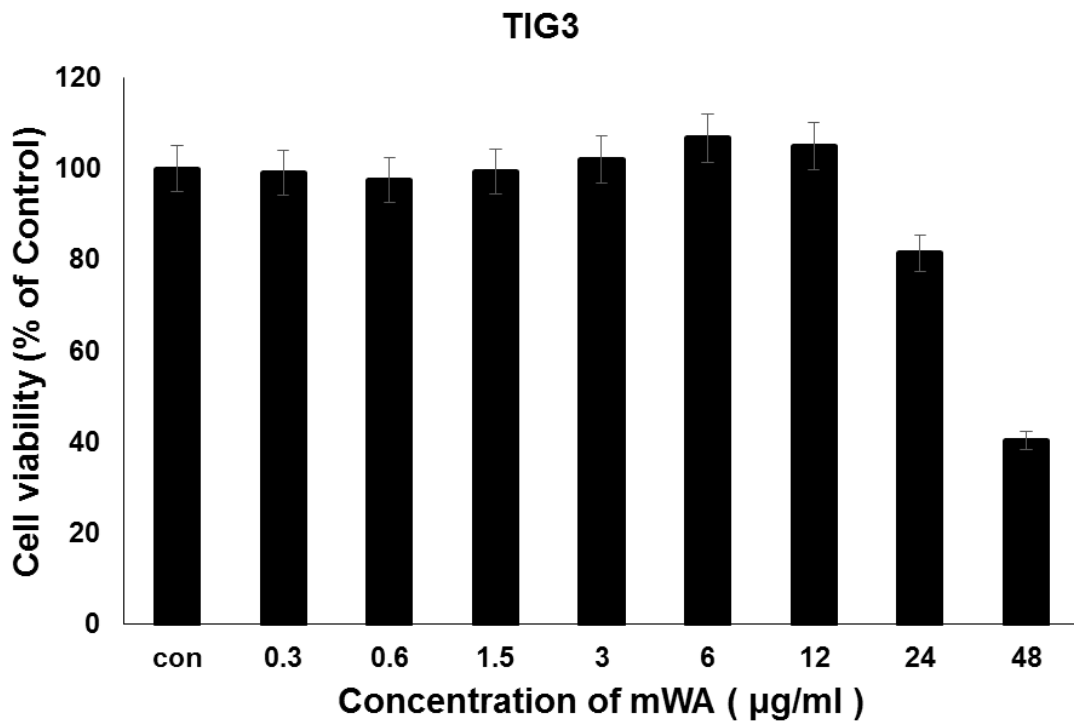


図 3-3 U2OS 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度で、MTT アッセイにより、細胞障害を測定した。WA を投入した組に対し、非常に強い正常細胞に対する障害が起こることが明らかにした。WA と比べ、mWA の投入組ががん細胞に対し、有効な障害を引き起こらなかった。

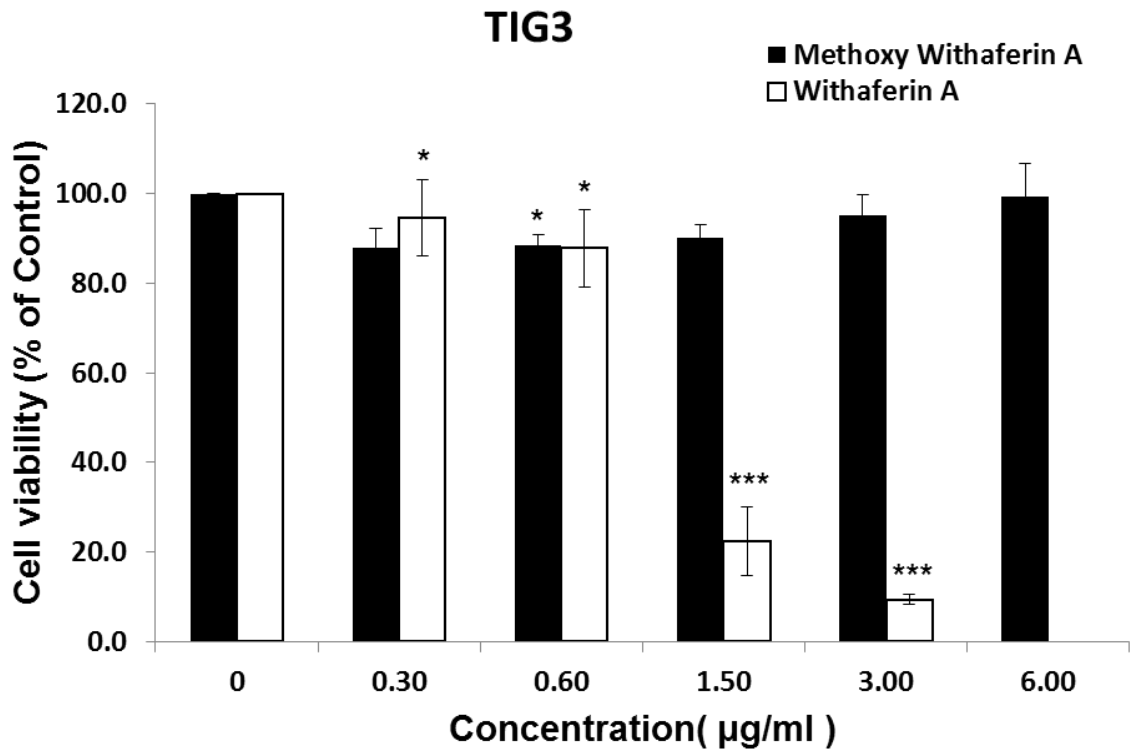


図 3-4 TIG3 細胞生存実験 (MTT アッセイ)

mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0、6.0、12、24、48 µg/ml の濃度で、MTT アッセイにより、濃度が 0.6~6 µg/ml の範囲に、正常細胞の増殖促進作用があることと 12 µg/ml 以上の濃度から正常細胞にダメージを強くし始めることについて、今回の細胞生存アッセイにより、確認した。

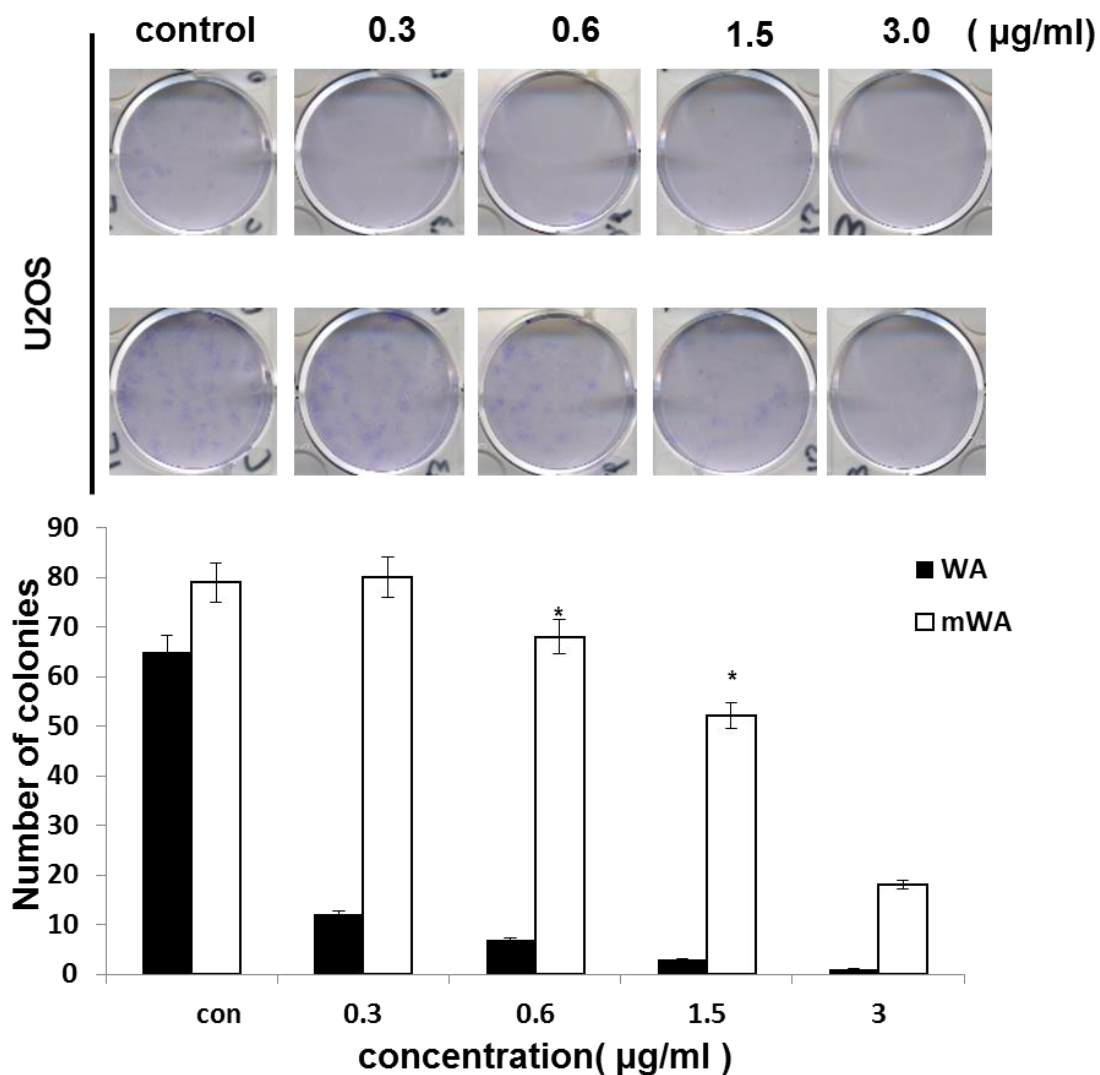


図 3-5 TIG3 細胞生存実験 (コロニー形成アッセイ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で、コロニー形成アッセイにより、細胞の増殖状況を確認した。WA を投入した組が 0.3  $\mu\text{g/ml}$  の濃度から、細胞は基本的にコロニー形成できない、コロニー形成率 12% である。強い増殖障害をもたらした。一方、MWA の投入組が 3.0  $\mu\text{g/ml}$  までの濃度で、コロニー形成率が 18% である。細胞の増殖障害があるものの、強くはなかった。



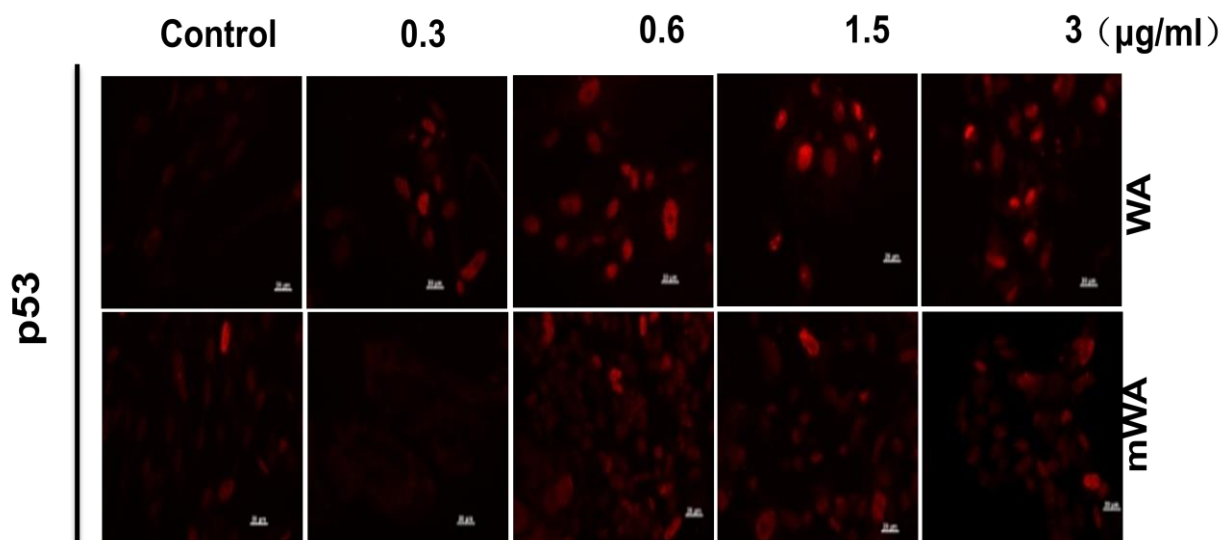


図 3-6 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(TIG3 細胞免疫蛍光染色像)

WA と MWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 µg/ml の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した。WA による処理組における p53 の免疫染色化学分析に、p53 タンパク質による核の染色が非常に強くなった。mWA の処理組に p53 タンパク質の大きな変化を示さなかった。

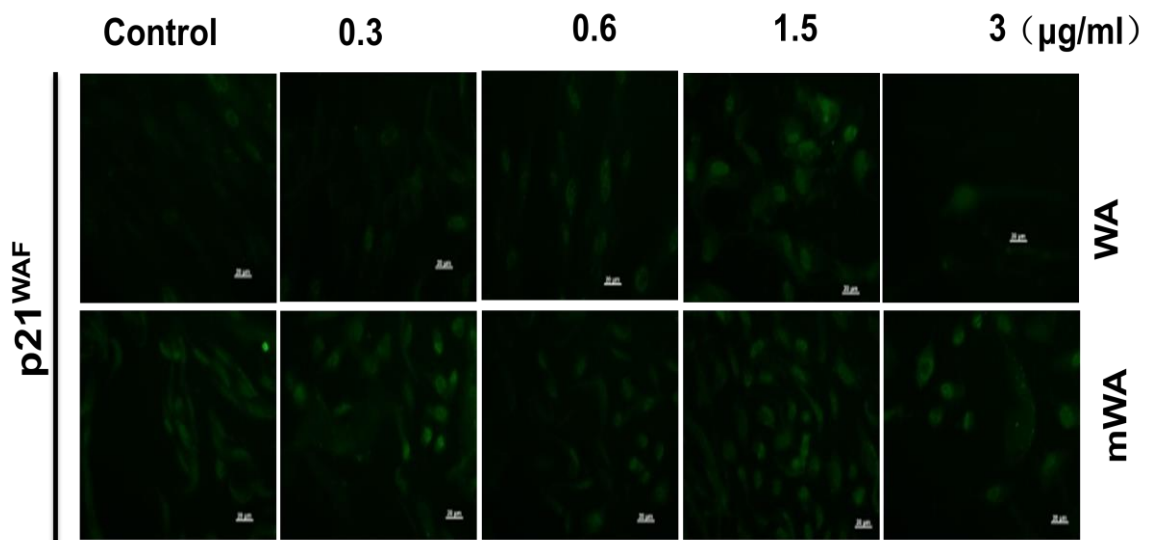


図 3-7 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(TIG3 細胞免疫蛍光染色像)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で、各タンパク質の量の変化を染色により、観察した。WA による処理組における p21<sup>WAF1</sup> の免疫染色化学分析に、p21<sup>WAF1</sup> タンパク質による核の染色が非常に強くなった。mWA の処理組に p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の大きな変化を示さなかった。

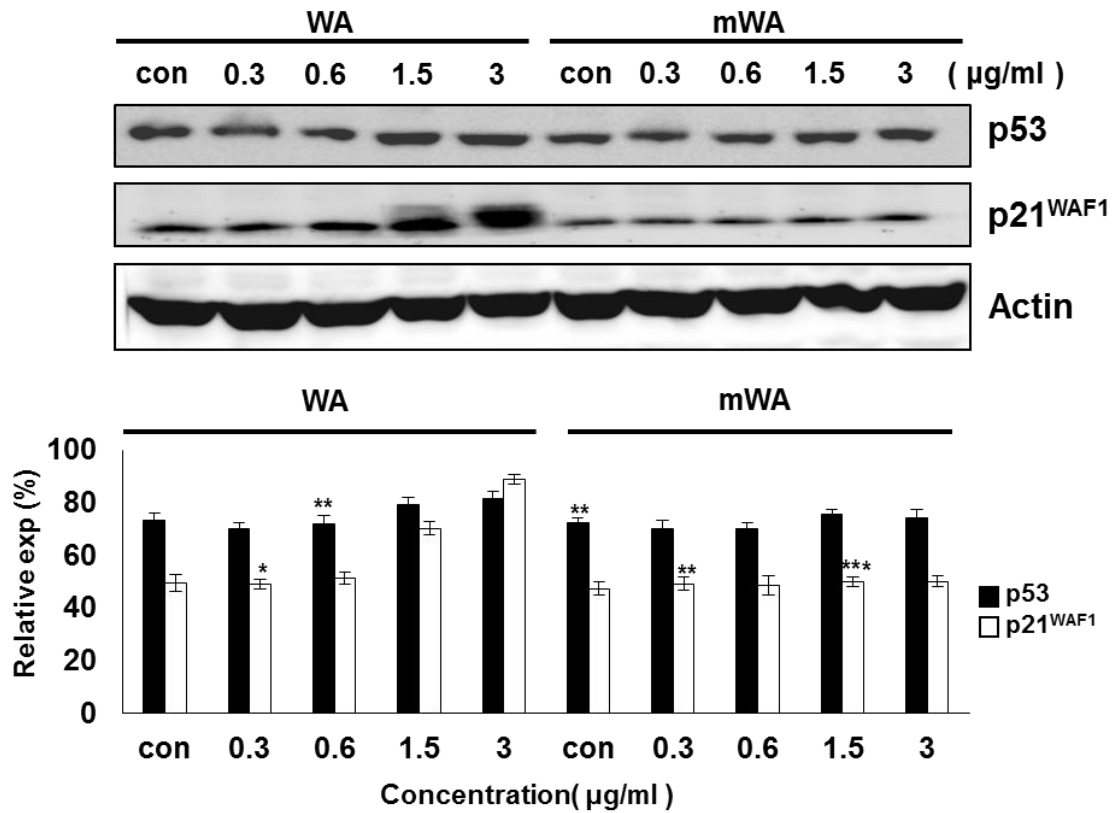


図 3-8 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(TIG3 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA による処理組に p53 と p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の量が上昇された。一方、mWA の処理組に高用量で p53 と p21<sup>WAF1</sup> タンパク質の発現レベルの大きに変化を示さなかった。

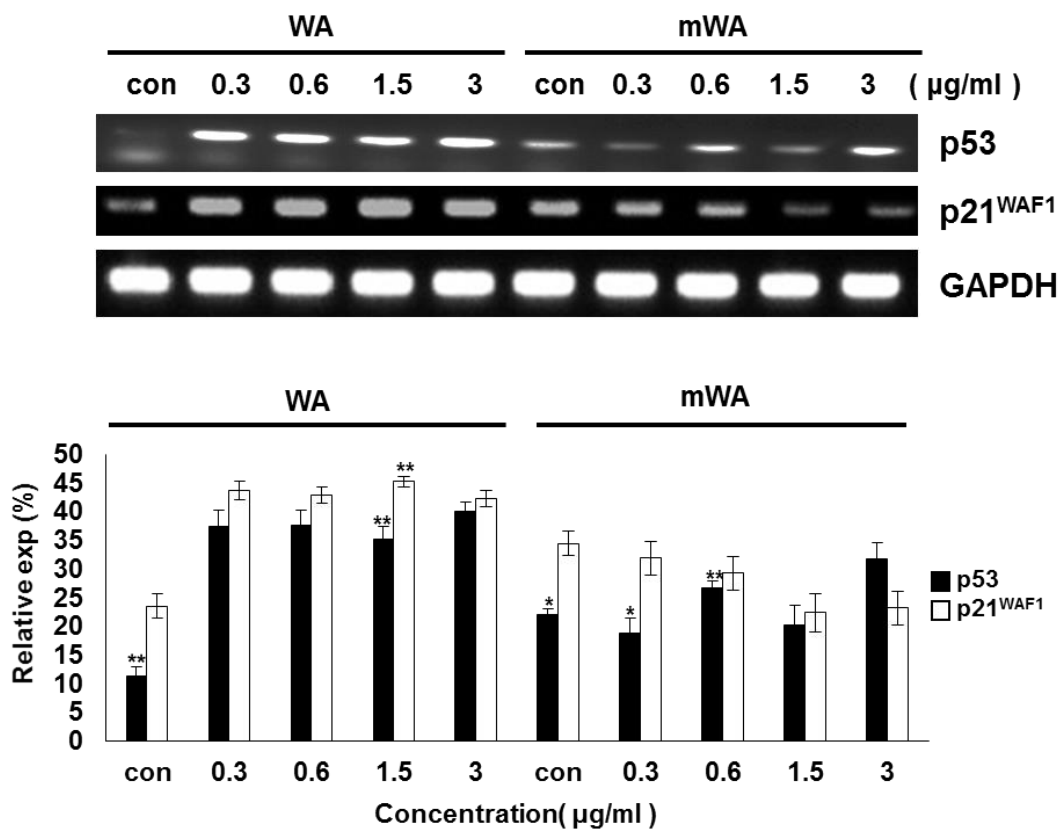


図 3-9 WA と mWA による p53 と p21<sup>WAF1</sup> シグナル伝達通路への影響

(TIG3 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA による処理組において、p53 と p21<sup>WAF1</sup> 遺伝子の mRNA 量が上昇した。mWA の処理組に p53 遺伝子の mRNA 量の発現が有意義変化が見られなかったが、p21<sup>WAF1</sup> 遺伝子の mRNA 量が減少した。

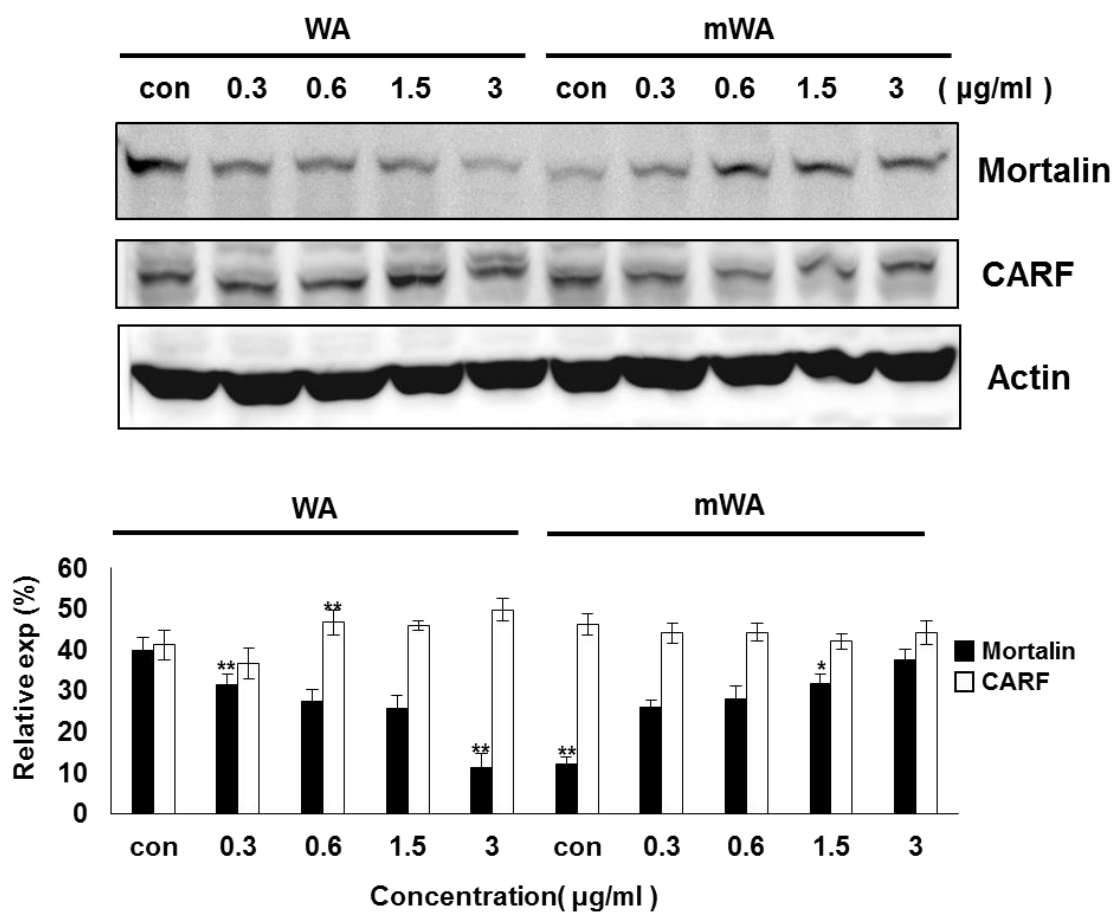


図 3-10 p53 を増加させる要因 - Mortalin、CARF タンパク質作用

(TIG3 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA の処理組、Mortalin タンパク質の量が減っていた。CARF タンパク質量が増加した。mWA の処理組の Mortalin タンパク質の発現量が増加した。CARF タンパク質の発現量が変化が見られなかった。

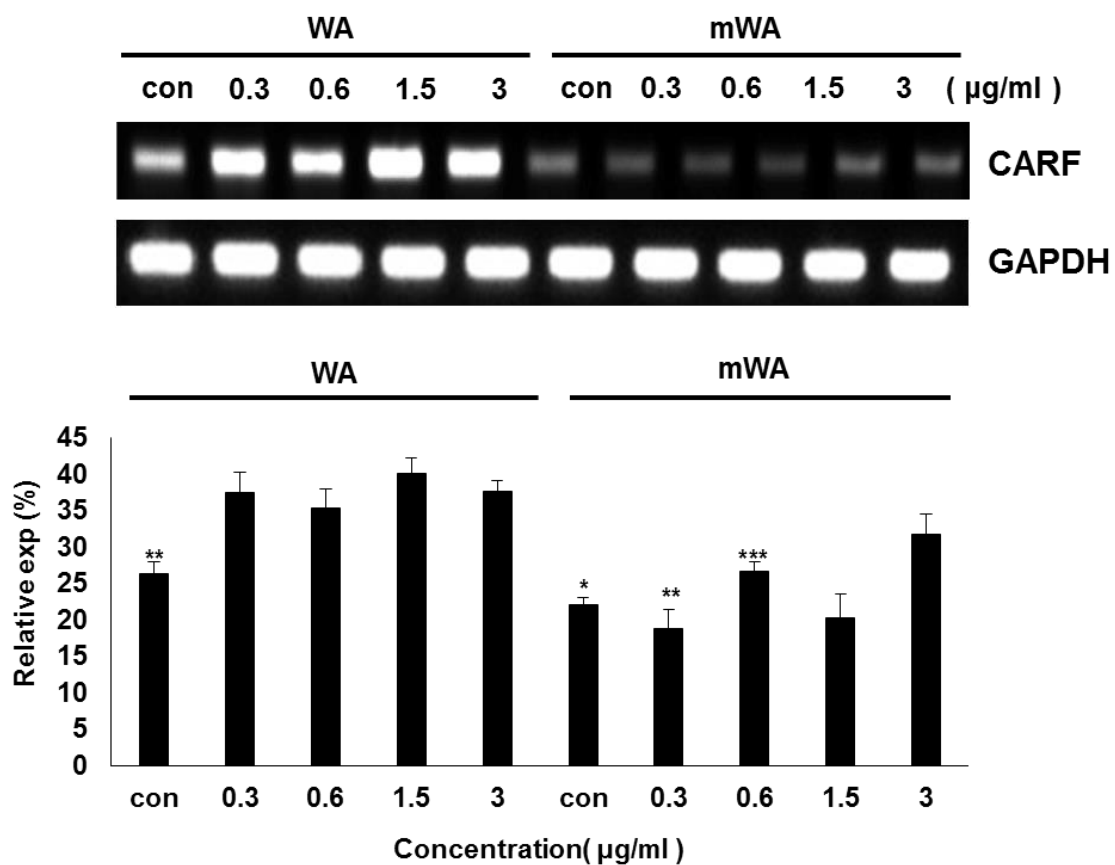


図 3-11 p53 を増加させる要因—CARF タンパク質の作用

(TIG3 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA 処理組に CARF 遺伝子の mRNA 量の増加がみつけたが、mWA の処理組に有意義な結果を得なかった。

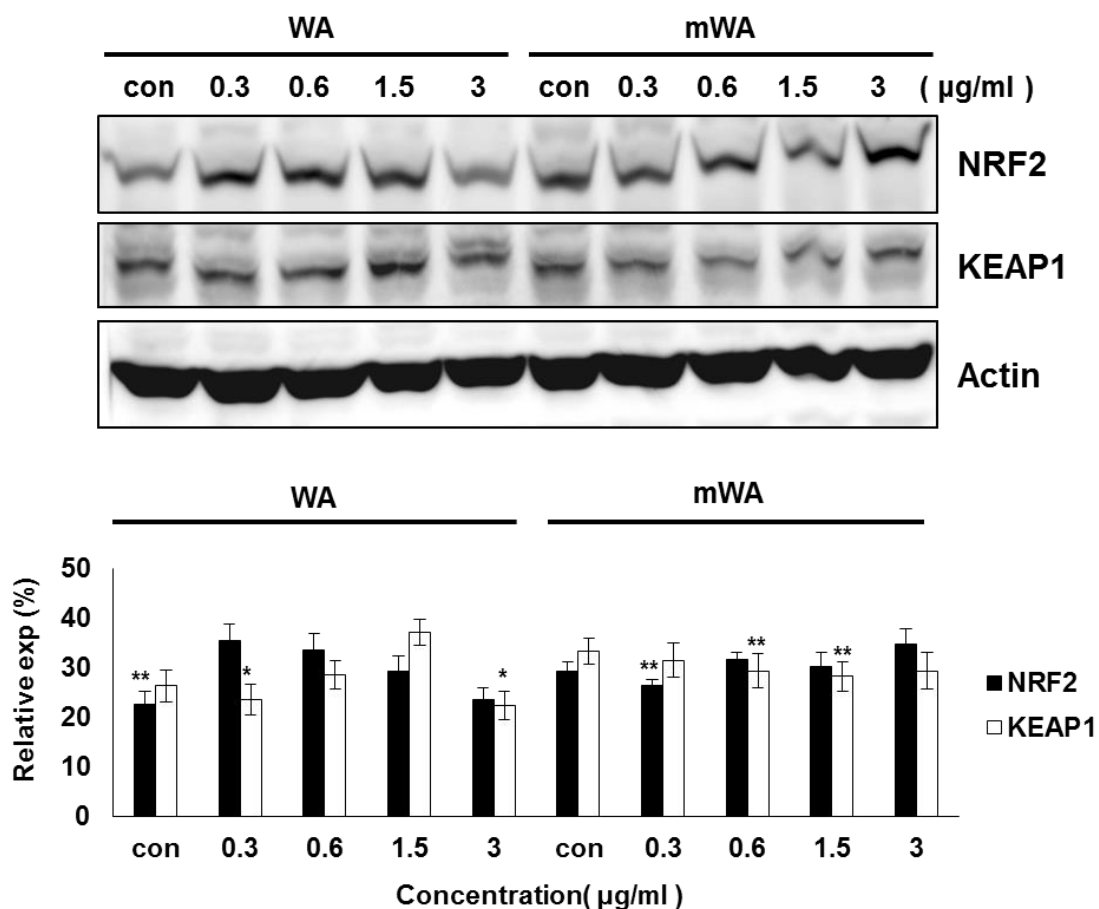


図 3-12 NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化的ストレス応答  
(TIG3 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA 処理組に NRF2 の発現量が減少したことに対し mWA による処理組の NRF2 の発現量が上昇した。WA の処理組 KEAP1 の発現量が上昇を見られたが、mWA の処理組の KEAP1 の発現量が減少した。

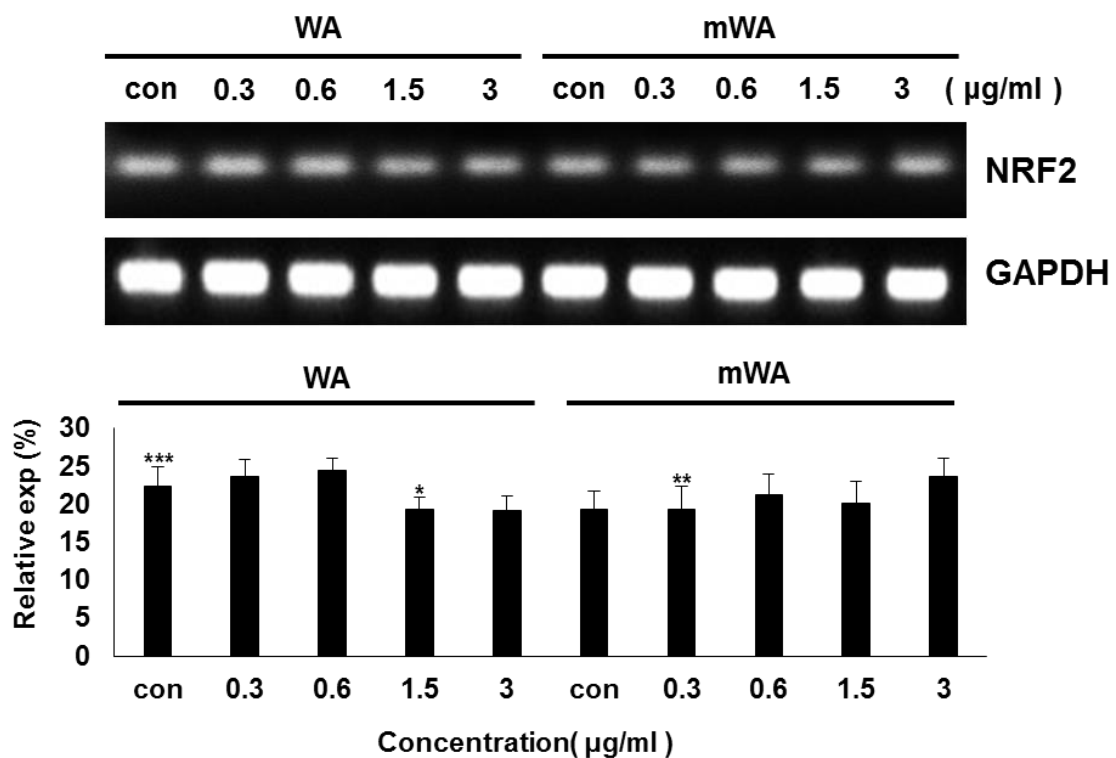


図 3-13 NRF2 シグナル伝達通路による細胞酸化ストレス応答

(TIG3 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。WA の処理組、NRF2 遺伝子の mRNA 量が減少を見られ、mWA の処理組が軽く上昇を見られた。



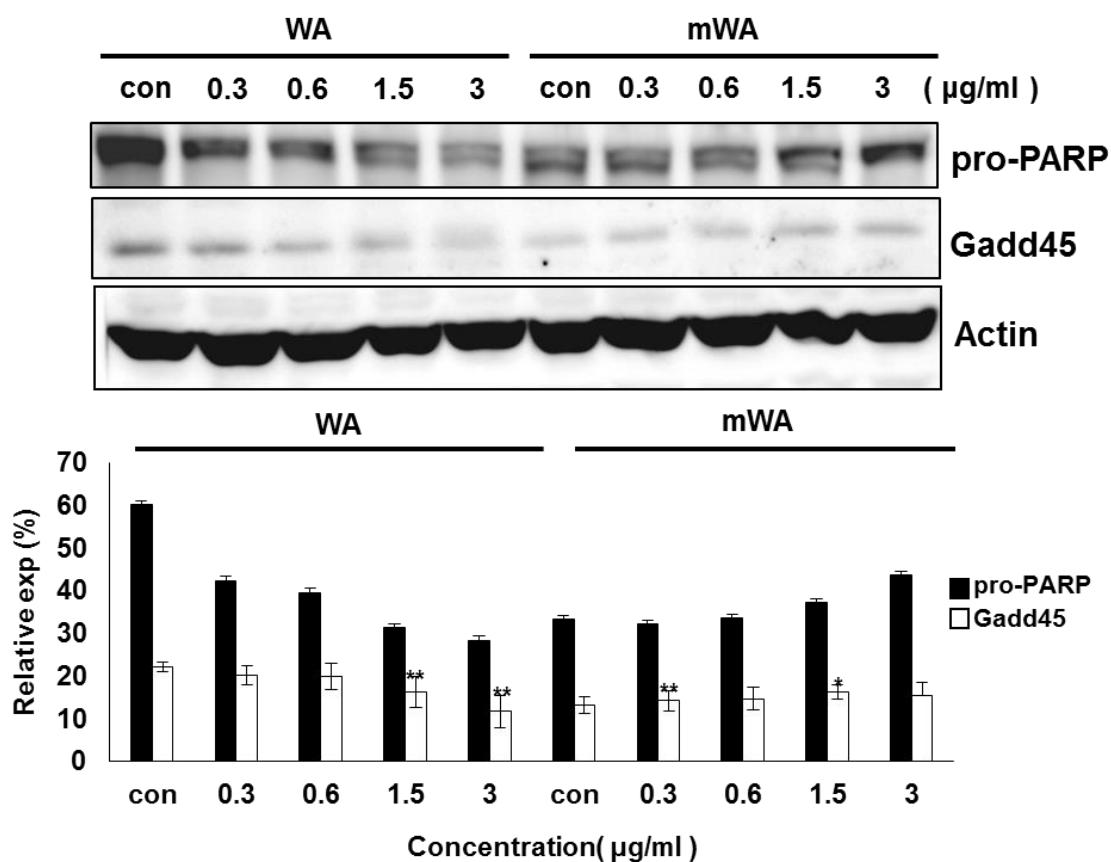


図 3-14 pro-PARP タンパク質の発現による細胞 DNA 障害の影響  
(TIG3 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA の処理組、PARP タンパク質、Gadd45 タンパク質量の発現が減少することが確認した。mWA の処理組に PARP タンパク質の発現が濃度に従って、増加した。

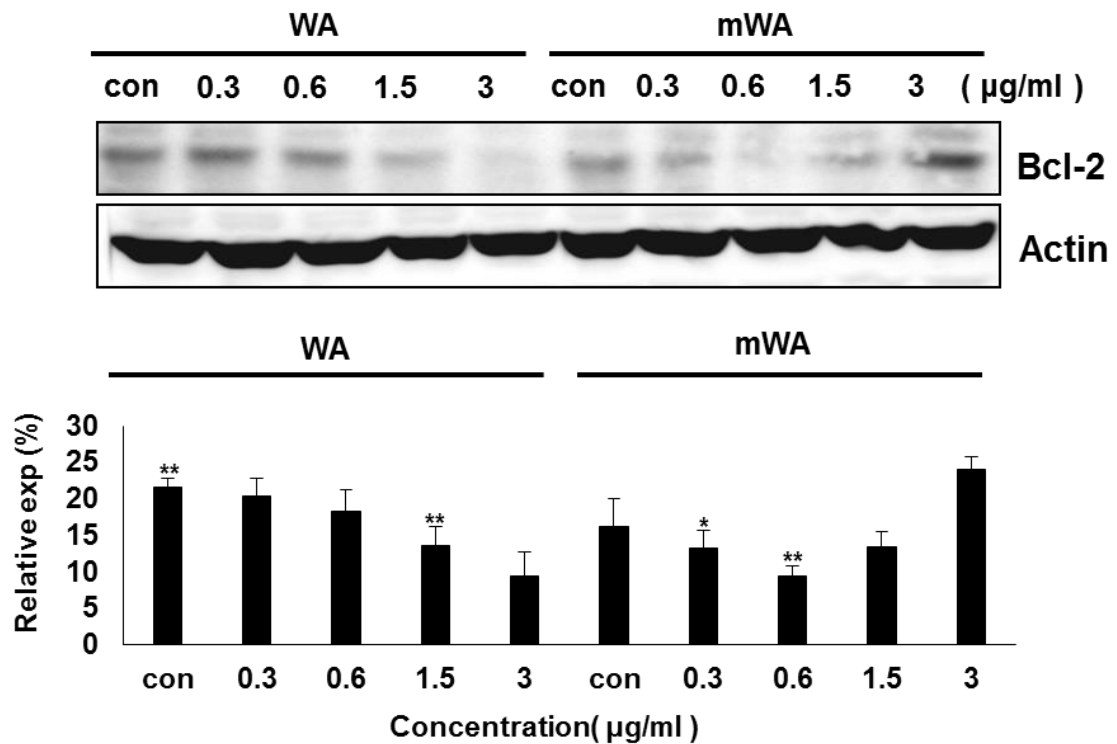


図 3-15 Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

(TIG3 細胞ウエスタンブロット像と定量グラフ)

WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度でウエスタンブロット実験を行った。WA の処理組、Bcl-2 タンパク質の発現量が減少し、mWA の処理組、Bcl-2 タンパク質の発現量が増えることが確認した。

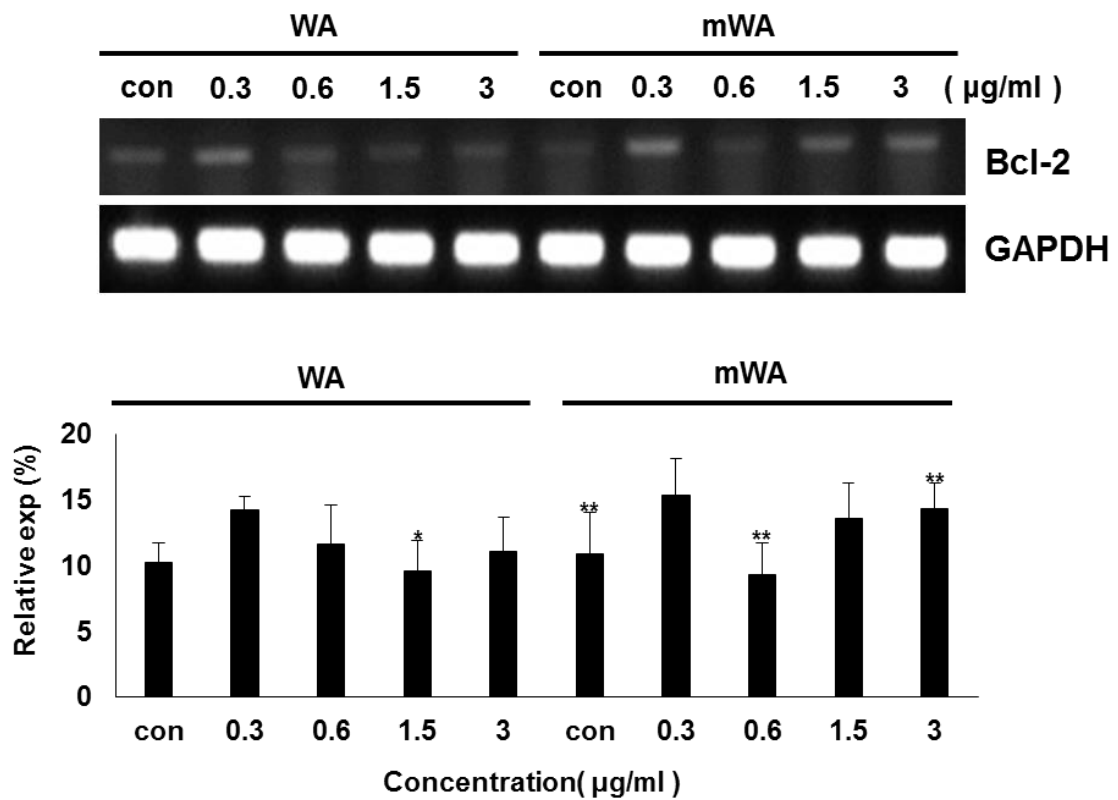
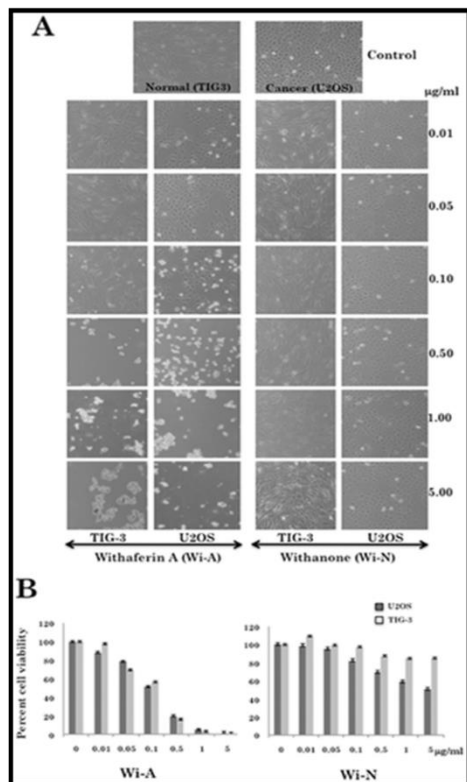


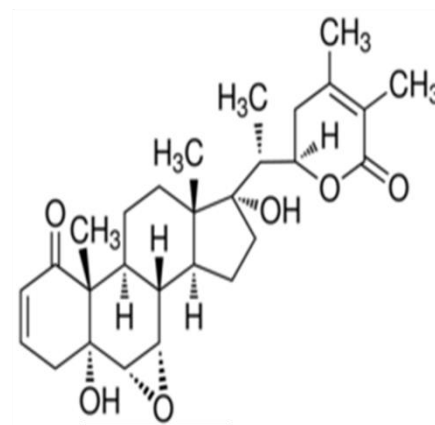
図 3-16 Bcl-2 シグナル伝達通路によるアポトーシスの影響

(TIG3 細胞 RT-PCR 像と定量グラフ)

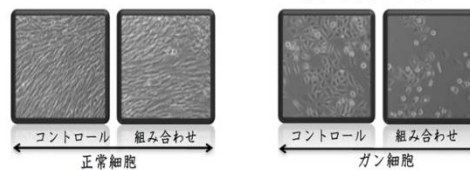
WA と mWA を 0、0.3、0.6、1.5、3.0 μg/ml の濃度で RT-PCR 実験を行った。  
RT-PCR 実験に mWA の処理組の遺伝子 mRNA 量に関しては有意義な結果がなかった。



PLoS ONE 7(9): e44419. doi:10.1371/journal.pone.0044419



Withanone : WithaferinA組み合わせ



(産総研バイオメディカル 研究部門細胞増殖抑制研究グループ)

### 図 3-17 Withanone の作用と研究内容

今までの報告では、同じのアシュワガンダ葉の抽出物から同定された有効成分の Withanone が WA と組み合わせ、がん細胞の増殖阻害する同時に、正常細胞のダメージを緩和する効果があった。

## 第4章 総括

細胞のがん化の過程において様々ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異が生じる。遺伝子の変異が1つではなく、複数は必要と言われている。このように遺伝子変異の積み重ねた結果は細胞が無制限に増殖し、がん細胞になってしまう。この増殖を刺激しているシグナル伝達を止めることががんの治療と予防のもっとも有力な手段だと言える。

この研究はインドの伝統的アーユルヴェーダ医学から来ている薬草のアシュワガンダから精製された活性成分の Withaferin A と Withaferin A のメトキシ化合物 Methoxy Withaferin A を用いて、がん細胞と正常細胞に対する効果を調べた。細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスなど、さまざまなシグナル伝達通路に対する影響を研究した。

ヒトがん細胞細胞 U2OS に対し、細胞分子機構アッセイを通して、以下のことを明確した。1) WA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 を活性化したため、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用があると示唆されたことに対し、MWA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 の影響が少ないため、がん細胞の細胞周期進行への抑制作用が少なかったと考える。2) WA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の発現量を減少させるため、がん細胞の抗酸化ストレス能力を低下させることを示唆されたことに対し、mWA による処理組は酸化ストレス応答因子の NRF2 の影響が少ないため、がん細胞の抗酸化ストレス能力の低下効果が少なかったと考える。3) WA による処理組は DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 の発現量を減少させるため、がん細胞の DNA 障害修復を阻止することを示唆されたことに対し、mWA による処理組は細胞 DNA 障害修復因子 PARP の影響が少なかった、Gadd45 の発現量が増加させたため、がん細胞 DNA 障害修復に促進を示唆された。4) WA による処理組はアポトーシスに促進する因子の Bax の発

現量を増加させ、抑制因子 Bcl-2 の発現量が減少させるため、がん細胞のアポトーシスの促進を示唆されたことに対し、mWA による処理組はアポトーシスに関連する因子の Bax の影響が少なかった、Bcl-2 の発現量が増加させたため、がん細胞のアポトーシスの抑制を示唆された。このように、ヒトがん細胞において、細胞周期進行、酸化的ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることがはじめてわかった。細胞生存アッセイにおいて、MTT アッセイの結果に、WA が  $0.6\sim 1\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲でがん細胞に毒性があることに対し、mWA は、その 10 倍以上高い濃度でがん細胞に毒性があると明確した。コロニー形成アッセイに、WA を投入した組は  $0.3\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、コロニー形成率が 50%以上に低下した。強いがん細胞の増殖障害を確認したことに対し、mWA を投入した組は  $3.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで、細胞のコロニー形成への影響が少なかった。WA を投入した組と比べ、低いがん細胞の増殖障害を確認した。つまり、mWA のがん細胞増殖抑制効果があるが、WA と比べ、かなり弱いものと明らかにした。

ヒト正常細胞 TIG3 に対し、細胞分子機構アッセイを通して、以下のことを明確した。1) WA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 を活性化したため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用があると示唆されたことに対し、mWA による処理組は目標タンパク質 p53 と p21 の影響が少ないため、正常細胞の細胞周期進行への抑制作用が少なかったと考える。2) WA による処理組は酸化的ストレス応答因子の NRF2 の発現量を減少させるため、正常細胞の抗酸化ストレス能力を低下させることを示唆されたことに対し、mWA による処理組は酸化的ストレス応答因子の NRF2 の発現量を増加させるため、正常細胞の抗酸化ストレス能力の増強効果があると示唆された。3) WA による処理組は DNA 障害修復因子の PARP、Gadd45 の発現量を減少させるため、正常細胞の DNA 障害修復を阻止することを

示唆されたことに対し、mWA による処理組は細胞 DNA 障害修復因子 PARP の発現量が増加させたため、正常細胞 DNA 障害修復に促進を示唆された。4) WA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が減少させるため、正常細胞のアポトーシスの促進を示唆されたことに対し、MWA による処理組はアポトーシス抑制因子 Bcl-2 の発現量が増加させたため、正常細胞のアポトーシスの抑制を示唆された。このように、ヒト正常細胞において、細胞周期進行、酸化ストレス応答、DNA 障害修復、アポトーシスの分子機構が既知の Withaferin A の分子機構と異なることがはじめてわかった。細胞生存アッセイにおいて、MTT アッセイの結果に、WA を投入した組は、 $1.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、正常細胞に 50% 以上の致死率を達したことに対し、mWA を投入した組は正常細胞の致死率が  $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度に 20% しか達してなかった、さらに  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$  までの濃度で正常細胞増殖の促進することを明らかにした。コロニー形成アッセイに、WA を投入した組は  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度から、コロニー形成率が 13% 以下になった。強い正常細胞の増殖障害を確認したことに対し、mWA を投入した組はその 10 倍の  $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で、コロニー形成率がほぼ 20% に達した。WA を投入した組と比べ、非常に低い正常細胞の増殖障害を確認した。Withaferin A と比べ、かなり正常細胞にダメージをつけることが弱いと明確した。

また、本研究では Methoxywithaferin A の濃度が  $0.6 \sim 6 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲に、正常細胞の保護作用があることと今回の細胞生存アッセイにより、確認した。今までの報告では、似たようなアシュワガンダ成分の Withanone と一定の割合で WA と併用し、正常細胞への毒性が WA の単独使用の場合より緩和されたことが明らかにした。mWA の正常細胞の保護作用を着目し、WA と併用することによって正常細胞への毒性を低減する効果を十分期待できると言う新しい知見を得た。

## 参考文献

- 1 大西『スタンダード病理学』第3版、pp.139-141
- 2 Geoffrey M.Cooper『クーパー細胞生物学』pp.593-595
- 3 Suresh Awale『天然物から創薬に向けて』
- 4 Widodo, N., Kaur, K., Shrestha, B.G., Takagi, Y., Ishii, T., Wadhwa, R., and Kaul, S.C. 2007. Selective killing of cancer cells by leaf extract of Ashwagandha: identification of a tumor-inhibitory factor and the first molecular insights to its effect. *Clin Cancer Res* ,13, 2298-2306.
- 5 Davis, L., and Kuttan, G. 2000. Effect of Withania somnifera on 20-methylcholanthrene induced fibrosarcoma. *J Exp Clin Cancer Res* ,19, 165-167.
- 6 Bhattacharya, S.K., Bhattacharya, D., Sairam, K., and Ghosal, S. 2002. Effect of Withania somnifera glycowithanolides on a rat model of tardive dyskinesia. *Phytomedicine* ,9, 167-170.
- 7 Das, J.M., and Kurup, P.A. 1964. Mechanism of antibacterial action of antibiotic isolated from leaves of Withania somnifera. I. Reaction between the antibiotic & glutathione. *Indian J Biochem* ,1, 157-158.
- 8 Gupta, S.K., Dua, A., Vohra, B.P. 2003. Withania somnifera (Ashwagandha) attenuates antioxidant defense in aged spinal cord and inhibits copper induced lipid peroxidation and protein oxidative modifications. *Drug Metabol Drug Interact* ,19, 211-222.



- 9 Hahm, E. R., Michelle, B. M., Kelley, E. E., Houten B. V., Shiva, S., and S.V, S. 2011. Withaferin A-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells Is Mediated by Reactive Oxygen Species. *Plos One* ,6, e23354.
10. Panda S, Kar A. 1998. Changes in thyroid hormone concentrations after administration of ashwagandha root extract to adult male mice. *J Pharm Pharmacol*, 50, 1065-1068
11. Owais M, Sharad KS, Shehbaz A, Saleemuddin M. 2005. Antibacterial efficacy of *Withania somnifera* (ashwagandha) an indigenous medicinal plant against experimental murine salmonellosis. *Phytomedicine*, 12, 229-235
12. Rasool M, Varalakshmi P. 2006. Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: an in vivo and in vitro study. *Vascul Pharmacol*, 44, 406-410
13. Devi PU, Sharada AC, Solomon FE. 1993. Antitumor and radiosensitizing effects of *Withania somnifera* (ashwagandha) on a transplantable mouse tumor, Sarcoma-180. *Indian J Exp Biol*, 31, 607-611
14. Widodo N, Kaur K, Shrestha BG, et al. 2007. Selective killing of cancer cells by leaf extract of ashwagandha: identification of a tumor-inhibitory factor and the first molecular insights to its effect. *Clin Cancer Res*, 13, 2298-2306
15. Shohat B, Joshua H. 1971. Effect of withaferin A on Ehrlich ascites tumor cells. II. Target tumor cell destruction in vivo by immune activation. *Int J Cancer*, 8, 487-496
16. Devi PU, Kamath R, Rao BS. 2000. Radiosensitization of a mouse melanoma by withaferin A: in vivo studies. *Indian J Exp Biol*, 38, 432-437

- 17 Kastan MB1, Canman CE, Leonard CJ. 1995. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 14, 3-15.
- 18 Mendoza-Rodríguez CA1, Cerbón MA. 2001. Tumor suppressor gene p53: mechanisms of action in cell proliferation and death. *Rev Invest Clin*, 53, 266-73.
- 19 S. C. Kaul, C. C. Deocaris, R. Wadhwa. 2007. Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer *Exp. Gerontol*, 42, 263-274
- 20 R Wadhwa et al. 2006. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *Int J Cancer*, 118, 2973-80
- 21 Singh R, Kalra RS, Hasan K, Kaul Z, Cheung CT, Huschtscha L, Reddel RR, Kaul SC, Wadhwa R. 2014. Molecular characterization of collaborator of ARF (CARF) as a DNA damage response and cell cycle checkpoint regulatory protein. *Exp Cell Res*, 322, 324-34.
- 22 Parikh RA, White JS, Huang X, et al. 2007. Loss of distal 11q is associated with DNA repair deficiency and reduced sensitivity to ionizing radiation in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 46 ,761-775.
- 23 Lu J, Wei Q, Bondy ML, et al. 2008. Genetic variants in the H2AFX promoter region are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women aged. *Breast Cancer Res Treat*, 110, 357-366.
- 24 Hanna AN, Sim AB, Chua PP, Chong MT, Tron VA. 2002. GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure. *Maeda T1, J Invest Dermatol*, 119, 22-6.

- 25 Mariusz Karbowski, Kristi L. Norris, Megan M. Cleland, Seon-Yong Jeong & Richard J. Youle. 2006. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature*, 443, 658-662
- 26 Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M. 1998. Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21<sup>WAF1</sup> and IAP gene family ILP. *Oncogene*, 17, 931-939
- 27 Brenner D, Mak TW. 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 871-7.
- 28 Han H, Silverman JF, Santucci TS, et al. 2001. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Annals of Surgical Oncology*, 72, 72-79.
- 29 Ghada Allan, Halima Ouadid-Ahidouch, Elena M. Sanchez-Fernandez, Rocío Rísquez-Cuadro, José M. Garcia Fernandez, Carmen Ortiz-Mellet, Ahmed Ahidouch. 2013. New Castanospermine Glycoside Analogues Inhibit Breast Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis without Affecting Normal Cells. *PLoS One*, 8, e76411.
- 30 Jose T. Thaiparambil, Laura Bender, Thota Ganesh, Erik Kline, Pritty Patel, Yuan Liu, Mourad Tighiouart, Paula M. Vertino, R. Donald Harvey, Anapatricia Garcia and Adam I. Marcus. 2011. Withaferin A inhibits breast cancer invasion and metastasis at sub-cytotoxic doses by inducing vimentin disassembly and serine 56 phosphorylation. *International Journal of Cancer*, 11, 2744-2755.

31 Melba C. Jaramillo, Donna D. Zhang. 2013. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev*, 27, 2179-2191.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切丁寧なご指導を賜りました筑波大学生物系教授張振亜先生に謝意を表します。終始温かい励ましを賜りました准教授内海真生先生、准教授楊英男先生に感謝申し上げます。産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門細胞増殖制御研究グループグループ長ワダワ レヌー博士、カウル スニル博士に感謝申し上げます。最後に、張研究室卒研究生の皆さん、産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門細胞増殖制御研究グループの皆さんと支えてくれた家族、友人に感謝します。