# 学位論文 博士 (理学)

牡丹皮に由来する細胞増殖抑制物質の探索および作用機序の検討

# 2019 年度 慶應義塾大学大学院理工学研究科 黄 穎

### 主論 文題名:

牡丹皮に由来する細胞増殖抑制物質の探索および作用機序の検討

#### 要旨

生物の二次代謝産物は、昔から医薬品として重宝されてきた。特に、植物から多くの抗がん物質が発見され、抗がん剤として開発され臨床へ応用された。しかし、現行の抗がん剤は細胞毒性が強いため、がん細胞だけではなく正常細胞も殺すので、患者にとって重篤な副作用を引き起こす。著者は、漢方生薬から、細胞毒性の少ない細胞増殖抑制物質の探索研究を進めてきた。

本論の第一章では、漢方生薬における活性物質のスクリーニングおよび Paeoniflorigenone(以下 PFG)の単離と構造決定について述べる。がん細胞を用いたスクリーニング系を構築し、90種の薬用植物について検討した結果、19種の粗抽出物にやや強い細胞増殖抑制活性を確認した。19種の生薬の粗抽出物を用いて細胞毒性を測定して、細胞毒性  $IC_{50}$  と細胞増殖抑制  $IC_{50}$  の比を指標に活性を評価した結果、牡丹皮の抽出物が最も強い活性を示した。そして、牡丹皮の抽出物からボタン科植物特有成分である PFG を活性物質として単離・同定できた。

本論の第二章では、PFG の抗腫瘍活性評価について述べる。3 種類のがん細胞と2 種類の正常 細胞を用いて PFG の増殖抑制活性を評価した結果、PFG は全ての細胞株に対して細胞増殖抑制活性を示した。また、がん細胞のみに対して、カスパーゼ3 依存的なアポトーシスを誘導した。 さらに、ヒトがん細胞パネルスクリーニングの結果により有効濃度はやや高いが、特定のがん種またはいくつのがん細胞株に対し顕著な有効性が見られた。また、PFG は低酸素誘導因子 HIF を誘導した。COMPARE プログラムにより、PFG の Finger Print をデータベース中の既存の抗がん剤全てと比較した結果、似た Finger Print のものがないため、PFG が新規作用機序を持つことが示唆された。次に、PFG の構造活性相関を調べた結果、ケージ構造を崩れると抗腫瘍活性が失うことと、ケトン基が還元されると活性が大幅に減少することが明らかになった。

本論の第三章では、PFG の細胞増殖抑制機序について述べる。正常細胞とがん細胞において、PFG 処理による細胞形態の肥大扁平化を糸口として、細胞周期停止、細胞老化誘導、DNA 二本鎖切断効果および活性酸素産生などの活性を評価した。その結果、1. PFG は正常細胞が早期老化を誘導することで細胞増殖を抑制すること。2. PFG はがん細胞の細胞分裂を阻害することでアポトーシスを誘導すること。3. PFG は細胞 DNA 損傷を引き起こしたが、その原因は PFG による活性酸素の過剰産生ではないこと。4. PFG は活性酸素消去能を持つことが判明した。これらの結果から、PFG の細胞増殖抑制メカニズムについて仮説を立てた。

本研究で得られた知見は、PFG は新規の抗腫瘍作用機序を持つニューリードであることを示唆した。将来、がん細胞分裂阻害機構および正常細胞早期老化機構の解明の重要な基盤になるものと期待される。

## Thesis Abstract

Registration	■ "KOU"	□ "OTSU"	Name	Ying Huang
Number	No.	*Office use only		

Thesis Title

Investigation of antiproliferative compound Paeoniflorigenone from moutan cortex and its mechanism

#### Thesis Summary

Natural products and natural product derived compounds are an important source of several clinically useful anti-cancer agents. In this study, a method to screen for antiproliferative compound with low cytotoxicity was constructed. Ninety samples from the extracts of plants from traditional Chinese medicines were screened for antitumor activity. Paeoniflorigenone (PFG) was isolated as an active ingredient from the root of moutan cortex, which showed the strongest activity. In addition, our data indicated that PFG was cytotoxic and induced apoptosis selectively in the cancer cell lines. These effects were cancelled by the addition of caspase inhibitor Z-VAD-FMK, suggesting that it was mediated by caspase-3 activation. The antiproliferative effects of PFG were evaluated against a disease-oriented panel composed of 39 human cancer cell lines at the Japanese Foundation for Cancer Research, the results suggested that PFG exhibited differential antiproliferative effects compared with already-known anti-tumor agents.

To investigate how PFG induced cancer-selective apoptosis and how PFG inhibited proliferation of normal cells, we used normal TIG-1 cells and cancerous HeLa cells for further study. According to morphology changes (hypertrophy and flattening), we hypothesized that PFG can induce senescence or inhibit cell mitosis. Here we show that PFG can induce cellular senescence, evidenced by the expression of senescence-associated β-galactosidase, G0/G1 and G2/M cell cycle arrest, detection of senescence-associated heterochromatin foci and permanent loss of proliferative ability, in normal TIG-1 diploid fibroblast but not cancerous HeLa cells. In cancerous HeLa cells, PFG inhibited proliferation by inducing S and G2/M cell cycle arrest and mitosis inhibition. DNA damage response was activated by PFG, interestingly the reactive oxygen species level was suppressed instead of escalated.

To sum up, we found PFG as differential antiproliferative compound, as well as 3 new roles of PFG as, 1. inducer of premature senescence in normal TIG-1 cells, 2. inhibitor of mitosis in cancerous HeLa cells, 3. ROS scavenger.