

原著

ヒト血液細胞株に対する細胞特異的なミルクフルーツ種子抽出物の 細胞死誘導についての検討

日下 雅友¹⁾・一原 直人¹⁾・秋山 秀彦²⁾・天川 雅夫¹⁾・Try Pros³⁾・加藤 亮二¹⁾

- 1) 純真学園大学 保健医療学部 検査科学科
- 2) 藤田保健衛生大学 医療科学部 臨床検査学科
- 3) プノンペン市保健局 救急部 カンボジア

Effect of cell-specific cell death induction using extract of *Chrysophyllum cainito* seeds against human hematological cell line include hematological tumor.

Masatomo KUSAKA¹⁾, Naoto ICHIHARA¹⁾, Hidehiko AKIYAMA²⁾,
Masao AMAKAWA¹⁾, Try PROS³⁾, Ryoji KATO¹⁾

- 1) Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Junshin gakuen University.
- 2) Faculty of Medical Technology, School of Health Science, Fujita Health University.
- 3) Department of Emergency Medicine, Phnom Penh Municipal Health Department.

要旨: 白血病は、血液中の血球が腫瘍化する血液の癌であり、急性白血病と慢性白血病に大別される。現在では化学療法や造血幹細胞移植により完治することが可能となりつつあるが、他の固形癌と同様に化学療法は患者への負担が非常に大きい治療法となっている。そこで我々は、抗がん剤について検討するに当たり *Chrysophyllum cainito* (現地呼称：ミルクフルーツ) の種子が強い細胞溶解作用を持つことを以前に行った実験より見出し、この種子からの抽出液は白血病細胞株を死滅させることを明らかにした。また、この作用がどのような機序で起こるのかを知るために *Chrysophyllum cainito* 種子による細胞死がアポトーシスにより引き起こされているかを検討した。急性前骨髄球性白血病株である HL60 と急性単球性白血病細胞株である U937 をアポトーシスマーカーである Annexin V と生細胞には取り込まれず死細胞のみを染色する Propidium Iodide (PI) で染色し、その蛍光強度を Flow cytometer を用いて比較検討した。その結果、細胞はアポトーシスにより細胞死を引き起こした一方で、ネクローシスによる細胞死は起きていないことが示唆された。また、この作用には HL60 と U937 細胞株において作用が異なることからミルクフルーツ種子抽出物は細胞種毎に作用が異なっており、これらのことは、ミルクフルーツ種子抽出物が細胞死を誘導する際に細胞の選択を行っている可能性も示唆される結果となった。

キーワード: アポトーシス 天然成分 細胞溶解作用 白血病 血液成分

Abstract: Leukemia, blood cell change to tumorigenic hematological cells that is divided into acute leukemia and chronic leukemia. It is possible that leukemia is cured using chemotherapy, hematopoietic stem cell transplantation, etc. Concurrently, the patient burdens was increased by chemotherapy for tumors include leukemia and other solid cancer. We revealed that the seed of *Chrysophyllum cainito* (Common name: Milk fruit) has a strong hemolytic action and extracts from the seeds induce cell death for leukemic cell line. Here, we measured fluorescent intensity in order to examine whether seeds of *C. cainito* induce apoptosis. Fluorescent intensity were compared by FITC conjugated AnnexinV for late apoptotic maker and Propidium Iodide for count of death cells using a flow cytometry in a human acute promyelocytic leukemia cell line, HL60 and human acute monocytic leukemia cell line, U937. As a result, the cells were induced cell death by apoptosis. Meanwhile, we could not observed necrosis in each cell line. The result shown that the effect by seeds of *C. cainito* are different in each cell line. Therefore it become the result that extract of *C. cainito* seeds select against cell type in inducing cell death.

Keyword: Apoptosis Natural ingredient Cell Lytic Leukemia blood component

1. 緒言

これまでに行われた疫学調査において、植物の疾病予防への効果が報告されている。我々の研究においても果実種子に含まれる天然成分を用いた健康食品開発を通して、血糖値増加抑制に効果が認められる可能性のある果実を同定した¹⁾。

Chrysophyllum cainito (現地名: ミルクフルーツ (MF)) は、中央アメリカや西インド諸島などの熱帯低地を原産とするアカテツ科カニニト属の常緑中高木である。カンボジアやベトナムなど東南アジアでも広く栽培されており、果実は食用に共されている。また、その葉には、血糖値上昇抑制作用があることがわかっている。さらに、このミルクフルーツが赤血球に対しては高度な細胞溶解作用を示すのに対し、正常な単核球には作用を示しにくく、急性前骨髄球性白血病株である HL60 細胞株を優先的に死滅することができることを報告した²⁾。種子や果実抽出物によるこのような細胞溶解作用は、含有するサポニンなどの界面活性剤等の影響により細胞膜が高度に破壊され、速やかにネクロシスがおきることが報告されている³⁾。したがって、このミルクフルーツは、赤血球を速やかに細胞溶解させることから、血球細胞膜に作用し、ネクロシスを誘導して赤血球の破壊をする物質が含まれていると考えられた。しかし、今回の報告では、HL60 および、急性単球性白血病細胞株である U937 を用いて、ミルクフルーツ種子と対照のグレープフルーツ種子抽出物の細胞溶解能力に関し大きく作用過程が異なったことから、Flow cytometry (FCM) を用いて、これらの作用がアポトーシスあるいはネクロシスによる作用であるのかを比較検討した。

2. 材料

細胞株は、藤田保健衛生大学から供与された急性前骨髄球性白血病株由来の HL60、急性単球性白血病細胞株 U937 を用いた。ミルクフルーツ種子は、カンボジア カンダール州産の種子 (約 1kg) を空輸により検疫後入手して使用した。グレープフルーツは、国内の販売店より購入して使用した。

3. 方法

3.1 果実種子成分の抽出

ミルクフルーツおよび、グレープフルーツ種子は、乳鉢で破碎後、メタノールに浸漬して抽出を行った。抽出溶液には、果実の残渣が含まれるが、以下の試験には、2,700 x g、5分で遠心した後の上澄みを使用した。

3.2 蛋白質濃度測定

抽出された果実種子成分の蛋白質濃度は、BCA protein assay kit (Pieace 社) を用いて、96-well dish を用いて、常法に従い測定した。吸光度の測定は、マイクロプレートリーダー (Biorad 社) を用いて 572nm で吸光度測定を行った。抽出されたメタノールは、蛋白量測定時に、全量 200 μ L に対し、10 μ L の抽出液を加えており、メタノールの最終濃度 5% で測定を行っている。この濃度は、BCA 法におけるメタノール許容限界 10% 以下となっている。

3.3 細胞培養

HL60 および U937 細胞は、T-75 フラスコ (Grainer 社) を用いて、RPMI1640 培養液 (WAKO 社) にて継代した。培養は、37°C、CO₂ 濃度 5%、湿度 100% に調整された環境下において継代培養を行った。MTS アッセイに用いた細胞は、測定 2 日前に 96-well dish (IWAKI 社) に 1.0x10⁴ cells/well で播種し上記条件下で培養した後、種子抽出物添加 12 時間後に 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] (MTS) アッセイを行った。FCM の解析では、T-75 フラスコにてコンフルエントまで培養した後、種子抽出物を添加後 12 時間で回収し計測に用いた。

3.4 細胞の生存率測定

細胞の生存率の計測には、CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega 社) を用いて測定を行った。方法は、前述の細胞に定法に従って、ミトコンドリアの呼吸活性による MTS 還元反応を行い、マイクロプレートリーダー (Biorad 社) を用いて 490nm で吸光度測定を行った。細胞は、HL60、U937 すべての細胞において、ミ

ルクフルーツおよびグレープフルーツ抽出液は、測定された総タンパクの濃度より、20, 2, 0.2, 0.02 μg を各 well に添加し、4回同一の測定を行った。ポジティブコントロールは、PBS を抽出液の代わりに添加した。ネガティブコントロールは、反応終了時に TritonX-100 溶液（終濃度1%）にて細胞を死滅させた。

3.5 生死細胞数の測定

アポトーシスによる生死細胞数の確認には MEBCYTO Apoptosis Kit (MBL 社) を用いて測定を行った。

まず、シャーレ内の各細胞を15ml のチューブに移した後、500 x g, 5分間、4°C で遠心し、PBS で3回洗浄した。次に $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6/\text{ml}$ になるように1x Binding Buffer (BB) を加え、さらに1 μL の FITC-Annexin V と2.5 μl の Propidium Iodide (PI) を加え、室温、暗所で15分間反応させた。反応後、200 μL の BB を加えて細胞を浮遊させ、セルソーター SH800 (Sony) を用いてアポトーシスの測定を行った。使用した細胞は前述のよう

に調整し、機器の標準マニュアルにしたがって測定を行った。

4. 結果

4.1 ミルクフルーツ種子抽出物添加による細胞の生存率の検討

ミルクフルーツおよびグレープフルーツの細胞溶解作用を確認するため、それぞれの果実種子抽出液20, 2, 0.2, 0.02 μg を、HL60およびU937細胞株が入った96-well dish に添加し、細胞の生存率を MTS アッセイ法によるミトコンドリアの呼吸活性の測定によりそれぞれの果実種子抽出物の濃度を決定した。その結果、すべての細胞株において2~20 μg の濃度において生存率の急激な低下を確認した (data not shown)。このことにより、以後の実験では、10 μg を添加し細胞死を計測した。また、この濃度は、以前の研究においてヒト急性Tリンパ芽球性白血病細胞株 Jurkat の細胞死が確認された濃度でもある。一方で、細胞溶解作用が見られないグレープフルーツ果実種子抽出物をネガティブコントロールとしてミルクフルーツと同

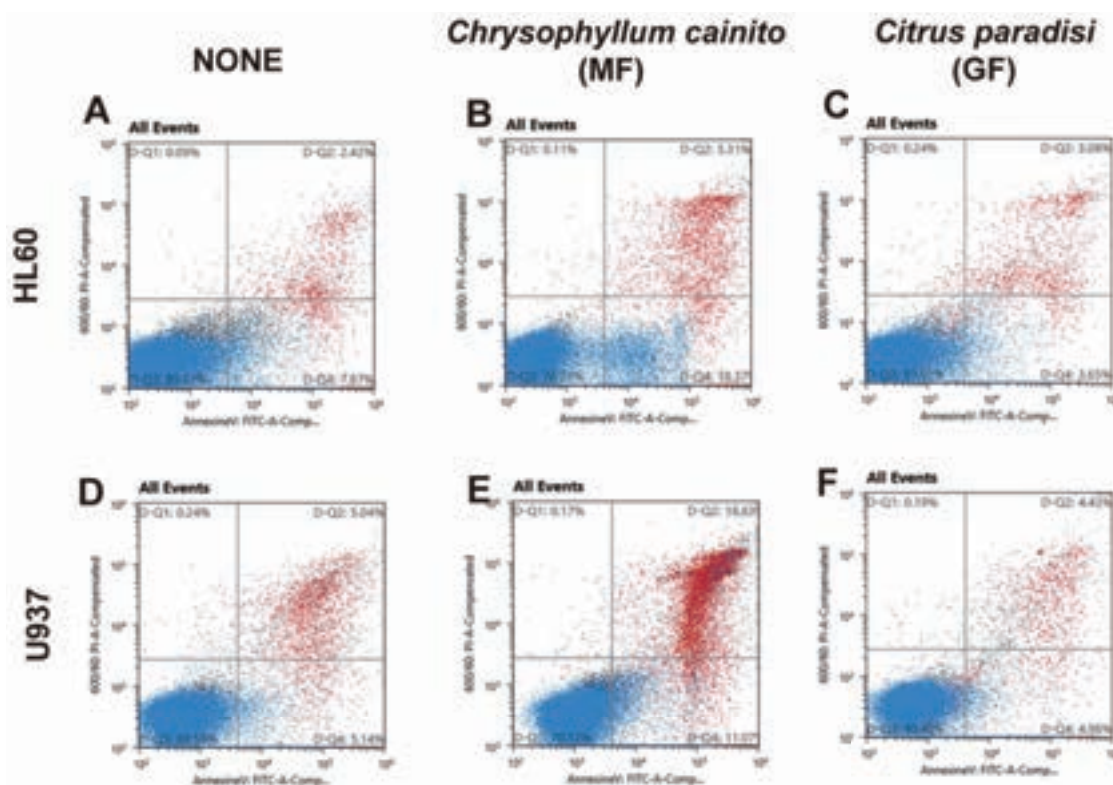


Figure 1 The x-axis shows the intensity of green fluorescence stemming from Annexin V binding to cell membrane. The y-axis indicates the intensity of the red fluorescence being released from PI. The measurements were performed in duplicate.

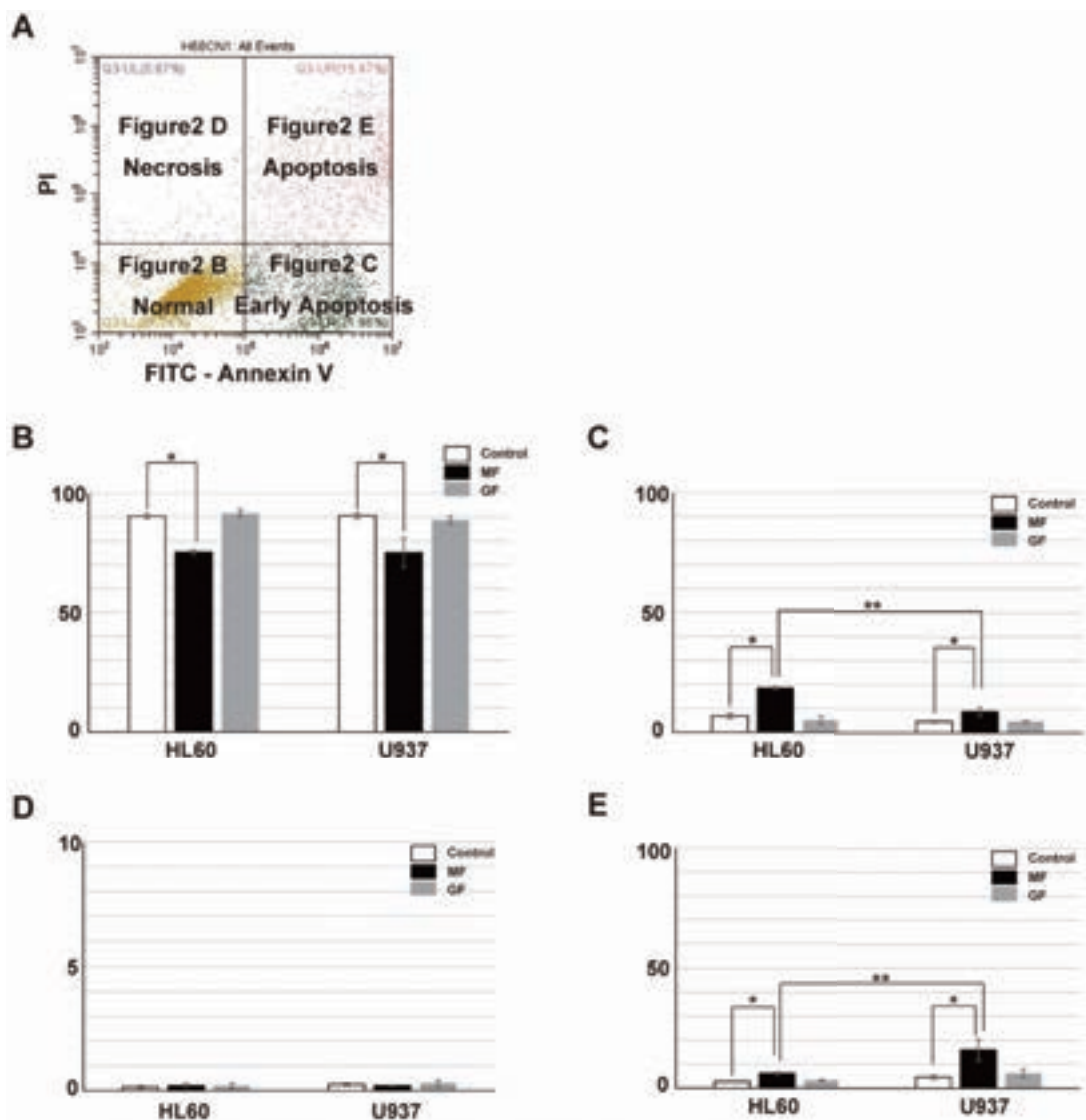


Figure 2 (A) Schema for figure 2. Plot areas were divided into four-phase.; Lower Left indicate normal cells in Figure 2B. Lower right indicate early apoptosis in Figure 2 C. Upper Left indicate that cells were induced necrosis in Figure 2D. Upper right indicate that cells were late-stage apoptosis in Figure 2 E. (B) (C) (D) (E) HL60 and U937 were stained PI and FITC-annexin V. Cells were counted by fluorescent intensity of PI or FITC using FCM in each cell lines. The number of sample in this study is as follows: Control is measured 4samples. MF is measured 4samples. GF is measured 4samples. Values are expressed as the means \pm * <0.01 , ** <0.01 .

量を添加し、MTS アッセイによる生存率を比較した。その結果、グレープフルーツ種子抽出物の場合には、 $20 \mu\text{g}$ においても細胞死の誘導は確認されず、ミルクフルーツだけに細胞死の誘導作用が確認された。

4.2 ミルクフルーツ種子抽出物による細胞死誘導についての検討

次に、各細胞にミルクフルーツ種子抽出物を作作用させ、誘導される細胞死がアポトーシスあるいはネクローシスによる作用なのかを明らかにする

ために Flow Cytometer を用いて細胞死を比較した。作用物質は、MTS アッセイに用いたミルクフルーツおよびグレープフルーツ果実種子抽出液を用い、コントロールとして PBS を同量添加した。FITC-Annexin V および PI の蛍光強度は FCM によって測定を行った (Figure1)。

その結果、コントロールでは、わずかに細胞死は誘導されるものの、多くは生存した状態であった (Figure 1A, 1D ; Figure2B ; Table1)。一方で、MTS アッセイの結果と同様に、ミルクフルーツ

Table 1

Cell line	PI	Annexin V	%Cell number in each phase			p-value Con. VS MF	p-value HL60 VS U937
			Control	MF	GF		
HL60	-	-	90.35±1.09	75.31±0.93	91.63±1.48	0.00000076 *	
	-	+	6.75±1.12	18.41±0.42	4.98±1.71	0.00000121 *	
	+	-	0.14±0.06	0.21±0.10	0.19±0.11	0.27080567	
	+	+	2.76±0.32	6.08±0.62	3.21±0.34	0.00007681 *	
U937	-	-	90.51±1.23	75.11±6.17	88.78±1.71	0.00272579 *	0.95038007
	-	+	4.66±0.37	8.81±1.96	4.69±0.31	0.00598976 *	0.00007419**
	+	-	0.26±0.05	0.21±0.03	0.30±0.12	0.14973734	1.00000000
	+	+	4.58±0.91	15.89±4.34	6.24±1.71	0.00223450 *	0.00423051 **

Values are expressed as the means ±SD.

* p<0.01, **p<0.01

果実種子抽出液を添加した各細胞においてPI陽性の細胞死を誘導された細胞の増加が認められた (Figure 1B, 1E). 今回の実験で行った作用12時間において, HL60, U937各細胞株においては, PI陽性・AnnexinV陽性細胞がほとんどを占めており, 12時間でアポトーシスが誘導されていることが観察された.

グレープフルーツ果実種子抽出液を添加した細胞は, HL60, U937共にミルクフルーツ果実種子抽出液を添加した群のような細胞死の誘導は認められず, ほとんどの細胞がコントロールと同様の結果であった (Figure 1C, 1F).

次に, Figure 2A に示す分画により, 生存細胞 (Figure 2B), 初期アポトーシス (Figure 2C), 後期アポトーシス (Figure 2E), ネクローシス (Figure 2D) の4つのステージに分類し, それぞれの分画に存在する細胞の割合を計測した (Table 1). その結果, 生存細胞の分画では (Figure 2A), HL60およびU937各細胞株で有意に細胞数が低下しており, 細胞死が誘導されて生存細胞が減少していた.

アポトーシスの程度については, PI陽性, Annexin V陽性の後期アポトーシス細胞 (Figure 2E) が, HL60およびU937各細胞株において有意に上昇しておりアポトーシスが誘導されていることが確認された. 一方で, FITC-Annexin V陽性, PI陽性のアポトーシスを起こしている細胞がHL60細胞株において有意に増加しているにもかかわらず, U937では増加が認められなかった (Figure 2C). また, HL60およびU937細胞株

でネクローシスを起こした細胞の増加は有意には観察されず (Figure 2D), アポトーシスをおこしていることが示唆された.

5. 考察

今回われわれが行った実験により, ミルクフルーツ果実種子抽出液が白血病細胞株であるHL60, U937の各細胞株においてアポトーシスによる細胞死が誘導されることが示唆された. このことは, ミルクフルーツが, 複数の血液由来細胞株に細胞死を誘導する可能性を示している.

白血病は, 血液中の血球が腫瘍化する血液の癌である. この白血病には, 急性白血病と慢性白血病に大別され, それぞれ症状や治療がまったく異なっている⁴⁾. 治療法が確立される以前の白血病は不治の病としての代表例だったが, 現在は化学療法や造血幹細胞移植の進歩により完治することさえ可能となりつつある. しかし, 他の固形癌と同様に化学療法は患者への負担が非常に大きい治療法となっている. 特に, 悪性骨髄性白血病はその進行程度によりM0からM7まで分類され, その種類によって治療法が異なる.

白血病の化学療法には, 症状に合わせて分子標的薬が用いられることが多い. 急性前骨髄球性白血病では, トレチノイン (AtRA: All-trans Retinoic Acid) が非常に有効であり, 他のシタラビンやアントラサイクリン系薬剤などが併用されている⁵⁾. また, 慢性骨髄性白血病においては, イマニチブがその治療に大きな変化をもたらしたといわれている⁶⁾. しかし, これらの分子標的薬は完全に白

血病細胞を死滅させるわけではなく、病気の進行を抑えることにより慢性期の状態を維持するために使用されたりしている。このような状況において、患者の負担が少ない治療薬の開発は急務であると考えられる。しかし、固形癌を含め多くの流通している抗癌薬はイチイの樹皮より抽出されるパクリタキセルやドセタキセルなどのような天然物質を利用した抗がん剤⁷⁾なども存在するが、全身に影響を及ぼしてしまうものも少なくない。そのため近年ではドラッグデリバリーの技術が急速に進歩し^{8) 9) 10)}、標的細胞に特異的に作用する抗がん剤の開発が精力的に行われている。今後、さらに白血病細胞株を含む血液由来細胞株、あるいは固形癌細胞および正常血液細胞に対する作用効果について比較検討する必要があると考えられる。

一方で、早期のアポトーシスにおいて脂質二重膜の内側に存在するフォスファチジルセリンは軽度の細胞膜破壊により細胞表面に表出する。フォスファチジルセリンに高い親和性を持つ Annexin V を FITC にて蛍光標識した後、アポトーシスによって露出したフォスファチジルセリンに FITC-Annexin V を結合させることによりアポトーシス細胞を染色した。また、死細胞の判定のため、生細胞の細胞膜は透過せず、死細胞の細胞のみ透過する PI で染色を行い、PI 陽性を死細胞と判定した。界面活性剤などの作用によるネクローシスが急速に起きた場合には、Annexin V 陽性細胞は観察されず、PI 陽性の細胞が増加することが予測される (Figure 2 A)。今回、HL60細胞において PI および Annexin V 陽性の後期アポトーシスよりも、PI 陰性、Annexin V 陽性の初期アポトーシスが多くの観察されたのに対し、U937では、PI 陽性、Annexin V 陰性の後期アポトーシスの細胞が多く観察されたことは、細胞株毎に作用の程度が異なることを示している。これまで細胞溶解作用を持つ植物果実の研究においては、その細胞溶解作用の機序として果実に含まれるサポニンなどの界面活性剤成分により細胞膜に膜孔を形成することで急速に細胞質成分を細胞外に漏出させてネクローシスによる細胞溶解作用を示すことが知られている。今回の実験使用した細胞株においては、ネクローシス様の細胞死は観察されなかった。さらに、

HL60およびU937細胞株での比較により、細胞死の進行程度に大きな差が認められた。また、ミルクフルーツ果実種子抽出物による作用は、正常な単核球の培養液中にミルクフルーツ種子の抽出物を添加し培養しても単核球の生存に影響を及ぼしにくいことから²⁾、その細胞死の誘導には細胞の選択が行われていることが考えられる。

これまでに行われた研究において、同様の作用を示すものが報告されている。*Bacillus Thuringiensis* より抽出された Parasporin は、癌細胞に選択的に作用し細胞死を誘導することが知られている^{11) 12)}。この作用は、細胞膜上の GPI アンカー型蛋白質を Parasporin が認識後、膜孔形成蛋白質を細胞膜へと挿入し細胞死へと誘導を行っている。このような認識機構を介するため細胞株への作用効果に大きく差が出るのがわかっており、さらに、正常細胞と癌細胞の認識にこの機構が大きく関与していることがわかっている。今回の研究において、ミルクフルーツ種子抽出物による作用は、白血病細胞株毎に異なる細胞死が見られたことから、単純な細胞膜溶解による細胞死ではなく、Parasporin などの作用と非常に類似しており、ミルクフルーツ種子抽出物の細胞死においても同様の細胞選択機構が働いていることが示唆される。しかしながら、今回使用したミルクフルーツ種子抽出液は、複雑な抽出を行っておらず、その正確な成分は特定されていない。本研究においては、果実種子本来の成分を研究に使用した。また、ミルクフルーツは、東南アジアでは一般的に食されている果物であり、その種子の利用の安全性は高いと考えられる。しかし、赤血球の細胞溶解作用があるため、このままの使用は難しい。一方で、このような細胞選択的な細胞死は、その効果を十分確認することにより細胞選択的な細胞死誘導剤としての開発の余地があると考えられる。また、ミルクフルーツのような食品自体の生理活性評価は、通常の食生活において、予防あるいは症状の維持を通常の食事を摂取することで行うことができる健康食品の開発につながっていくことが期待される。

今後、ミルクフルーツ種子抽出物による細胞死がアポトーシスによる作用なのかを明らかにする

と共に、標的細胞あるいは、効果濃度などを明らかにし、生体に対する安全性とその効果の程度を検討して予定である。

6. 参考文献

- 1) 立石多貴子, 天川雅夫, 一原直人, 日下雅友, 加藤亮二, 糖尿病マウスを用いた柿種子抽出液における生理活性効果, 日本臨床衛生検査技師会 第49回九州支部医学検査学会, (2014) 沖縄
- 2) 天川雅夫, 秋山秀彦, 日下雅友, 一原直人, 立石多貴子, 遠峯由希恵, 加藤亮二, 白血病細胞株を用いたミルクフルーツ種子における抗腫瘍効果の検討, 日本臨床衛生検査技師会 第49回九州支部医学検査学会, (2014) 沖縄
- 3) 加藤厚 熱帯樹林の成分と利用 (3) サポニン, 熱帯林業, Vol.40, p.72-77 (1997)
- 4) 太田 和雄, 山田 一正, 坂井 保信, 棟方 宏次, 木村喜代次, 白血病の化学療法に関する2, 3の問題, 臨床血液, Vol.1, No. 12 p.824-832 (1960)
- 5) 造血細胞移植ガイドライン 急性骨髄性白血病, 日本造血細胞移植学会, (2009)
- 6) 造血器腫瘍診療ガイドライン 2013年版, 日本血液学会, 金原出版 (2013)
- 7) 高橋和久, 平間未知大, 石渡俊次, 三浦佳代, 鳥貫由理, 高橋史行, 大橋里奈, 肺がんの化学療法, 順天堂医学, 52, p536-545 (2006)
- 8) Shigehiro T, Kasai T, Murakami M, Sekhar SC, Tominaga Y, Okada M, Kudoh T, Mizutani A, Murakami H, Salomon DS, Mikuni K, Mandai T, Hamada H, Seno M., Efficient drug delivery of Paclitaxel glycoside: a novel solubility gradient encapsulation into liposomes coupled with immunoliposomes preparation. *PLoS One.*; 9 (9) (2014)
- 9) 松村保広, ドラッグデリバリーシステム [3] 抗がん剤内包ミセルの基礎から臨床, 日本防菌防黴学会誌, Vol.43, No.2 pp.101-107 (2015)
- 10) 馬場 一彦, 臨床応用されているがん領域でのドラッグデリバリー技術, オレオサイエンス, Vol. 10, No. 1 p. 15-18 (2010)
- 11) Shimada, H and Kitada S. Mega Assemblages of Oligomeric Aerolysin-like Toxins Stabilized by Toxin-associating Membrane Proteins *J.Biochem* 149 p.103-115 (2011)
- 12) 微生物毒素パラスポリン2の細胞認識を利用した生体での抗癌効果と作用解明, 本村恭平, 麻崎一哉, 岩崎新司, 木村雄作, 日下雅友, 北田栄, 第61回トキシシンポジウム (2014) 徳島