氏 名 近藤 亜希子

学 位 の 種 類 博士(医学)

学位授与年月日 平成24年3月27日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻

学位 論 文題 目 子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN における緑茶カテキン EGCG とクル

クミンの抗腫瘍効果に関する検討

論文審查委員 主查 教授 八重樫伸生

教授 鈴木 貴 教授 木村 芳孝

# 論文内容要旨

#### 1 研究目的

子宮平滑筋肉腫は子宮悪性腫瘍のうち比較的まれな疾患であり、標準的な化学療法が効きにくい腫瘍である。一方、天然物由来物質である、香辛料ターメリック由来のクルクミンと緑茶由来カテキンの EGCG は多くの腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果が報告されている。私達の以前の研究では子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN において、クルクミンが AKT-mTOR 経路を介し用量依存的に抗腫瘍効果を発揮することを報告した。しかし、クルクミンの治療への応用の可能性は、その生体利用効率の低さから限られたものとなっている。今回の研究は子宮平滑筋肉腫細胞の細胞増殖を抑制するのに必要なクルクミン濃度を減少させることを目的とし、緑茶カテキン EGCG とクルクミンの併用効果を検討した。

## 2 方法

ヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN を使用し、EGCG 単独投与、クルクミン単独投与、EGCG とクルクミンの併用投与による細胞増殖に対する効果を MTS assay で検討した。AKT、mTOR、S6 における効果をウェスタンブロッティング法により検討した。アポトーシス誘導効果は Caspase-3 活性、ウェスタンブロッティング法における Cleaved PARP および TUNEL 染色により検討した。クルクミンの細胞内取り込みについては吸光光度法により測定した。EGCG の細胞膜受容体として 67kDA ラミニンレセプター (67LR) が認識されているが、EGCG とクルクミンの細胞増殖抑制効果に対する 67LR の役割および EGCG によるクルクミンの細胞内取り込み増強効果に対する 67LR の作用を検討するために 67LR に対する中和抗体を使用した。

### 3 成績

EGCG とクルクミンの併用投与はそれぞれ単独投与よりも SKN 細胞の細胞増殖能を有意に抑制した。 EGCG 単独投与は AKT のリン酸化を抑制したが、mTOR のリン酸化は抑制しなかった。mTOR の特異的阻害剤である、ラパマイシンや低濃度クルクミンの単独投与は AKT のリン酸化を軽度増強し、mTOR、S6 のリン酸化は抑制出来なかったのに対し、EGCG とクルクミンの併用投与は AKT、mTOR、S6 のリン酸化を抑制した。 EGCG 単独投与では早期アポトーシスのみを誘導し、EGCG とクルクミンの併用投与は早期アポトーシスに加えて晩期アポトーシスを誘導した。 EGCG とクルクミンの併用による

AKT-mTOR 経路を介した細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果は以前に報告した  $100\sim200\mu M$  より低い  $5\sim10\mu M$  のクルクミン濃度で認められた。また EGCG はクルクミンの細胞内への取り込みを促進した。抗 67LR 抗体は EGCG とクルクミンの併用による細胞増殖抑制効果を部分的に解除し、67LR の細胞増殖抑制効果への関与が示唆されたが、EGCG によるクルクミンの細胞内への取り込みの増強効果には 67LR は関与しなかった。

#### 4 結論

EGCG はクルクミンの細胞内への取り込みを促進し、AKT-mTOR 経路を阻害した。また、細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果に必要なクルクミンの濃度を著明に低下させた。67LR は EGCG とクルクミンの併用による細胞増殖抑制効果に部分的に関与したが、EGCG によるクルクミンの細胞内への取り込みは67LR とは無関係に増強した。

# 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN における緑茶カテキン EGCG とクルクミンの抗腫瘍効果 に関する検討

所属専攻・分野名	医科学専攻・発生・発達医学講座 婦人科学分野
学籍番号	氏名 近藤 亜希子

子宮平滑筋肉腫は子宮悪性腫瘍のうち比較的まれな疾患であり、標準的な化学療法が効きにくい腫瘍である。一方、天然物由来物質である、香辛料ターメリック由来のクルクミンと緑茶由来カテキンの EGCG は多くの腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果が報告されている。筆者らの以前の研究では子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN において、クルクミンが AKT-mTOR 経路を介し用量依存的に抗腫瘍効果を発揮することを報告している。しかし、クルクミンの治療への応用の可能性は、その生体利用効率の低さから限られたものとなっている。今回の研究は子宮平滑筋肉腫細胞の細胞増殖を抑制するのに必要なクルクミン濃度を減少させることを目的とし、緑茶カテキン EGCG とクルクミンの併用効果を検討している。

本研究はヒト子宮平滑筋肉腫細胞株 SKN を使用し以下の実験を行なっている。EGCG 単独投与、クルク ミン単独投与、EGCG とクルクミンの併用投与による細胞増殖に対する効果を MTS assay で検討し、EGCG とクルクミンの併用投与はそれぞれ単独投与よりも SKN 細胞の細胞増殖能を有意に抑制することを確認 した。 次に AKT、mTOR、S6 における効果をウェスタンブロッティング法により検討しているが、EGCG 単 独投与は AKT のリン酸化を抑制し、mTOR のリン酸化は抑制しなかった。mTOR の特異的阻害剤である、ラ パマイシンや低濃度クルクミンの単独投与は AKT のリン酸化を軽度増強し、mTOR、S6 のリン酸化は抑制 出来なかったのに対し、EGCG とクルクミンの併用投与は AKT、mTOR、S6 のリン酸化を抑制した。アポト ーシス誘導効果は Caspase-3 活性、ウェスタンブロッティング法における Cleaved PARP および TUNEL 染 色により検討し、EGCG 単独投与では早期アポトーシスのみを誘導し、EGCG とクルクミンの併用投与は早 期アポトーシスに加えて晩期アポトーシスを誘導した。EGCG とクルクミンの併用投与による AKT-mTOR 経 路を介した細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果は以前に報告したより低いクルクミン濃度で認め られた。また、クルクミンの細胞内取り込みを吸光光度法により測定し、EGCG はクルクミンの細胞内へ の取り込みを促進した。近年、EGCG の細胞膜受容体として 67kDA ラミニンレセプター (67LR) が認識さ れているが、EGCG とクルクミンの細胞増殖抑制効果および EGCG によるクルクミンの細胞内取り込み増強 効果に対する 67LR の作用を検討するために 67LR に対する中和抗体を使用している。抗 67LR 抗体は EGCG とクルクミンの併用による細胞増殖抑制効果を部分的に解除し、67LR の細胞増殖抑制効果への関与が示 唆されたが、EGCG によるクルクミンの細胞内への取り込みの増強効果には 67LR は関与しなかった。

以上より EGCG はクルクミンの細胞内への取り込みを促進し、AKT-mTOR 経路を阻害することが示唆された。また、EGCG は細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果に必要なクルクミンの濃度を著明に低下させることが明らかになった。また、67LR は EGCG とクルクミンの併用による細胞増殖抑制効果に部分的に関与したが、EGCG によるクルクミンの細胞内への取り込みは 67LR とは無関係に増強した。本研究は子宮平滑筋肉腫細胞における EGCG とクルクミンの併用による抗腫瘍効果を示した初めての報告であり、この研究にて EGCG と低濃度のクルクミンを併用することでより高濃度のクルクミンと同等の効果も期待できることが明らかとなった。今後  $in\ vivo$  での有効性を確認することにより、臨床応用への発展が期待でき、学位に十分値するものと判断される。

よって、本論文は博士(医学)の学位論文として合格と認める。