

〈原著〉

センシンレンのエタノール抽出液による 白血病細胞株での抗腫瘍効果の検討

秋山 秀彦¹⁾、鈴木 一春²⁾、谷口 利幸²⁾、勝田 逸郎¹⁾

Evaluation of anti-tumor activity with the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* in leukemic cell lines

Hidehiko Akiyama¹⁾, Kazuharu Suzuki²⁾, Toshiyuki Taniguchi²⁾ and Itsuro Katsuda¹⁾

Summary *Andrographis paniculata* is traditionally used as an anti-cancer herb in Southeast Asian countries like China and India. *Andrographis paniculata* plant extract is known to possess a variety of pharmacological activity. We evaluated the anti-tumor activity of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* compared with the anti-cancer drug in leukemic cell lines. After the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* in leukemic cell lines, the Annexin V positive rate and Caspase-3 activity increased compared with untreated cells, DNA fragmentations were observed by Wright-Giemsa staining and agarose gel electrophoresis, and the G1 phase in cell cycle was arrested. These results strongly suggested that the ethanol extract from *Andrographis Paniculata* induces apoptosis in leukemic line cells via Caspase-3 activation.

Key words: *Andrographis Paniculata*, Andrographolide, Apoptosis, Leukemic cell lines

I. 諸言

センシンレン (*Andrographis Paniculata*) とは東南アジアなどで栽培されているハーブであり、何世紀もの間、病気治療などに使用されてきた。その作用として、抗炎症作用¹⁾、抗血栓作用²⁾および抗腫瘍効果³⁾などが報告されている。センシンレンの主成分は、アンドログラフォリド (*Andrographolide*) であり、葉および幹に含まれており、センシンレンから抽出されたアンドログラフォリドの抗腫瘍作用も報告されている⁴⁾。

センシンレンについては、多くの薬理作用が報告されているが、今回は由来の異なる白血病細胞株を用い、センシンレンのエタノール抽出液の添加による抗腫瘍効果を検討したので報告する。

II. 材料および方法

1. 材料

センシンレン (AP: *Andrographis Paniculata*) は、AGPセンシンレン原粉末を健康免疫研究所

¹⁾藤田保健衛生大学 医療科学部 臨床検査学科
〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98

²⁾健康免疫研究所

受領日 平成27年6月5日

受理日 平成27年7月5日

¹⁾Department of Medical Technology, School of Health Sciences, Fujita Health University

1-98 Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

²⁾Institute of Health and Immunology Science

より入手し、エタノールで溶解後、10,000 rpm、1分間遠心後の上清を使用した。細胞浮遊液への添加終濃度は0.5 mg/mLまたは1.0 mg/mLの2濃度で行った。アポトーシス誘導の陽性対照として、抗がん剤であるシタラビン (Ara-C : 代謝拮抗剤 SIGMA) を添加終濃度1.0 μ g/mLで使用した。

白血病細胞株はヒト由来の単球性白血病細胞株 (U937 : EC85011440)、前骨髄球性白血病細胞株 (HL60 : EC98070106)、慢性骨髄性白血病細胞株 (K562 : EC89121407)、T細胞芽球性白血病細胞株 (Jurkat : EC88042803)、形質細胞腫細胞株 (H929 : EC95050415) をDSファーマバイオメディカル株式会社より購入した。培養液は、RPMI-1640 (SIGMA : R8758) に10%ウシ胎児血清 (FBS : Fetal bovine serum)、抗生物質であるペニシリン (100 U/mL : Gibco) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL : Gibco) を含むものを使用した。細胞は、炭酸ガス培養装置で5%CO₂、37°Cで培養した。

2. 方法

1) 抗腫瘍効果の測定方法

抗腫瘍効果の測定は、MEBCYTO-Apoptosis Kit (MBL : Annexin V-FITC Kit) およびMTT Cell Proliferation Assay Kit (Cayman) にて測定した。

Annexin V-FITC Kitの測定原理は、細胞膜の内側にあるホスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) が、アポトーシスの初期に細胞膜の外側に表出することで、PSと親和性の高いFITCを結合したAnnexin Vと結合する。また、プロピジウムイオダイド (Propidium Iodide) は、核を染める色素であり、アポトーシスの後期である細胞膜破壊を反映する。測定は、各細胞をAP添加24時間前に24培養プレート (FALCON) に 1×10^5 /mLで播種した。AP添加後、24時間後に細胞を回収した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS : Phosphate buffered saline) で細胞を1度洗浄後、キットに含まれるBinding Buffer 85 μ Lで懸濁した。その後、Annexin V-FITC (10 μ L) とPropidium Iodide (5 μ L) を混和後、室温、暗室で15分間反応させた。その後、Binding Buffer 400 μ Lを添加し、フローサイトメータであるFACS CaliburでAnnexin V陽性

率を測定した。

MTT Cell Proliferation Assay Kit (Cayman) は、細胞増殖または死細胞の判定に使用される。生細胞ではミトコンドリアの還元酵素により、テトラゾリウム塩がフォルマザンに還元されて青色の色素が産生されるが、死細胞では色素は産生されない。測定方法は、上に示したApoptosis Kitでの測定と同様に細胞を播種し、さらに、AP添加後に96培養プレート (FALCON) に細胞浮遊液を100 μ L播種した。24時間後、MTT試薬10 μ Lを添加し、細胞培養装置内で3時間反応させた。その後、上清85 μ Lを除き、キットに含まれる溶解液100 μ Lを添加して混和後、細胞に取り込まれた色素を溶解してマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Benchmark) で550 nmにて吸光度を測定した。

2) 細胞の形態学的変化

AP添加後の形態学的変化は、ライト・ギムザ染色で観察した。アポトーシスの形態学的変化として、細胞の縮小化と核の断片化があり、核の断片化によるアポトーシス小体の確認を行った。U937細胞 (1×10^5 /mL) にAPまたは陽性対照としてAra-Cを24時間添加後、スライドガラスにサイトスピン装置で750 rpm、10分間遠心して細胞を塗付した。ライト液で3分固定後、リン酸緩衝液 (1/150M, pH 6.4) を添加し前染色を行い、3分後に水洗した。その後、ギムザ染色液 (ギムザ原液1滴/リン酸緩衝液1 mL) で10分間の後染色を行い、水洗後、乾燥させた。

3) 細胞の核の断片化の検出

AP添加後の細胞核断片化の確認は、細胞核のDNAを抽出して電気泳動で行った。アポトーシスの誘導により、最終的にカスパーゼ-3が活性化されることで、DNaseの活性化が occり、DNAがヌクレオソームの単位で切断されて核の断片化が検出される。

各細胞 (1×10^6 /5 mL) にAP またはAra-C添加24時間後に細胞を回収後、細胞溶解緩衝液 (1M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 10% Triton X-100) で溶解した。15,000 rpm、20分遠心後、その上清をRNase AおよびProteinase Kを添加して処理後、5M NaClおよびイソプロパノールを添加して、-20°Cで12時間処理した。その後、15,000

rpm、15分間遠心後、上清を除去してDNAを抽出して乾燥後、TE緩衝液（1 M Tris-HCl, 0.5M EDTA）に溶解し、色素（BPB：Bromophenol blue）を添加して2%アガロースゲル（エチジウムブロマイド含む）にて100V、45分電気泳動した。

4) アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3活性の測定およびその阻害剤による抑制効果

カスパーゼ-3活性の測定は、Caspase-Glo 3/7 Assay（Promega）を使用した。カスパーゼはシステイン残基をもつタンパク分解酵素であり、アポトーシスを誘導するシグナル伝達経路を形成しており、最終的にカスパーゼ-3が活性化されて核の断片化がおこる。

各細胞（ 1×10^5 /mL）にAPまたはAra-C添加24時間後、96培養プレート（FALCON）に細胞浮遊液を100 μ L播種した。キットに含まれる基質と緩衝液を等量混和後、その反応液100 μ Lを細胞浮遊液に添加した。測定は試薬添加1時間後にルミノールアッセイ（ARVOX：Perkin Elmer）で発光を測定した。

アポトーシスの抑制効果は、カスパーゼ阻害剤であるZ-VAD-FMK（Promega：20 μ M）を使用した。各細胞（ 1×10^5 /mL）を播種後、APを添加する1時間前にカスパーゼ阻害剤を添加し、

その後、APを添加した。24時間後に細胞を回収後、アポトーシスキット（Annexin V-FITC Kit）にてAnnexin V陽性率を阻害剤添加の有無で測定し、カスパーゼの関与をその抑制効果で検討した。

5) 細胞周期の解析

細胞周期への影響を確認するため、抗がん剤の代謝拮抗剤であり、細胞周期のS期に作用するシラタビン（Ara-C）との比較を行った。

HL60細胞（ 1×10^6 /5 mL）をAPまたはAra-C処理後、細胞を回収してPBSで洗浄後、70%エタノールで4時間以上固定した。その後、細胞をPBSで洗浄後、リン酸-クエン酸緩衝液40 μ Lに浮遊させてDNAを抽出した。その後、RNase Aを添加して37℃、30分反応後、PBSで洗浄後にPBSに浮遊させ、プロピジウムイオダイド（Propidium Iodide）を添加して暗所で反応させ、FACS Caliburで解析した。

Ⅲ. 結果

1. 抗腫瘍効果の測定

MEBCYTO-Apoptosis Kit（MBL：Annexin V-FITC Kit）でのAnnexin V陽性率（3回測定の平均値）をFig. 1に示す。各細胞株でのAP（0.5

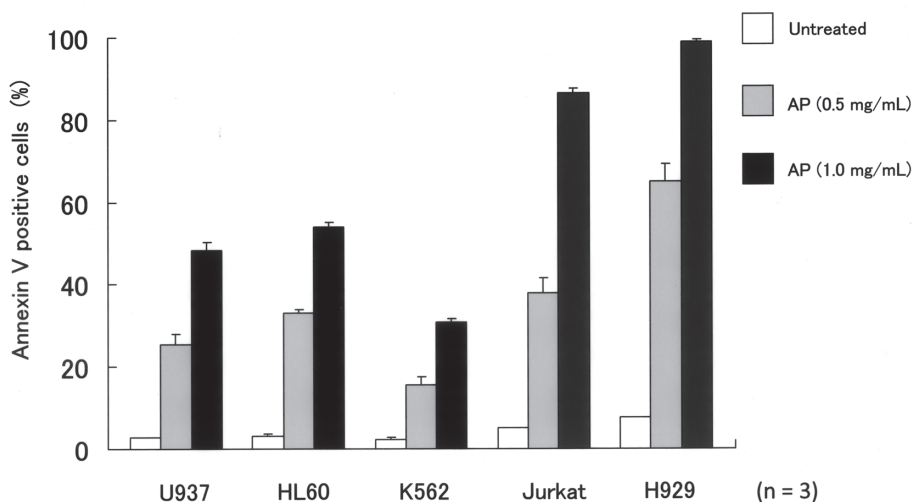


Fig. 1 Histogram of Annexin V positive proportion. The ethanol extract from *Andrographis Paniculata* (0.5 mg/mL or 1.0 mg/mL) was added in each leukemic cell lines for 24 h.

mg/mLまたは1.0 mg/mL) 添加24時間後の Annexin V陽性率 (アポトーシスの初期および後期を反映する) は、U937 (25.5%、48.2%)、HL60 (33.1%、53.8%)、K562 (15.5%、30.7%)、Jurkat (38.0%、86.3%)、H929 (65.0%、99.0%) であり、濃度依存性に陽性率の増加が認められた。また、無添加時でのAnnexin V陽性率は、各細胞株で2.4~7.5%であった。また、Fig. 2には、U937測定時のドットプロット図を示すが、AP添加濃度の増加による明らかなドットプロット数の増加が確認された。

MTTによる生細胞に対する抑制効果を吸光度 (3回測定の平均値) でFig. 3に示す。各細胞株での無添加細胞に対するAP (0.5 mg/mLまたは1.0 mg/mL) 添加24時間後の抑制率は、U937 (49.7%、76.6%)、HL60 (52.2%、84.5%)、K562 (24.8%、35.2%)、Jurkat (31.4%、74.3%)、H929 (38.2%、73.3%) であり、濃度依存性に細胞増殖の抑制が認められた。

2. 形態学的変化

U937細胞でのAP (1.0 mg/mL) または陽性対

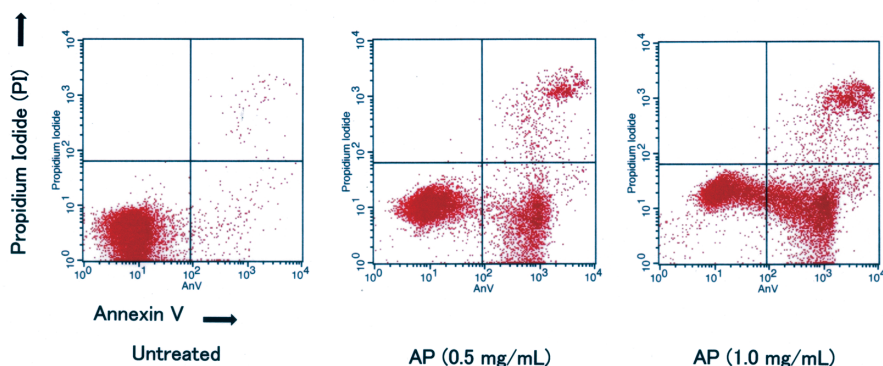


Fig. 2 The dot plots in flow cytometer.

The ethanol extract from *Andrographis Paniculata* (0.5 mg/mL or 1.0 mg/mL) was added in U937 cells for 24 h. The X-axis indicates the proportion of Annexin V positive cells and the Y-axis indicates the proportion of Propidium Iodide positive cells.

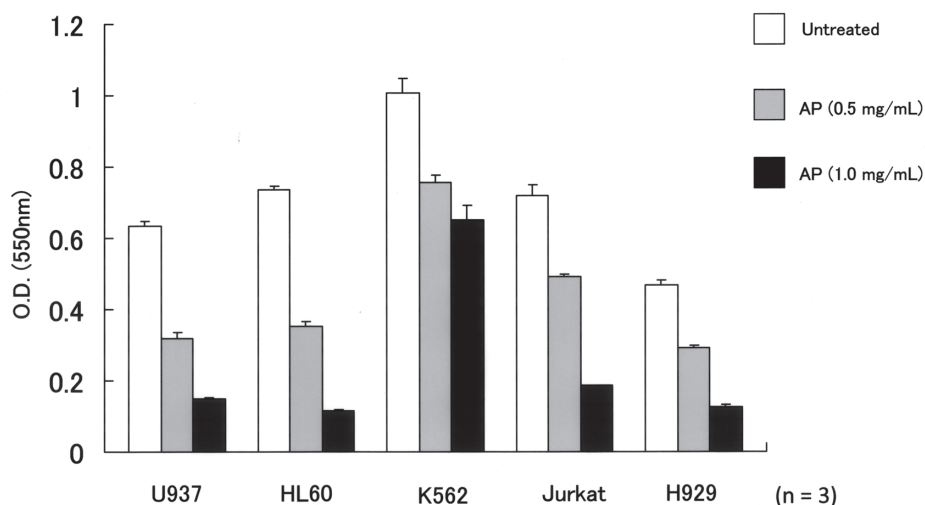


Fig. 3 Measurement of MTT assay.

The ethanol extract from *Andrographis Paniculata* (0.5 mg/mL or 1.0 mg/mL) was added in each leukemic cell lines for 24 h, and measured the optical density by MTT assay.

照として抗がん剤であるAra-C (1.0 μ g/mL) 添加24時間後のライト・ギムザ染色の結果をFig. 4に示す。AP添加後では、抗がん剤でアポトーシスが誘導されるAra-C添加後と同様にアポトーシスを反映する特徴的な形態学的変化である細胞の縮小化と核の断片化が認められた。

3. 電気泳動によるDNA断片化の検出

U937、HL60およびJurkat にAP (1.0 mg/mL) またはAra-C (1.0 μ g/mL) 添加後に細胞のDNAを抽出し、電気泳動した結果をFig. 5に示す。陽性対照であるAra-CではDNAの明らかな断片化

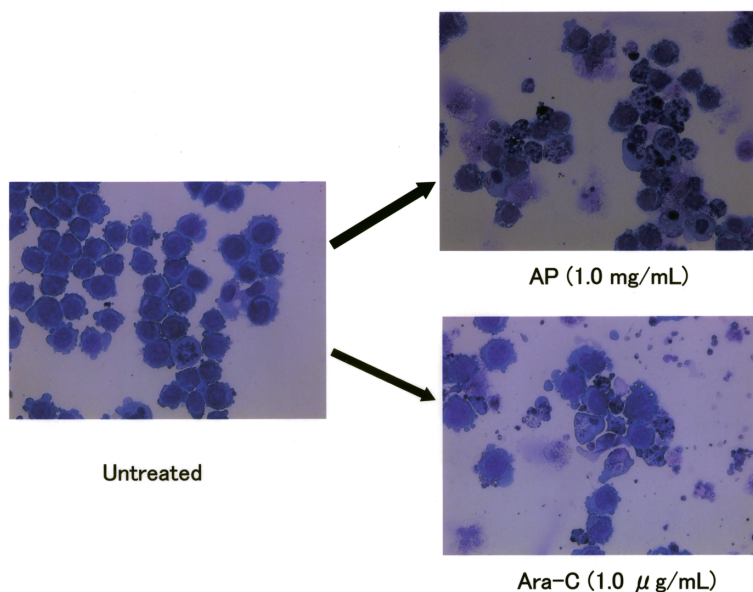


Fig. 4 Morphological change.

The ethanol extract from *Andrographis Paniculata* (1.0 mg/mL) or Ara-C (1.0 μ g/mL) was added in U937 cells for 24 h, and the treated cells were stained by Wright-Giemsa staining method.

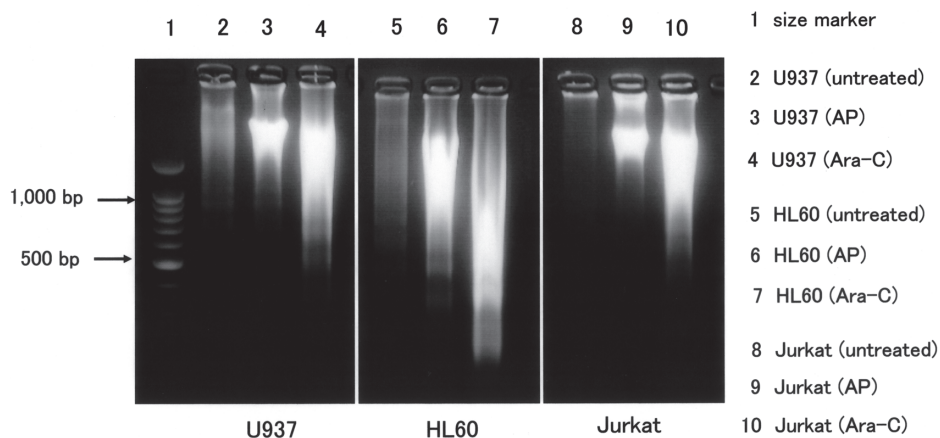


Fig. 5 Detection of DNA fragmentations by agarose gel electrophoresis.

DNA fragmentations were detected by agarose gel electrophoresis after 24 h with the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* (1.0 mg/mL) or Ara-C (1.0 μ g/mL) in U937, HL60 or Jurkat cells. Lane 1 shows a DNA size marker.

が認められるが、AP添加後も同様にDNaseの活性化によるDNAの断片化を確認することができた。

4. カスパーゼ-3活性とその阻害剤による抑制効果
各細胞株にAP (1.0mg/mL) またはAra-C (1.0

$\mu\text{g/mL}$) 添加後のカスパーゼ-3の活性 (3回測定の平均値) をFig. 6に示す。各細胞株での無添加に対するAPまたはAra-C添加後の比率は、U937 (2.89、6.53)、HL60 (2.36、5.93)、K562 (1.76、0.84)、Jurkat (3.21、7.26)、H929 (2.42、1.65) であり、無添加細胞と比較して増加傾向

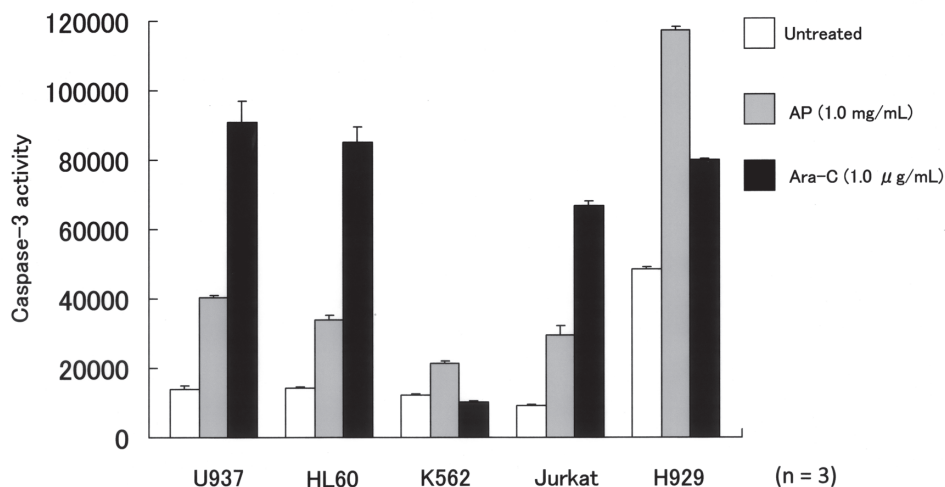


Fig. 6 Measurement of Caspase-3 activity.

The Caspase-3 activity was measured with the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* or Ara-C in each leukemic cell lines for 24 h.

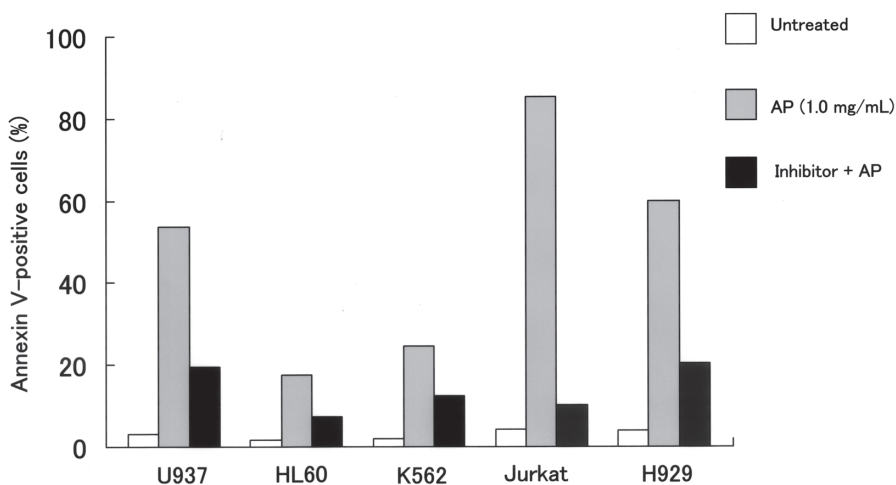


Fig.7 The inhibition of Annexin V positive rate by caspase inhibitor treatment.

Annexin V positive rate was measured with the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* with or without caspase inhibitor (Z-VAD-FMK : 20 μM) in each leukemic cell lines for 24 h.

が確認された。U937、HL60およびJurkatでは、AP添加後よりAra-C添加後の方が高値であった。しかし、H929ではAra-CよりAP添加後が高値となった。また、K562のみ、Ara-C添加後が低値であったが、これは24時間後では抗腫瘍効果が低いためであると考えられる。

カスパーゼ阻害剤添加によるAnnexin V陽性率の抑制効果をFig. 7に示す。各細胞株でのAP (1.0 mg/mL) のみの添加に対して、阻害剤 (20 μ M) 添加後にAP添加後のAnnexin V陽性率での抑制率は、U937 (63.4%)、HL60 (58.3%)、K562 (49.2%)、Jurkat (88.0%)、H929 (65.9%)であった。これらの結果より、AP添加によるAnnexin V陽性率の増加については、アポトーシスを誘導するカスパーゼの関与が確認された。

5. 細胞周期の解析

HL60でのAP (1.0 mg/mL) またはAra-C (1.0 μ g/mL) 添加24時間後の細胞周期の解析結果をFig. 8に示す。AP添加後では、細胞周期のG1期の増加とS期の低下が認められた。比較対照として使用したAra-Cは代謝拮抗剤であり、細胞周期のG1期の増加とS期の低下を認めるが、同

様な結果が確認され、細胞周期への作用が確認された。

IV. 考察

AGPセンシレン (AP: *Andrographis Paniculata*) のエタノール抽出液添加による抗腫瘍効果は、今回使用した全ての白血病細胞株に認められた。骨髓球系細胞株であるU937、HL60およびK562と比較して、特にリンパ球系細胞株であるJurkatおよびH929で高い抗腫瘍効果が認められた。

今回の検討では、由来の異なる白血病細胞株にて、AP添加後にアポトーシスを反映するAnnexin V陽性率の増加、MTTでの生細胞の増殖抑制、細胞の縮小化と核の断片化をともなう形態学的変化とDNAのラダーの検出、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3活性の増加およびその阻害剤による抑制効果、細胞周期G1の増加とS期の低下が確認でき、その抗腫瘍効果は、アポトーシスであることが確認された。

センシレンの抗腫瘍効果作用の主成分はアンドログラフォリド (Andrographolide) であり、

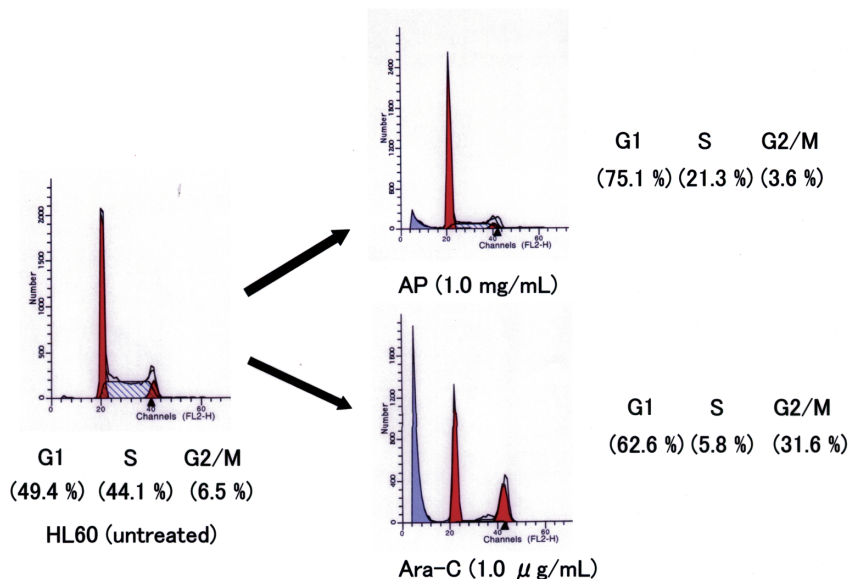


Fig. 8 Cell cycle analysis.

The proportion of cell cycle was measured with the treatment of ethanol extract from *Andrographis Paniculata* or Ara-C for 24 h in HL60 cells. The proportion of G1 phase with the treatment of AP was similarly increased with the treatment of Ara-C.

2.1%が含まれている（日本食品分析センターによる分析結果）。アンドログラフォリド（Andrographolide）による白血病細胞株での抗腫瘍効果として、前骨髄球性白血病細胞株（HL60）などを使用してミトコンドリア由来のアポトーシス誘導の報告はあるが⁵⁾、今回のような由来の異なる白血病細胞株を同時に多種類使用した報告はない。また、HL60を使用した報告では、細胞周期G1期の増加が報告されており⁶⁾、今回行った検討結果と同様な結果であった。

リンパ球系細胞株のなかでも形質細胞腫瘍細胞株であるH929において、特に高い抗腫瘍効果が認められた。最近、アンドログラフォリドによるNF- κ Bの抑制が報告されている⁸⁾。これは、現在使用されている多発性骨髄腫の治療薬であるプロテアソーム阻害剤と同様な機序であり⁷⁾、骨髄腫細胞株での抗腫瘍効果は興味深く、その効果のメカニズムの解明を行う予定である。

さらに、フィラデルフィア染色体を有する慢性骨髄性白血病細胞株であるK562でも抗腫瘍効果が認められた。K562のキメラ遺伝子であるBcr-Abl融合遺伝子は熱ショックタンパク質であるHSP90と複合体を形成している。HSP90と相互作用するクライアントタンパク質には、がん化に関する機能タンパク質などが含まれており、HSP90を標的とする抗がん剤の開発が進んでいる⁹⁾。最近、アンドログラフォリドによるBcr-Abl融合遺伝子のHSP90の開裂が報告されており⁹⁾、HSP90阻害剤としての新たな展開も期待される。

今回使用したAGPセンシンレンのエタノール抽出液は、夾雑物質が含まれている。その抗腫瘍効果は、2.1%含まれているアンドログラフォリド由来であると推測されるが、明らかではない。今後の検討として、アンドログラフォリド製剤との比較検討を行い、その抗腫瘍効果を確認する予定である。

V. 結語

白血病細胞株にAGPセンシンレンのエタノール抽出液添加による抗腫瘍効果を確認した。さらに、骨髄球系細胞株より、リンパ球系細胞株

で高い抗腫瘍効果が認められた。今後は、より詳細に抗腫瘍効果のメカニズムを解析する予定である。

参考文献

- 1) Sheeja K, Shihab PK, Kuttan G: Antioxidant and anti-inflammatory activities of the plant *Andrographis paniculata* Nees. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 28: 129-140, 2006.
- 2) Amroyan E, Gabrielian E, Panossian A, Wikman G, Wagner H: Inhibitory effect of andrographolide from *Andrographis paniculata* on PAF-induced platelet aggregation. *Phytomedicine*, 6: 27-31, 1999.
- 3) Geethangili M, Rao YK, Fang SH, Tzeng YM: Cytotoxic constituents from *Andrographis paniculata* induce cell cycle arrest in jurkat cells. *Phytother Res*, 22: 1336-1341, 2008.
- 4) Rajagopal S, Kumar RA, Deevi DS, Satyanarayana C, Rajagopalan R: Andrographolide, a potential cancer therapeutic agent isolated from *Andrographis paniculata*. *J. Exp Ther Oncol*, 3: 147-158, 2003.
- 5) Cheung HY, Cheung SH, Li J, Cheung CS, Lai WP, Fong WF, Leung FM: Andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* induces cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *Planta Med*, 71: 1106-1111, 2005.
- 6) Lu WJ, Lee JJ, Chou DS, Jayakumar T, Fong TH, Hsiao G, Sheu JR: A novel role of andrographolide, an NF-kappa B inhibitor, on inhibition of platelet activation: the pivotal mechanisms of endothelial nitric oxide synthase/cyclic GMP. *J Mol Med*, 89: 1261-1273, 2011.
- 7) Tang W, Su G, Li J, Liao J, Chen S, Huang C, Liu F, Chen Q, Ye Y: Enhanced anti-colorectal cancer effects of carfilzomib combined with CPT-11 via downregulation of nuclear factor- κ B in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 45: 995-1010, 2014.
- 8) Nakashima T, Ishii T, Tagaya H, Seike T, Nakagawa H, Kanda Y, Akinaga S, Soga S, Shiotsu Y: New molecular and biological mechanism of antitumor activities of KW-2478, a novel nonansamycin heat shock protein 90 inhibitor, in multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res*, 16: 2792-2802, 2010.
- 9) Liu SH, Lin CH, Liang FP, Chen PF, Kuo CD, Alam MM, Maiti B, Hung SK, Chi CW, Sun CM, Fu SL: Andrographolide downregulates the v-Src and Bcr-Abl oncoproteins and induces Hsp90 cleavage in the ROS-dependent suppression of cancer malignancy. *Biochem Pharmacol*, 87: 229-242, 2014.