ブナシメジ由来ポリテルペンの HL-60 白血病細胞における アポトーシス誘導機構

水本裕子[§], 大野木宏*, 水谷滋利*, 榎 竜嗣*, 浅田起代蔵*,
杉元康志, 加藤郁之進*

鹿児島大学大学院連合農学研究科

* タカラバイオ(株) バイオ研究所

Mechanism of Apoptosis Induced by Polyterpene from Buna-shimeji (*Hypsizigus marmoreus*) in HL-60 Cells

Hiroko Mizumoto[§], Hiromu Ohnogi*, Shigetoshi Mizutani*, Tatsuji Enoki*,
Kiyozo Asada*, Yasushi Sugimoto and Ikunoshin Kato*

United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University,
1-21-24 Korimoto, Kagoshima City 890-0065

* Biotechnology Research Laboratories, Takara Bio, Inc., 3-4-1 Seta, Otsu, Shiga 520-2193

Hypsiziprenol A₉ is a polyterpene isolated from the fruiting body of the Japanese edible mushroom Buna-shimeji (*Hypsizigus marmoreus*). Although our recent studies revealed that hypsiziprenol A₉ has strong anti-tumor activity against tumor-bearing mice, its mechanism of action remains unclear. To elucidate further its anti-tumor action, we examined in detail hypsiziprenol A₉-induced apoptosis in human cancer cell lines.

We observed that hypsiziprenol A₉ strongly inhibited the growth of human promyelocytic leukemia HL-60 cells and several other cancer cell lines in a dose-dependent manner. Hoechst 33342 staining showed DNA fragmentation and condensation of chromatin in HL-60 cells treated with hypsiziprenol A₉. DNA laddering, a hallmark of apoptosis, was detected using agarose gel electrophoresis. In addition, flow cytometric analysis confirmed that hypsiziprenol A₉ increased sub-G₁/G₀ populations in a time-dependent manner. Hypsiziprenol A₉ also increased activities of caspase-2, -3, -8 and -9 in a dose-dependent manner in the apoptotic HL-60 cell. Furthermore, JC-1 fluorescent staining determined that hypsiziprenol A₉-induced apoptosis was associated with a loss of mitochondrial membrane potential.

These results suggest that hypsiziprenol A₉ inhibits the growth of HL-60 cells by inducing apoptosis that is mediated through mitochondrial membrane potential loss and caspase activation.

(Received Jun. 30, 2008 ; Accepted Sep. 3, 2008)

Keywords : apoptosis, cancer cell, *Hypsizigus marmoreus*, hypsiziprenol A₉

キーワード : ブナシメジ, hypsiziprenol A₉, がん細胞, アポトーシス

ブナシメジ, シイタケ, エノキタケなどのキノコ類は古くから日本人の生活になじみのある食品である。近年それらの様々な機能性に関する研究が進められ, ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) については抗腫瘍作用¹⁾, 発がん抑制作用²⁾, 脂質低下作用³⁾, 抗アレルギー作用⁴⁾などが報告されている。ブナシメジの抗腫瘍成分は高分子画分の報告⁵⁾もあるが, その構造や作用機構などの詳細については明らかになっていない。水谷らは担がん動物を用いた試験

でブナシメジの酢酸エチル抽出物に強い抗腫瘍作用を見出し, がん細胞に対して強いアポトーシス誘導作用があること, さらに活性成分が低分子のポリテルペン (hypsiziprenol A₉) であることを明らかにした⁶⁾。hypsiziprenol A₉は宝酒造・中央研究所(現 タカラバイオ・バイオ研究所)によって単離されたブナシメジに特有の成分である。hypsiziprenol A₉の構造はSawabeらによって決定され^{7,8)}, 図1に示すように, 部分的に水酸基が導入されたイソプレレン単位の繰り返し構造を特徴とする。hypsiziprenol A₉の機能に関しては, これまでに培養肝がん細胞の細胞周期停止による増殖抑制⁹⁾や結核菌の増殖抑制¹⁰⁾などが報告され

〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号

* 〒520-2193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号

[§] 連絡先 (Corresponding author), nskkk_mizumoto@yahoo.co.jp

図 1 hypsiziprenol A₉ の構造式

ている。今回、我々は hypsiziprenol A₉ の抗腫瘍作用をさらに解明することを目的として、アポトーシス誘導のメカニズムを解析した。

実験方法

1. 細胞

ヒト前骨髄性白血病細胞株 HL-60 (ATCC No. CCL-240), ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 Jurkat (ATCC No. TIB-152), ヒト結腸腺癌細胞株 HCT116 (ATCC No. CCL-247) および HT-29 (ATCC No. HTB-38) は大日本住友製薬より購入した。浮遊性細胞株 (HL-60, Jurkat) は RPMI-1640 培地 (Sigma) で、接着性細胞株 (HCT116, HT-29) は DMEM 培地 (Sigma) で培養した。両培地には予め牛胎児血清 (大日本住友製薬) を 10%, ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク) を 1% 添加したものをを用いた。細胞はすべて 37°C, 5% CO₂ の条件で培養した。

2. ブナシメジからの hypsiziprenol A₉ の調製

水谷らの方法⁶⁾に従って、ブナシメジから hypsiziprenol A₉ の調製をおこなった。hypsiziprenol A₉ を多く含有する K-3128 株 (タカラバイオ保有) の子実体を 60°C で乾燥後、粉碎した。ブナシメジ子実体粉末 300 g に酢酸エチルを加えた全量 5 L を 3 時間、室温で攪拌した。吸引濾過により不溶物を除去し酢酸エチル可溶性成分を抽出した。これを Silica gel 60 (Merck) を充填したカラム (300 mL vol.) にかけて、3 L の酢酸エチルを流して非吸着画分を溶出後、アセトン 3 L を流してアセトン溶出成分を回収した。これを減圧濃縮後、エタノールに再溶解させ、減圧濃縮して乾固後、重量を測定した。この操作を 10 回おこない、最終的に 3 kg の子実体粉末からアセトン溶出画分が 35.2 g 得られた。この 500 mg を Silica gel 60 カラム (300 mL vol.) にかけて、酢酸エチル：アセトン (50 : 50) より、(0 : 100) までグラジエントをかけて主要成分を回収した。減圧濃縮で溶剤を除去した後、メタノール：エタノール：水 (3 : 4 : 4) の混合溶媒に溶解し、同溶媒を溶出液にした ODS カラム (CAPCELL PAK C18, 資生堂) を用いた高速液体クロマトグラフィーにより hypsiziprenol A₉ を分取した。それを濃縮乾固して、260 mg の精製物を得た (99%)。これを dimethyl sulfoxide (DMSO, ナカライテスク) に溶解し、以下の実験に用いるまで -20°C で保存した。

3. 種々のがん細胞株に対する増殖抑制作用

各がん細胞株における hypsiziprenol A₉ の増殖抑制作用を評価するために、生細胞の増殖能力を WST-1 法によって測定した。各がん細胞株 (2.5 × 10⁵ cells/mL) を 96 穴プレート (Corning) に播種した。浮遊性細胞株はその後直ちに、接着性細胞株は 24 時間培養後に hypsiziprenol A₉ (最終濃度 5–20 μM) またはコントロールとして 0.1% DMSO を含む培地で培養した。24 時間後、WST-1 試薬 (Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System, タカラバイオ) をプレートに添加し、37°C, 5% CO₂ の条件で 1 時間インキュベート後、プレートリーダーで吸光度 (測定/対照 = 450/650 nm) を測定した。各がん細胞株への増殖抑制作用は、コントロールの吸光度を 100% として、各濃度の hypsiziprenol A₉ を処理した時の増殖能を算出し、増殖が 50% 抑制される濃度 (IC₅₀) を求めた。

4. 核染色による核断片化の観察

HL-60 細胞 (最終濃度 2.5 × 10⁵ cells/mL) をシャーレ (サンセイ医療器材) に播種し、hypsiziprenol A₉ (最終濃度 10 μM) またはコントロールとして 0.1% DMSO を含む培地 (RPMI-1640) で培養した。4 時間後、遠心して細胞を集めた。次に、5% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) / PBS (-) を添加して細胞を固定後、PBS (-) で洗浄し、Hoechst 33342 (Molecular Probes) で核を染色し、蛍光顕微鏡 (オリンパス) で観察した (励起/蛍光 = 330–385/420 nm)。

5. アガロースゲル電気泳動による DNA 断片の検出

HL-60 細胞 (最終濃度 2.5 × 10⁵ cells/mL) をシャーレに播種し、hypsiziprenol A₉ (最終濃度 10 μM) またはコントロールとして 0.1% DMSO を含む培地で 3 時間培養後、遠心して細胞を集めた。次に、細胞を PBS (-) で洗浄し、ApopLadder Ex (タカラバイオ) を用いて HL-60 細胞の DNA を抽出した。エチジウムブロマイドを含むアガロースゲル 3% (w/v) に、得られた DNA 試料をアプライして電気泳動後、ゲル撮影装置 (アトー) で UV を照射してバンドのパターンを確認した。

6. フローサイトメーターによる hypodiploid 細胞の定量

HL-60 細胞 (最終濃度 2.5 × 10⁵ cells/mL) をシャーレに播種し、hypsiziprenol A₉ (最終濃度 10 μM) を添加して 0–24 時間培養後、遠心して細胞を集めた。細胞を PBS (-) で洗浄後、氷冷した 70% エタノールを添加して細胞固定をおこなった。その後、細胞を PBS (-) で洗浄し、RNase A (Sigma) を添加して 37°C で 1 時間インキュベートした。さらに propidium iodide (Sigma-Aldrich) を添加し、4°C で 30 分間遮光して静置した。この細胞懸濁液をナイロンメッシュ (Becton, Dickinson and Company) に通し、フローサイトメーター Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) で DNA 含量と細胞数を測定し、細胞周期を解析

して G₁/G₀ 期 (2N) よりも DNA 含量の少ない hypodiploid 細胞の割合を求めた。

7. カスパーゼの活性評価

HL-60 細胞 (最終濃度 2.5×10^5 cells/mL) をシャーレに播種し, hypsiziprenol A₉ (最終濃度 10, 20 μ M) またはコントロールとして 0.1% DMSO を含む培地で 4 時間培養後, 遠心して細胞を集めた。細胞内のカスパーゼ-2, -3, -8, -9 の活性は ApoAlert Caspase Profiling Plate (タカラバイオ) を用いて測定した。各カスパーゼの基質が固定された 96 穴プレートに細胞溶解液を添加して 37°C で反応させた。2 時間後, 蛍光測定用プレートリーダーを用いて酵素活性を測定した (励起/蛍光 = 355/460 nm)。また, 各細胞溶解液のタンパク質を Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology) で定量し, タンパク質量あたりのカスパーゼの活性を算出した。

8. ミトコンドリア膜電位の測定

HL-60 細胞 (最終濃度 2.5×10^5 cells/mL) を 24 穴プレート (Corning) に播種し, hypsiziprenol A₉ (最終濃度 10, 20 μ M) ならびにコントロールとして 0.1% DMSO を含む培地で, 4 時間培養後, 遠心して細胞をマイクロテストチューブに移した。次に, Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Cayman Chemical Company) を用いて細胞を蛍光色素 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) で染色後, 96 穴プレート (Corning) に播種し, 蛍光プレートリーダーで赤色蛍光 (励起/蛍光 = 540/590 nm) と緑色蛍光 (励起/蛍光 = 485/535 nm) を測定した。陽性コントロールとして, プロトン濃度勾配を減少させて膜電位を低下させる脱共役剤 carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma, 最終濃度 100 μ M) を用いた。また, 同様の操作にて HL-60 細胞を JC-1 で染色後, 96 穴プレート (Corning) に播種し, 蛍光顕微鏡 (オリンパス) で観察した (励起/蛍光 = 460–490/515–550 nm)。

実験結果および考察

1. 種々の培養がん細胞に対する増殖抑制作用

種々のがん細胞の培養液に hypsiziprenol A₉ を添加して増殖に及ぼす影響について検討した。その結果, HL-60 細胞の増殖が最も強く抑制され, その IC₅₀ は 9 μ M であった (表 1)。この結果から, hypsiziprenol A₉ のアポトーシス誘導作用のメカニズム解析には, hypsiziprenol A₉ に対して最も感受性が高かった HL-60 細胞を用いた。また, その他の培養がん細胞も hypsiziprenol A₉ によって増殖が抑制され, IC₅₀ は 13–19 μ M であった。

2. 核染色による核断片化の観察

hypsiziprenol A₉ を HL-60 細胞培養液に添加して経時的に位相差顕微鏡下で観察すると, 4 時間目に細胞膜に包まれた大小の細胞の断片化を特徴とするアポトーシス小体

表 1 hypsiziprenol A₉ による種々の培養がん細胞の増殖抑制作用

ヒト由来がん細胞株	IC ₅₀ (μ M)
HL-60	9
Jurkat	13
HCT116	18
HT-29	19

各がん細胞株 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 5–20 μ M) で 24 時間処理後に生細胞の増殖能を WST-1 法で評価した (測定/対照 = 450/650 nm)。コントロールの吸光度を 100% として, 各濃度の hypsiziprenol A₉ で処理した時の増殖能を算出し, 増殖が 50% 抑制される濃度 (IC₅₀) を求めた (n=4)。

の形成が確認された (データ省略)。そこで Hoechst 33342 で染色した HL-60 細胞の核を蛍光顕微鏡下で観察した結果, コントロール (0.1% DMSO) の細胞像には変化は認められなかったが, hypsiziprenol A₉ を添加した場合はアポトーシスの形態学的な特徴の一つである細胞核の断片化が認められた (図 2)。

3. アガロースゲル電気泳動による DNA 断片の検出

アポトーシスの最終段階は, 細胞内で誘導されるエンドヌクレアーゼによる 180–200 bp スクレオソーム単位での DNA の断片化である。hypsiziprenol A₉ のアポトーシス誘導作用を確認するため, hypsiziprenol A₉ を添加した HL-60 細胞から DNA を抽出し, アガロースゲル電気泳動をおこなった。図 3 に示すように, hypsiziprenol A₉ で処理した細胞では, スクレオソーム単位での DNA の断片化と考えられる複数のバンドが検出された。この結果から hypsiziprenol A₉ によってアポトーシスの特徴的な現象である DNA の断片化が引き起こされたと考えられた。

4. フローサイトメーターによる hypodiploid 細胞の定量

hypsiziprenol A₉ を添加した HL-60 細胞の核を染色し, フローサイトメーターを用いて hypodiploid 細胞を定量することで, hypsiziprenol A₉ の経時的なアポトーシス誘導を評価した。その結果, hypodiploid 細胞が hypsiziprenol A₉ 添加後 2 時間目に認められ, 以後経時的に増加していくことが示された (図 4)。

hypsiziprenol A₉ が細胞周期に与える影響に関しては, 培養肝がん細胞 (HepG2) の細胞周期を G₁ 期で停止させて増殖を抑制するという報告⁹⁾ もあるが, HL-60 細胞においてはそのような現象は見られず, 短時間で hypodiploid 細胞が増加し, アポトーシスが引き起こされた。したがって, hypsiziprenol A₉ の作用機構は細胞の種類によって異なる可能性も考えられる。

5. カスパーゼの活性評価

カスパーゼはアポトーシスの誘導に重要な働きを担うシ

図 2 hypsiziprenol A₉による核の形態変化

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 $20 \mu\text{M}$) で 4 時間処理後、核を蛍光試薬 Hoechst 33342 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した (励起/蛍光 = $330-385/420 \text{ nm}$)。

図 3 hypsiziprenol A₉による DNA 断片化 (アガロースゲル電気泳動)

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) で 3 時間処理後、DNA を抽出して、アガロースゲル電気泳動をおこなった。左から順に、マーカー、コントロール、hypsiziprenol A₉ の泳動パターンを示した。

ステインプロテアーゼであり、ヒトにおいては現在 12 種類のカパーゼの存在が確認されている。最近、新たにカパーゼが発見された報告¹¹⁾もあり、今後も種類が増えていく可能性がある。細胞内においてカパーゼは不活性な前駆体 (プロカパーゼ) として存在しており、一連のカパーゼ群が連鎖反動的に活性化されることによりアポトーシス誘導のシグナルが伝達されていく。このカパーゼカスケードと呼ばれる経路を介してアポトーシスを誘導する物質は多く知られているが、活性化されるカパーゼの種類や経路などは刺激する物質や細胞の種類によって異なると考えられている。そこで、hypsiziprenol A₉ がどのようなカパーゼの活性化を介してアポトーシスを誘導しているのかを解明するために、hypsiziprenol A₉ で処理し

図 4 hypsiziprenol A₉ による DNA 断片化の経時的変化 (フローサイトメトリー)

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 $10 \mu\text{M}$) で 0-24 時間処理後、propidium iodide で染色し、フローサイトメーターで測定した。グラフの縦軸は細胞数、横軸は DNA 含量を示した。

た HL-60 細胞内のカパーゼ-2, -3, -8, -9 の活性を測定した。その結果、hypsiziprenol A₉ が濃度依存的に各カパーゼの活性を高めていることが明らかとなった (図 5)。本実験で活性を測定した 4 種類のカパーゼのうち、カパーゼ-2, -8, -9 はシグナル伝達経路の上流位置でアポトーシスの誘導に関わるイニシエーター型カパーゼである。カパーゼ-2 は DNA 損傷のシグナルに関わるカパーゼカスケードの上流に位置し、ミトコンドリアからの cytochrome *c* の遊離を誘導するという報告¹²⁾もある。カパーゼ-8 は細胞表面にある Fas や tumor necrosis factor receptor (TNFR) などのデスレセプター分子が外からのシグナルを受けて細胞内に伝達するカスケードに関連している。カパーゼ-9 はミトコンドリアの下流に位置していることが知られており、ミトコンドリアから遊離した cytochrome *c* は Apaf-1 およびプロカパーゼ-9 と結合す

図 5 hypsiziprenol A₉ によるカスパーゼ活性変化

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 0–20 μM) で 4 時間処理後、細胞を溶解し、細胞内のカスパーゼ -2, -3, -8, -9 の活性を測定した (励起/蛍光 = 355/460 nm). グラフの値は平均値 ± 標準偏差を示した (n=4).

(A)

(B)

図 6 hypsiziprenol A₉ によるミトコンドリア膜電位の変化

(A) 蛍光強度比 (JC-1 染色)

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 0, 10, 20 μM) で 4 時間処理後、JC-1 で染色し蛍光プレートリーダーで赤色蛍光 (励起/蛍光 = 540/590 nm) と緑色蛍光 (励起/蛍光 = 485/535 nm) を測定した. 陽性コントロールとして脱共役剤 CCCP (最終濃度 100 μM) を用いた. グラフの値は平均値 ± 標準偏差を示した (n=4).

(B) 蛍光顕微鏡写真 (JC-1 染色)

HL-60 細胞 (2.5×10^5 cells/mL) を hypsiziprenol A₉ (最終濃度 0, 10, 20 μM) で 4 時間処理後、JC-1 で染色し蛍光顕微鏡で観察した (励起/蛍光 = 460–490/515–550 nm). 陽性コントロールとして脱共役剤 CCCP (最終濃度 100 μM) を用いた. 左から順番に (a) コントロール (b) 10 μM hypsiziprenol A₉, (c) 20 μM hypsiziprenol A₉, (d) 100 μM CCCP を示した.

ることにより apoptosome を形成してカスパーゼ 9 を活性化する。

カスパーゼ-3 はカスパーゼ-8 やカスパーゼ-9 のイニシエーター型カスパーゼなどによって活性化され、エフェクター型カスパーゼとして poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) や inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) などを分解してアポトーシスを引き起こす。

その他に細胞の小胞体ストレス応答の場合にもアポトーシスが誘導され、カスパーゼ-9 やカスパーゼ-3 が関連しているカスケードが存在することが分かっている。また、イニシエーター型カスパーゼを介さずに直接エフェクター型カスパーゼ-3 などを活性化するカスケードが存在することも明らかになっている。このようにカスパーゼカスケードは非常に複雑であり、未だに不明な部分もあるが、hypsiziprenol A₉ によるカスパーゼ-2, -8, -9 の活性化を受けて、下流に位置するカスパーゼ-3 が活性化されてアポトーシスが誘導された可能性があると考えられた。

6. ミトコンドリア膜電位の測定

hypsiziprenol A₉ で処理した HL-60 細胞を蛍光試薬 JC-1 で染色し、ミトコンドリアの膜電位の変化について評価した。膜電位の高い生細胞の場合は、ミトコンドリアに取り込まれて凝集した JC-1 が赤色蛍光を発し、膜電位が低下した場合は、ミトコンドリアに取り込まれず細胞質中においてモノマー状で緑色蛍光を発する。その結果、図 6 (A) に示すように、コントロールの HL-60 細胞と比較して、hypsiziprenol A₉ で処理した細胞においては、緑色/赤色の蛍光強度比が hypsiziprenol A₉ の濃度に依存して高くなり、ミトコンドリアの膜電位が低下していることが示された。また、染色した細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、コントロールの細胞では赤色の発色が観察されたのに対して、hypsiziprenol A₉ または陽性コントロールの CCCP で処理した細胞では明らかに緑色の発色が観察された (図 6 (B))。ミトコンドリアの膜電位低下はミトコンドリアから細胞質へ cytochrome c などのタンパク質を遊離させ、前述したようにカスパーゼ-9 を活性化することが知られている。したがって、hypsiziprenol A₉ は HL-60 細胞に対してミトコンドリアの膜電位の低下を引き起こし、それが刺激となってカスパーゼ-9 とその下流のカスパーゼ-3 が活性化される経路を介してアポトーシスを誘導することが示唆された。

キノコ類に含まれるビタミン D₂ (ergocalciferol) は細胞内の活性酸素種の発生とミトコンドリアの膜電位の低下を介してアポトーシスを誘導するという報告がある¹³⁾。hypsiziprenol A₉ の場合、抗酸化物質の N-acetylcysteine や活性酸素種を分解する superoxide dismutase, catalase を添加してもアポトーシス誘導を妨げなかったことから、ミトコンドリアの膜電位低下には酸化ストレスの関与は低いと考えられた (データ省略)。

これまでにブナシメジの抗腫瘍成分としては多糖類などの高分子成分の報告があるが、担がん動物への腹腔内投与では強い効果を示すものの経口投与ではその作用は弱い⁵⁾。我々はブナシメジには高分子成分以外の抗腫瘍成分があると仮定し、培養がん細胞の増殖抑制作用を指標に低分子成分の hypsiziprenol A₉ を単離した。事実、がん細胞を移植したマウスにブナシメジから精製した hypsiziprenol A₉ を強制経口投与したところ、腫瘍の増殖が強く抑制された (データ省略)。ブナシメジの抗腫瘍作用を明らかにする上で、今後さらにブナシメジ特有の抗腫瘍成分である hypsiziprenol A₉ のアポトーシス誘導作用の詳細なメカニズム解析を進めていく必要がある。

要 約

ブナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) の酢酸エチル抽出物には強い抗腫瘍作用があり、培養がん細胞にアポトーシスを誘導すること、その活性成分はブナシメジに特有のポリテルペン (hypsiziprenol A₉) であることをこれまでに明らかにしてきた。

今回、我々は hypsiziprenol A₉ の抗腫瘍作用をさらに解明するためにアポトーシス誘導作用について詳細な検討をおこなった。

hypsiziprenol A₉ は種々の培養がん細胞の増殖を強く抑制した。hypsiziprenol A₉ を HL-60 (ヒト前骨髄性白血病細胞) に添加して 4 時間培養すると核の断片化が観察された。また、アガロースゲル電気泳動によって DNA ラダーが検出され、フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析によって経時的な hypodiploid 細胞の増加が認められた。続いて、カスパーゼの活性を評価したところ hypsiziprenol A₉ によって濃度依存的なカスパーゼ-2, -3, -8, -9 の活性化が認められた。さらに、hypsiziprenol A₉ で処理した HL-60 細胞において、ミトコンドリアの膜電位の低下が認められた。

以上の結果から、hypsiziprenol A₉ はミトコンドリア膜電位の低下とカスパーゼの活性化を介して HL-60 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかとなった。

文 献

- 1) 斎藤英晴, 馮威 健, 松沢恒友, 池川哲郎, *Hypsizigus marmoreus* の抗腫瘍活性 (第 2 報) Lewis 肺癌転移抑制効果, 薬誌, **117**, 1006-1010 (1997).
- 2) Yasukawa, K., Aoki, T., Takido, M., Ikekawa, T., Saito, H. and Matsuzawa, T., Inhibitory Effects of Ergosterol Isolated from the Edible Mushroom *Hypsizigus marmoreus* on TPA-induced Inflammatory Ear Oedema and Tumor Promotion in Mice. *Phytother. Res.*, **8**, 10-13 (1994).
- 3) 大槻 誠, 梅下和彦, 苔庵泰志, 西井孝文, 坂倉 元, 柳田晃良, 久松 眞, 古市幸生, C57BL/6J マウス脂質代謝に及ぼすブナシメジの効果, 食科工, **54**, 167-172 (2007).
- 4) Yoshino, K., Nishimura, M., Watanabe, A. and Sano, M., Preventive Effects of Edible Mushroom (*Hypsizigus*

- marmoreus*) on Mouse Type IV Allergy : Fluctuations of Cytokine Levels and Antioxidant Activities in Mouse Sera. *J. Food Sci.*, **73** (3), 21–25 (2008).
- 5) Ikekawa, T., Saitoh, H., Feng, W., Zhang, H., Li, L. and Matsuzawa, T., Antitumor Activity of *Hypsizigus marmoreus*. I. Antitumor Activity of Extracts and Polysaccharides. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1954–1957 (1992).
- 6) 水谷滋利, 河合高志, 榎 竜嗣, 佐川裕章, 嶋中一夫, 酒井武, 加藤郁之進, プナシメジ (*Hypsizigus marmoreus*) から分離されたテルペンの腫瘍成長抑制作用, 食科工, **53**, 55–61 (2006).
- 7) Sawabe, A., Morita, M., Ouchi, S. and Okamoto, T., Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry and Linked Scan Analyses at Constant B/E in the Structural Characterization of New Polyisoprenepolyols Isolated from an Edible Mushroom (*Hypsizigus marmoreus*). *J. Mass Spectrom.*, **31**, 921–925 (1996).
- 8) Sawabe, A., Morita, M., Kiso, T., Kishine, H., Ohtsubo, Y., Ouchi, S. and Okamoto, T., Structural Analyses of a Precursory Substance of Bitterness : New Polyisoprenepolyols Isolated from an Edible Mushroom (*Hypsizigus marmoreus*) by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **47** (2), 588–593 (1999).
- 9) Chang, J.S., Son, J.K., Li, G., Oh, E.J., Kim, J.Y., Park, S. H., Bae, J.T., Kim, H.J., Lee, I.S., Kim, O.M., Kozukue, N., Han, J.S., Hirose, M. and Lee, K.R., Inhibition of Cell Cycle Progression on HepG2 Cells by Hypsiziprenol A₉, Isolated from *Hypsizigus marmoreus*. *Cancer Lett.*, **212**, 7–14 (2004).
- 10) Akihisa, T., Franzblau, S.G., Tokuda, H., Tagata, M., Ukiya, M., Matsuzawa, T., Metori, K., Kimura, Y., Suzuki T. and Yasukawa, K., Antitubercular Activity and Inhibitory Effect on Epstein-Barr Virus Activation of Sterols and Polyisoprenepolyols from an Edible Mushroom, *Hypsizigus marmoreus*. *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1117–1119 (2005).
- 11) Eckhart, L., Ballaun, C., Hermann, M., VandeBerg, J.L., Sipos, W., Uthman, A., Fischer, H. and Tschachler, E., Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 831–841 (2008).
- 12) Lassus, P., Opitz-Araya, X. and Lazebnik, Y., Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science*, **297**, 1352–1354 (2002).
- 13) Chen, W.J., Huang, Y.T., Wu, M.L., Huang, T.C., Ho, C.T. and Pan, M.H., Induction of Apoptosis by Vitamin D₂, Ergocalciferol, via Reactive Oxygen Species Generation, Glutathione Depletion, and Caspase Activation in Human Leukemia Cells. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 2996–3005 (2008).
- (平成 20 年 6 月 30 日受付, 平成 20 年 9 月 3 日受理)