ニガウリのがん細胞アポトーシス誘導効果

江藤公美*・岩下恵子**・武井利之***・八巻幸二**・篠原和毅**・小堀真珠子**[§]

Bitter Gourd Induces Apoptosis in Cancer Cell Lines

Satomi ETOH*, Keiko IWASHITA**, Toshiyuki TAKEI***, Kohji YAMAKI**, Kazuki SHINOHARA**
and Masuko KOBORI**[§]

**Ei-cho, 2830, Makinouchi, Ei-cho, Ibusuki-gun, Kagoshima 891-0792*

***National Food Research Institute, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8642*

****Fukushima Prefectural Forest Research Center, 1 Nishishimazaka Narita, Asaka-machi, Koriyama, Fukushima 963-0112*

The vegetables produced in Ei-cho were extracted with ethanol and the inhibitory effects of the ethanol extracts on the growth of HL60 human leukemia cells were examined. We extracted 5 vegetables (carrot, Welsh onion (2 varieties), Chinese radish, bitter gourd and cabbage) and 4 varieties of sweet potato. Among the extracts, the bitter gourd extract was the most effective inhibitor of the HL60 cell growth. The ethanol extract of bitter gourd induced the apoptotic cell bodies and oligonucleosomal DNA fragmentation in HL60 cells. The results indicated that the ethanol extract of bitter gourd induced apoptosis in HL60 cells. The ethanol extract also induced apoptosis in B16 mouse melanoma 4A5 cells. The ethanol extract of bitter gourd was dissolved in hot water and partitioned with ethyl acetate. The ethyl acetate fraction that induced apoptosis in HL60 cells was further fractionated by OASIS HLB column chromatography. Both of the fractions that eluted with 20~40% and 60~80% ethanol induced apoptosis in HL60 cells. The results showed that more than 2 components contained in the bitter gourd extract induced apoptosis in HL60 cells.

(Received Oct. 25, 2001 ; Accepted Jan. 10, 2002)

鹿児島県頴娃町では、農業を基幹産業としており、温暖な気候を生かして、茶、サツマイモ及び野菜類の生産を行っている。

食品の第三次機能としての体調調節機能が注目されて以来、茶及び野菜類においては、抗酸化作用、がん細胞分化誘導作用及び抗プロモーション作用等、がんの抑制に関わる様々な作用を示すことが明らかになっている^{1)~8)}。さらに、茶においては、マウスにおける前立腺がんの抑制効果等も明らかになっており、また緑黄色野菜では、疫学研究結果ががんの抑制効果を示している⁹⁾¹⁰⁾。このように動物実験及び疫学研究の結果からも、茶及び

野菜類のがん抑制効果が期待できる。一方、サツマイモにおいては、メラニン生成抑制効果等の生理的機能を示すことが明らかになっている¹¹⁾。

このような食品の生理的機能の解明が進むなかで、生産現場においても高い機能性を有する農産物の生産促進を望む声が高まってきており、各農産物についてのさらなる機能性の解明が期待されている。

そこで、頴娃町産の野菜類5種6品種及びサツマイモ4品種について、そのがん抑制効果を解明するため、がん細胞であるHL60ヒト白血病細胞の増殖に及ぼす影響を検討した結果、ニガウリの抽出物が最も高い増殖抑制

* 頴娃町町役場 (〒891-0792 鹿児島県揖宿郡頴娃町牧の内 2830 番地)

** 独立行政法人食品総合研究所 (〒305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12)

*** 福島県林業研究センター (〒963-0112 福島県郡山市安積町成田字西島坂 1 番地)

[§] 連絡先 (Corresponding author) kobori@nfri.affrc.go.jp

効果を示した。またニガウリ抽出物は、HL60細胞及びB16マウスメラノーマ細胞に、重要ながん抑制機構の一つであるアポトーシスを誘導することが明らかになったので、ここに報告する。

実験方法

1. 農産物抽出物の調製

鹿児島県姶良町にて生産されたニンジン (*carrot* : *Daucus carrot* L.) (品種：向陽二号)、ネギ (*Welsh onion* : *Allium fistulosum* L.) (品種：長悦 (白ネギ)、九条 (葉ネギ))、ダイコン (*Chinese radish* : *Raphanus sativus* L.) (品種：白秋)、ニガウリ (ツルレイシ : *bitter melon* : *Momordica charantia* L.) (品種：太レイシ)、キャベツ (*cabbage* : *Brassica oleracea* L.) (品種：金春) 及びサツマイモ (*sweet potato* : *Ipomoea batatas* Poir.) (品種：高系14号、アヤマラサキ、シンエイムラサキ及びジェイレッド) よりエタノール抽出物を調製した。ニンジン及びダイコンでは、根茎 (rhizomes) 及び葉 (leaves) を用いてそれぞれの抽出物を調製し、その他の農産物では可食部を用いた。

各エタノール抽出物は、農産物試料にエタノールを加えてミキサーでホモジナイズし、室温にて一晩浸漬した後、吸引濾過した濾液をエバポレーターで濃縮乾固して調製した。

2. 供試細胞及び培養条件

HL60 ヒト白血病細胞 (JCRB0085) は国立衛生試験所細胞バンク (現ヒューマンサイエンス研究資源バンク) より分譲された。また、B16 マウスメラノーマ 4A5 細胞 (RCB557) は理化学研究所細胞銀行より分譲された。BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞は、J. Yuan 博士より譲渡された。

HL60細胞、B16細胞及びBALB/c 3T3細胞は、それぞれ10%ウシ胎児血清を含むRPMI1640培地、DMEM培地 (低グルコース) 及びDMEM培地 (高グルコース) (Invitrogen) を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下、相対湿度100%の条件下で培養した。

3. 増殖阻害試験

各農産物のエタノール抽出物がHL60細胞の増殖に及ぼす影響は、HL60細胞を24穴プレートに 2×10^5 cells/ml になるように播種し、各抽出物を培養液中に添加して24時間培養した後、トリパンブルー色素排除能を示す生細胞数を、血球計算盤を用いて測定することにより検討した。

ニガウリのエタノール抽出物がHL60細胞の増殖に及

ぼす影響は、ニガウリ抽出物を培養液中に添加して培養し、12、24、48及び72時間後の生細胞数を測定することにより検討した。また、ニガウリ抽出物のB16細胞及びBALB/c 3T3細胞の増殖に及ぼす影響は、細胞を24穴プレートに 1×10^5 cells/ml になるように播種し、24時間培養してプレート底面に接着させ、ニガウリ抽出物を培養液中に添加して、さらに24時間培養した後の生細胞数を測定することにより検討した。

HL60細胞、B16細胞及びBALB/c 3T3細胞の生細胞数は、それぞれ3点測定し、平均値及び標準偏差を各図に示した。

4. アポトーシス誘導試験

ニガウリエタノール抽出物及びニガウリ抽出物を分画して得た画分のアポトーシス誘導効果は、HL60細胞あるいはB16細胞に各画分を添加し、24時間後にアポトーシスに特徴的なDNAのヌクレオゾーム単位での断片化を検出することにより、検討した。

DNAの断片化の測定にあたり、細胞は20μlの溶解液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA, 0.5% SDS) に溶解し、1μlのRNase (10 mg/ml 溶解液) (SIGMA) を加えて50°Cで30分間インキュベートした後、さらに1μlのProteinase K (10 mg/ml 溶解液) (SIGMA) を加えて50°Cで60分間インキュベートした。その後、細胞溶解液を、0.5μg/mlのethidium bromide (和光純薬) を含んだ2%アガロースゲルで電気泳動し、UVイルミネーター上でDNAの断片化を観察した。

この他、HL60細胞においては、ニガウリ抽出物添加24時間後の細胞について、顕微鏡下でアポトーシス小体の形成を観察した。

また、B16細胞においては、ニガウリ抽出物添加24時間後の細胞について、ヘキスト33258 (和光純薬) で核DNAを蛍光染色し、顕微鏡下でアポトーシスに特徴的な核の凝縮及び断片化を観察した。

5. ニガウリエタノール抽出物の分画

ニガウリエタノール抽出物66.8gは500mlの熱水に溶解し、分液ロート中で1.2lの酢酸エチルと懸濁した後、静置して完全に2層に分離した。分配して得られた水可溶画分及び酢酸エチル画分のうち、アポトーシス誘導効果を示した酢酸エチル画分20mgをOASIS HLBカラム (カラム体積1 ml, Waters) にアプライして、0 (水)、20、40、60、80及び100%エタノールで段階的に溶出し、それぞれの画分を得た。

Fig. 1 Effect of the vegetable extracts on the growth of HL60 human leukemia cells

HL60 cells were incubated with the vegetable extracts (□, 50 µg/ml; ▒, 100 µg/ml; ■, 200 µg/ml) for 24 h. Viable cells were counted with a hemocytometer by trypan blue exclusion (n=3). Standard deviations are shown as vertical bars.

実験結果

1. 類娃町産農産物の HL60 細胞増殖抑制効果

類娃町産農産物として、ニンジン (carrot) (根茎: rhizomes), ニンジン (葉: leaves), ネギ (Welsh onion) (白ネギ (Kujo)), ネギ (葉ネギ (Choetsu)), ダイコン (Chinese radish) (根茎: rhizomes), ダイコン (葉: leaves), ニガウリ (bitter gourd) 及びキャベツ (cabbage) の 5 種の野菜類より調製した 8 種のエタノール抽出物と, 4 品種のサツマイモ (sweet potato) のエタノール抽出物について, HL60 ヒト白血病細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果, ニガウリエタノール抽出物が, 添加 24 時間後の HL60 細胞の生細胞数を 100 µg/ml の濃度で約 55%, 200 µg/ml の濃度で約 40% と, 濃度依存的に最も強く抑制した (Fig. 1)。

そこで, ニガウリ抽出物の HL60 細胞増殖抑制効果を明らかにするため, ニガウリ抽出物添加後 12~72 時間の HL60 細胞の生細胞数を測定した結果, ニガウリ抽出物は 50~200 µg/ml の濃度で HL60 細胞の増殖を明らかに抑制し, 生細胞数を減少させた (Fig. 2a)。

2. ニガウリエタノール抽出物の HL60 細胞アポトーシス誘導効果

ニガウリエタノール抽出物を添加して 24 時間後の

HL60 細胞について, 顕微鏡下でその形態を観察した結果, 細胞が断片化して生じるアポトーシス小体が高い割合で観察された (Fig. 2c)。このことから, ニガウリの HL60 細胞増殖抑制効果は, ニガウリ抽出物が HL60 細胞のアポトーシスを誘導したためであることが示唆された。そこで, ニガウリ抽出物添加 24 時間後の HL60 細胞を溶解し, アガロース電気泳動を行って, アポトーシスに特徴的な DNA の断片化を観察した。

その結果, ニガウリ抽出物は, 50~200 µg/ml の濃度で HL60 細胞に, アポトーシスに特徴的なヌクレオゾム単位での DNA の断片化を誘導した (Fig. 2b)。以上の結果から, ニガウリ抽出物は, HL60 細胞にアポトーシスを誘導することにより, 増殖を抑制することが明らかになった。

3. ニガウリエタノール抽出物の B16 細胞アポトーシス誘導効果

B16 細胞は転移性が高く, 悪性のがんであるメラノーマ由来の細胞株である。ニガウリ抽出物が異なるがん細胞に及ぼす影響を検討するため, HL60 白血病細胞に続いて B16 マウスメラノーマ細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果, ニガウリ抽出物は HL60 細胞においてより高濃度の 200~400 µg/ml の濃度で B16 細胞の増殖を抑制した (Fig. 3a)。そこで, 次にニガウリ抽出物

Fig. 2 Inhibition of the cell growth and induction of the apoptosis in HL60 cells by the bitter melon extract

(a) HL60 cells were incubated with the bitter melon extract (●, none; ▲, 50 μ g/ml; ■, 100 μ g/ml; ◆, 200 μ g/ml) for 12, 24, 48 and 72 h. Viable cells were counted with a hemocytometer by trypan blue exclusion ($n=3$). Standard deviations are shown as vertical bars.

(b) Analysis of DNA fragmentation patterns by agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from the HL60 cells treated with the bitter melon extract (A, none; B, 50 μ g/ml; C, 100 μ g/ml; D, 200 μ g/ml) for 24 h.

(c) Induction of the apoptotic cell bodies by the bitter melon extract. HL60 cells were treated with the bitter melon extract for 24 h. A, control cells; B, HL60 cells treated with 200 μ g/ml bitter melon extract.

の B16 細胞のアポトーシス誘導効果を検討した結果、ニガウリ抽出物添加 24 時間後に 300 及び 400 μ g/ml の濃度で、アポトーシスに特徴的な DNA の断片化を誘導することが明らかになった (Fig. 3b)。また、ニガウリ抽出

物添加 24 時間後の B16 細胞の核 DNA を蛍光染色して観察した結果、ニガウリ抽出物は B16 細胞にアポトーシスに特徴的な核の断片化を誘導することが明らかになった (Fig. 3c)。

Fig. 3 Inhibition of the cell growth and induction of the apoptosis in B16 mouse melanoma cells by the bitter melon extract

(a) B16 cells were incubated with the extract of bitter melon for 24 h. Viable cells were counted with a hemocytometer by trypan blue exclusion ($n=3$). Standard deviations are shown as vertical bars.

(b) Analysis of DNA fragmentation patterns by agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from the B16 cells treated with the bitter melon extract (A, none; B, 100 $\mu\text{g/ml}$; C, 200 $\mu\text{g/ml}$; D, 300 $\mu\text{g/ml}$; E, 400 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h.

(c) Induction of nuclear fragmentation by the bitter melon extract. B16 cells were treated with the bitter melon extract for 24 h. A, control cells; B, B16 cells treated with 400 $\mu\text{g/ml}$ bitter melon extract.

これらのことから、ニガウリ抽出物は、HL60細胞においてより高い濃度が必要ではあるが、B16細胞においてもアポトーシスを誘導することにより、増殖を抑制することが明らかになった。

4. ニガウリエタノール抽出物の BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の増殖に及ぼす影響

次に、ニガウリ抽出物が正常細胞由来の細胞株である BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。300 及び 400 $\mu\text{g/ml}$ のニガウリ抽出物を添加

Fig. 4 Effect of the bitter melon extract on the growth of BALB/c 3T3 mouse fibroblast cells

BALB/c 3T3 cells were incubated with the extract of bitter melon for 24 h. Viable cells were counted with a hemocytometer by trypan blue exclusion ($n=3$). Standard deviations are shown as vertical bars.

して 24 時間後の生細胞数は、それぞれ、コントロールの約 100% 及び 80% であり、これらの濃度のニガウリ抽出物は HL60 細胞及び B16 細胞において明らかにアポトーシスを誘導したが、BALB/c 3T3 細胞においては殆ど増殖を抑制しなかった (Fig. 4)。

5. ニガウリ抽出物からの HL60 細胞アポトーシス誘導効果を示す画分の分離

ニガウリ抽出物が、がん細胞である HL60 細胞及び B16 細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになったので、ニガウリエタノール抽出物より HL60 細胞アポトーシス誘導効果を示す画分の分離を試みた。ニガウリエタノール抽出物を熱水に溶解し、酢酸エチルと分配することにより、水可溶画分及び酢酸エチル画分を得、それぞれのアポトーシス誘導効果を DNA の断片化を指標として測定した結果、酢酸エチル画分は HL60 細胞のアポトーシスを誘導したが、水可溶画分はアポトーシスを誘導しなかった。

そこで、さらにニガウリ酢酸エチル画分を OASIS HLB カラムを用いて 0 (水)、20, 40, 60, 80 及び 100% エタノール溶出画分に分離し、それぞれ 50 μg/ml の濃度

Fig. 5 Induction of DNA fragmentation by the bitter melon fractions after the OASIS HLB column chromatography

DNA was extracted from the HL60 cells treated with or without (A, control cells) 50 μg/ml bitter melon fractions eluted with ethanol (B, 0% ethanol (water); C, 20% ethanol; D, 40% ethanol; E, 60% ethanol; F, 80% ethanol; G, 100% ethanol) for 24 h.

で HL60 細胞の培地に添加した結果、40% 及び 80% エタノール溶出画分が HL60 細胞にアポトーシスに特徴的な DNA の断片化を誘導することが明らかになった (Fig. 5)。また、顕微鏡下で観察した結果、40% 及び 80% エタノール溶出画分で処理した細胞ではアポトーシス小体の形成が認められ、これらの画分がアポトーシスを誘導することが明らかになった。このことから、ニガウリでは性質の異なる複数の成分がアポトーシス誘導効果を示すことが明らかになった。アポトーシス誘導効果を示した 40% 及び 80% エタノール溶出画分画分の収量は、ニガウリ 100 g 当たり、それぞれ 4 mg 及び 1.7 mg であった。

考 察

細胞膜が破壊され、炎症を引き起こすネクロシスとは異なり、細胞にアポトーシスが誘導された場合には、核におけるクロマチンの凝集、核や DNA の断片化及び細胞の断片化によるアポトーシス小体の形成がみられ、断片化した細胞は他の細胞に貪食されることによって除

去される。がん細胞では多くの場合、アポトーシスの誘導に関わる分子に異常が生じており、がん細胞のアポトーシス誘導効果は、重要ながんの抑制機構であると考えられている。

6 種 10 品種の類娃町産農産物から調製した 12 の異なるエタノール抽出物について検討した結果、ニガウリ抽出物が最も高い割合で HL60 ヒト白血病細胞の増殖を抑制し、さらに HL60 細胞及び B16 メラノーマ細胞のアポトーシスを誘導したことは、ニガウリ抽出物ががん細胞のアポトーシスを誘導することによって、がんの抑制効果を示すことを示唆している。ニガウリ抽出物は、HL60 細胞及び B16 細胞にアポトーシスを誘導する 300 及び 400 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において、正常細胞由来の BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞の増殖は殆ど抑制しなかった。また、アポトーシス誘導効果を示す画分の分離を行うことにより、ニガウリ抽出物中の複数の成分がニガウリ抽出物のアポトーシス誘導効果に貢献していることも明らかになった。ニガウリは中国、日本、東南アジア及びインド等で食されており、薬用にも供されている¹²⁾。これまでに抗変異原性を示すことが明らかになっており、アポトーシス誘導効果と合わせて、抗がん効果が期待できる¹³⁾。この他、ニガウリは糖尿病において、グルコース合成阻害等を介して血糖値の上昇を抑制する効果を示すことが、ラットを用いた実験等から明らかになっている^{14) 15)}。更にニガウリの種に含まれるタンパク質である momordin (MAP30: Momordica anti-HIV protein of 30KD) は、HIV ウイルスの感染を抑制し、また感染した細胞に選択的に毒性を示す等の抑制効果を示すことが明らかになっており、種の有効活用も可能と考えられる^{16) 17)}。このように、既にいくつかの異なる観点からその生理的機能が着目されているニガウリについて、今回、新たにがん細胞アポトーシス誘導効果が見いだされたことは、高機能農産物の生産を目指す上でも意味深い結果であるといえる。

要 約

6 種 10 品種の類娃町産農産物から調製した 12 の異なるエタノール抽出物について、HL60 ヒト白血病細胞の増殖に及ぼす影響を検討した結果、ニガウリ抽出物が最も高い割合で HL60 ヒト白血病細胞の増殖を抑制した。

ニガウリエタノール抽出物は、HL60 細胞にアポトーシスに特徴的な DNA の断片化及びアポトーシス小体の形成を誘導した。このことから、ニガウリが HL60 細胞

のアポトーシスを誘導することが明らかになった。

またニガウリ抽出物は、HL60 細胞とは異なる性質を持つがん細胞の B16 マウスメラノーマ細胞においても、アポトーシスを誘導した。

ニガウリエタノール抽出物より、HL60 細胞のアポトーシス誘導効果を示す画分を分離した結果、アポトーシス誘導効果を示す複数の画分の存在が確認され、ニガウリ抽出物に含まれるアポトーシス誘導効果を示す成分が複数存在することが明らかになった。

文 献

- 1) 津志田藤二郎・鈴木雅博・黒木征吉：日食工誌，**41**，611 (1994)。
- 2) KUMAMOTO, M. and SONDA, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 175 (1998)。
- 3) KOBORI, M. and SHINOHARA, K.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1951 (1993)。
- 4) KOBORI, M., MIYAMA, Y., TSUSHIDA, T., SHINMOTO, H. and SHINOHARA, K.: *Thai J. Pharm. Sci.*, **17**, 175 (1993)。
- 5) KOBORI, M., MIYAMA, Y., TSUSHIDA, T., SHINMOTO, H. and SHINOHARA, K.: *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, 61 (1995)。
- 6) 小清水弘一：化学と生物，**29**，598 (1991)。
- 7) 馬場紀子・新本洋士・小堀真珠子・津志田藤二郎：食科工，**43**，622 (1996)。
- 8) 篠原和毅：食科工，**47**，399 (2000)。
- 9) GUPTA, S., HASTAK, K., AHMAD, N., LEWIN, J.S. and MUKHTAR, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 1035 (2001)。
- 10) HIRAYAMA, T.: *Nutr. Cancer*, **1**, 67 (1979)。
- 11) 下園英俊・小堀真珠子・新本洋士・津志田藤二郎：食科工，**43**，313 (1996)。
- 12) SCARTEZZINI, P. and SPERONI, E.: *J. Ethnopharmacol.*, **71**, 23 (2000)。
- 13) GUEVARA, A.P., LIM-SYLIANCO, C., DAYRIT, F. and FINCH, P.: *Mutat. Res.*, **230**, 121 (1990)。
- 14) SHIBIB, B.A., KHAN, L.A. and RAHMAN, R.: *Biochem. J.*, **292**, 267 (1993)。
- 15) VIKRANT, V., GROVER, J.K., TANDON, N., RATHI, S.S. and GUPTA, N.: *J. Ethnopharmacol.*, **76**, 139 (2001)。
- 16) BOURINBAIAR, A.S. and LEE-HUANG, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 923 (1996)。
- 17) LEE-HUANG, S., HUANG, P.L., NARA, P.L., CHEN, H.-C., KUNG, H., HUANG, P., HUANG, H.I. and HUANG, P.L.: *FEBS Lett.*, **272**, 12 (1990)。

(平成 13 年 10 月 25 日受付，平成 14 年 1 月 10 日受理)