

<b>Title</b>	(1'-S)-Acetoxychavicol acetate およびその光学異性体とシスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について
<b>Author</b>	徐, 聖輝 / 湯浅(小島), 明子 / 東, 秀紀 / 湯浅, 勲
<b>Citation</b>	生活科学研究誌. 7 卷, p.13-20.
<b>Issue Date</b>	2009-03
<b>ISSN</b>	1348-6926
<b>Type</b>	Departmental Bulletin Paper
<b>Textversion</b>	Publisher
<b>Publisher</b>	『生活科学研究誌』編集委員会

# (1'-S)- Acetoxychavicol acetate およびその光学異性体とシスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について

徐 聖輝\*<sup>1</sup>、湯浅(小島) 明子\*<sup>1</sup>、東 秀紀\*<sup>2</sup>、湯浅 勲\*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup>大阪市立大学大学院生活科学研究科

\*<sup>2</sup>大阪市立大学大学院工学研究科

## (1'-S)-Acetoxychavicol Acetate and its Enantiomer Enhances the Cytotoxic Activity of Cisplatin in Ehrlich Ascites Tumor Cells

Shenghui XU \*<sup>1</sup>, Akiko KOJIMA-YUASA \*<sup>1</sup>, Hideki AZUMA \*<sup>2</sup> and Isao MATSUI-YUASA \*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Graduate School of Human Life Sciences, Osaka City University

\*<sup>2</sup> Graduate School of Engineering, Osaka City University

### Summary

We previously reported that (1'-S)-1'-acetoxychavicol acetate ((S)-ACA), obtained from rhizomes and seeds of South East Asia plants, increases the death of tumor cell via the reduction of the intracellular glutathione (GSH). Cisplatin has been widely used as a chemotherapeutic drug for a variety of malignancies. To harness more effective anticarcinogenic effects from cisplatin, a high concentration is necessary as it is exported as GSH conjugate out of tumor cells by the GS-X pump. However, such a high concentration of cisplatin causes toxic side effects such as nephrotoxicity as well as ear and digestive organs trouble. We therefore investigated the effects of cisplatin and the naturally obtained (S)-ACA and its enantiomer (R)-ACA on cell death of tumor cells.

Results obtained showed that the cytotoxic activity of cisplatin was enhanced after the addition of (S)-ACA or (R)-ACA, and the combination of cisplatin and (S)-ACA or (R)-ACA caused a stronger anticancer effect than cisplatin alone.

Furthermore, the synergistic effects between cisplatin and (S)-ACA or (R)-ACA were almost similar, suggesting that racemic ACA is useful for the synergic anticancer effect of cisplatin and ACA.

**Keywords** : 相乗効果 *synergistic effect*、細胞生存率 *Cell viability*、細胞増殖能 *cell proliferation*、グルタチオン *glutathione*、ACA *1'-Acetoxychavicol acetate*

### I. 諸言

食品は抗ガン作用、抗酸化作用、免疫強化作用、血圧やコレステロール低下作用などの様々な生理作用を有することから、食品成分による疾病予防や病態改善効果についての研究が数多く報告されている<sup>1-9)</sup>。近年、タイにおける消化器系ガンの発生率が、他のアジアや欧米諸国に比べて半数以下であることが疫学的調査によって報告され<sup>10)</sup>、タイの食生活との関連性が示唆されている。東南アジア原産の植物性食物であるショウガ科のナンキョウ

ウ (学名: *Alpinia galanga*) は、タイの伝統料理であるトムヤムクンの香辛料として使用されている。そこで、ナンキョウの抗ガン作用について調べられたところ、ナンキョウの根茎から単離された (1'-S)-1'-acetoxychavicol acetate ((S)-ACA) は、化学発ガンの実験において、マウスの皮膚<sup>11,12)</sup>、ラットの口腔<sup>13)</sup>、食道<sup>14)</sup>、結腸<sup>15,16)</sup>、ハムスターの胆管<sup>17)</sup>における腫瘍形成を予防または抑制することが報告された。さらに、そのメカニズムとして、キサンチンオキシダーゼ活性を阻害すること<sup>13)</sup>、一酸化窒素 (NO)<sup>18)</sup> や活性酸素種の産生<sup>11)</sup> を抑制することが明

らかにされている。一方、我々はマウス由来エールリッヒ腹水ガン細胞 (EATC) を用いて、(S)-ACAはEATCのアポトーシス細胞死を誘導すること、そのメカニズムとして、チロシンリン酸化の亢進や細胞内SH化合物の減少<sup>19)</sup>、ポリアミンの代謝やcaspase-3活性の亢進<sup>20)</sup>が関与することをすでに報告した。さらに、(S)-ACAによる細胞内グルタチオン (GSH) 量の低下作用は、GSHの消費量の増加やGSHの細胞外への漏出ではなく、グルタチオンレダクターゼ (GR) およびグルタチオンシンターゼ (GS) の阻害によってGSHの供給量が低下したことに起因することを報告している<sup>21)</sup>。

ACAには、天然型の(S)-ACAとその光学異性体である(R)-ACAがある。ACAは合成することが可能であり、ラセミ体ACAからリパーゼを用いて光学分割することによって、(S)-ACAおよび(R)-ACAを得ることができる<sup>22)</sup>。我々は、合成された(S)-ACAおよび(R)-ACAを用いてガン細胞増殖抑制作用について調べたところ、(S)-ACAは細胞周期をG1期で停止させること、その作用メカニズムとして、細胞周期の調節因子であるRetinoblastoma (Rb)タンパク質およびその上流で働くp27<sup>kip1</sup>タンパク質の低リン酸化を維持することが明らかとなった。一方、(R)-ACAは、Rbタンパク質およびp27<sup>kip1</sup>タンパク質のリン酸化を誘導することによって細胞周期をG2/M期で停止させることが明らかとなった。また、(S)-ACAの投与によってp27<sup>kip1</sup>タンパク質が低リン酸化を維持することはGSHと関与していることも報告している<sup>23,24)</sup>。

シスプラチンは抗ガン剤の一種であり、様々な化学療法で使用されている。近年、ガン治療において細胞内GSH量を調節することが重要視されている。すなわち、細胞内GSH量を低下させたガン細胞に抗ガン剤を投与すると、より少ない投与量で抗ガン剤の効果が発揮することが可能となることが数多く報告されている<sup>25-28)</sup>。また、細胞内GSH量の枯渇剤であるbuthionie sulfoximine (BSO; 0.5mM)をシスプラチン(25 μM, 50 μM)とともにヒト肝ガン細胞 (HepG2細胞)に添加すると、細胞生存率が有意に低下することが報告されている<sup>25)</sup>。しかし、シスプラチンは臨床応用で一般的に体表面積 (cm<sup>2</sup>)あたり15~20 mgの濃度で投与される<sup>38)</sup>ため、より低い濃度での相乗効果が期待される。これらのことから、細胞内GSH量と抗ガン効果との関係が示唆されるため、細胞内GSH量を顕著に低下させるACAは、BSOの代わりにより低濃度の抗ガン剤と併用することによって、より強力な抗ガン効果を期待することができる。そこで本研究では、(S)-ACAおよびその光学異性体である(R)-

ACAを用いて、シスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について検討した。

## II. 実験方法

### 1 試料

(S)-ACAおよび(R)-ACA (Fig. 1) は、ラセミ体ACAからリパーゼを用いて光学分割した<sup>22)</sup>。

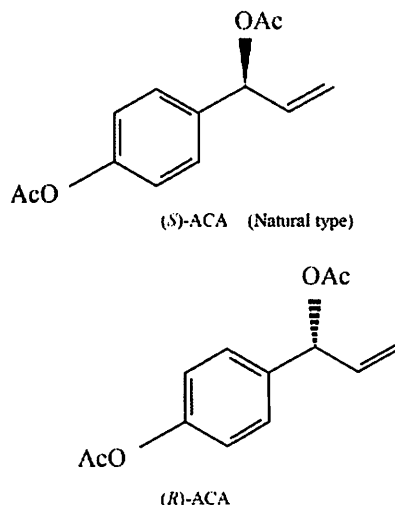


Fig. 1. Structure of (S)-ACA or (R)-ACA

### 2 細胞培養

#### a) ガン細胞

ガン細胞として、マウス由来エールリッヒ腹水ガン細胞 (EATC) を用いた。

EATCは10%牛胎児血清 (FBS) を含むEagle's essential medium (MEM) 培地で37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3~4日間培養した後、細胞数を1.0x10<sup>6</sup> cells/mlになるように調整した。本培養として、10% FBSを含むMEM培地に試料を添加して0~24時間培養後、実験に供した。

(S)-ACA、(R)-ACAまたはシスプラチンは、DMSOに溶解した。(S)-ACAまたは(R)-ACAの添加濃度は0~40 μMとした。一方、シスプラチンの添加濃度は0~2.5 μMとした。また、シスプラチンは(S)-ACAまたは(R)-ACAを添加してから1時間後に添加した。コントロール群にはDMSOを添加し、培地中でのDMSOの最終濃度が0.25%以下になるようにした。

#### b) 正常細胞

正常細胞としてラット初代分離肝細胞 (hepatocytes) を用いた。

肝細胞 (hepatocytes) はwistar系雄性ラット(300~350 g 体重)の肝臓をcollagenase灌流法によって分離し

た後、低速遠心によって分離した<sup>29)</sup>。直径35 mm プラスチックシャーレに2.5 x 10<sup>5</sup> cells/ml になるように細胞を調整し、10% 牛胎児血清 (FBS) を含む Williams' E 培地で24 時間前培養を行った後、本培養として試料を添加して24 時間培養を行った。

### 3 細胞生存率の測定

ガン細胞において細胞生存率の測定は Trypan-blue 法を用いた。細胞生存率は全細胞数における生細胞の割合として計算した。

正常細胞の細胞生存率の測定は Neutral Red<sup>30)</sup> 法を用いた。本培養終了後、Neutral Red 色素液を添加して、2 時間培養した。1% ホルムアルデヒド-1% 塩化カルシウム溶液で洗浄した後、脱色液として1% 酢酸-50% エタノール溶液を添加した。室温で30分放置後、吸光度計 (BECKMAN COULTER DU530) によって波長540nm における吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール群の値を100%とし、コントロールに対する割合で求めた。

### 4 細胞内 GSH 量の測定

細胞内 GSH 量の測定は Sack らの方法<sup>31)</sup> に一部改良を加えて行った。

本培養終了後、細胞を回収し、25 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を700  $\mu$ l 加え、超音波によって細胞膜を破壊した。遠心分離した後、上清480  $\mu$ l に500  $\mu$ l の 0.56 N Borate buffer (pH 10.4) と 73  $\mu$ l の o-phthalaldehyde (OPA) 溶液 (10 mg/ml) を加え、HPLC (日本分光製) を用いて測定した。

HPLC による測定は、ODS-II (4.6 x 150 mm, particle size 5  $\mu$ m, Shimadzu Technoresearch, Kyoto Japan) カラムと蛍光検出器 (励起波長: 230 nm, 吸光波長: 445 nm) を用いた。また、タンパク質の定量は Bradford 法<sup>32)</sup> を用いた。

### 5 有意差検定

有意差検定には分散分析およびポストホックテストとして Tukey 法を使用し、有意水準は5%および1%とした。

## III. 実験結果

### 1 ガン細胞の細胞生存率および細胞増殖能におよぼす (S)-ACA または (R)-ACA の影響

EATC の細胞生存率におよぼす (S)-ACA または (R)-ACA の影響を検討したところ、それぞれ20  $\mu$ M 以上の

濃度では、細胞生存率を有意に低下させたが、10  $\mu$ M の濃度では (R)-ACA を添加した場合のみ細胞生存率の低下が観察された (Fig. 2)。一方、細胞増殖能の指標として生細胞数を調べたところ、それぞれ20  $\mu$ M 以上の濃度では、細胞増殖能を有意に低下させた。しかしながら、10  $\mu$ M の (R)-ACA を添加すると、若干の細胞増殖能の低下傾向が観察されたが、(S)-ACA または (R)-ACA 添加群とコントロール群との間には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

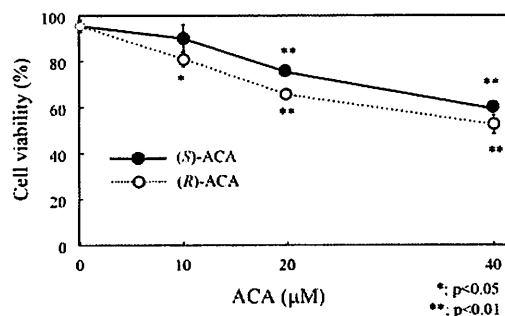


Fig. 2. Effect of (S)-ACA or (R)-ACA on cell viability in EATC Cells were incubated with 10, 20 or 40  $\mu$ M (S)-ACA or (R)-ACA for 24 hours. After incubation, cell viability was assayed by Trypan-blue exclusion as described in materials and methods. Results are means  $\pm$  S.D. from three experiments.

\*; p<0.05, \*\*; p<0.01 compared to cells untreated with (S)-ACA and (R)-ACA.

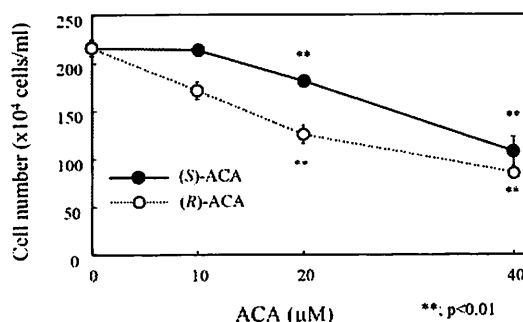


Fig. 3. Effect of (S)-ACA or (R)-ACA on cell number in EATC Cells were incubated with 10, 20 or 40  $\mu$ M (S)-ACA or (R)-ACA for 24 hours. After incubation, cell viability was assayed by Trypan blue exclusion as described in materials and methods. Results are means  $\pm$  S.D. from three experiments.

\*\*; p<0.01 compared to cells untreated with (S)-ACA and (R)-ACA.

### 2 ガン細胞の細胞内 GSH 量におよぼす (S)-ACA または (R)-ACA の影響

細胞内 GSH 量におよぼす (S)-ACA または (R)-ACA の影響について調べたところ、(S)-ACA または (R)-ACA の添加によって細胞内 GSH は、有意に減少した。また、その減少は濃度依存的であった。10  $\mu$ M の濃度におい

ても、(S)-ACA または (R)-ACA 添加群において、細胞内 GSH 量の減少傾向あるいは減少が認められた。特に、(R)-ACA 添加群とコントロール群との間に有意差が認められた (Fig. 4)。

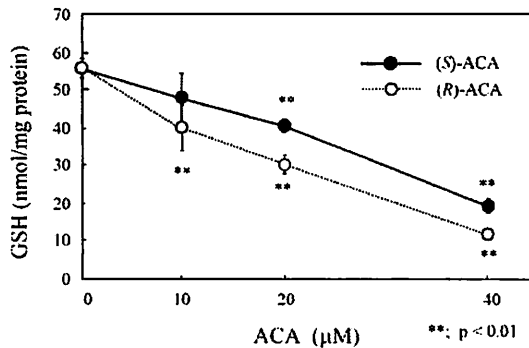


Fig. 4. Dose-dependent effect of (S)-ACA or (R)-ACA on intracellular GSH levels in EATC  
Cells were incubated with 10, 20 or 40 μM (S)-ACA or (R)-ACA for 15 minutes. After incubation, cells were collected by centrifuge and lysed by supersonic wave. The cell lysates were centrifuged at 15,000 rpm for 25 minutes and the supernatants were used for GSH analysis. Cellular GSH were analyzed by HPLC. Results are means ± SD from three experiments. \*\*; p<0.01 compared to cells untreated with (S)-ACA and (R)-ACA

### 3 ガン細胞の細胞生存率におよぼすシスプラチンの影響

EATCの細胞生存率におよぼすシスプラチンの影響について検討したところ、シスプラチンの添加濃度が2.5 μMの場合でも、細胞生存率はほとんど変化しなかった (Fig. 5)。

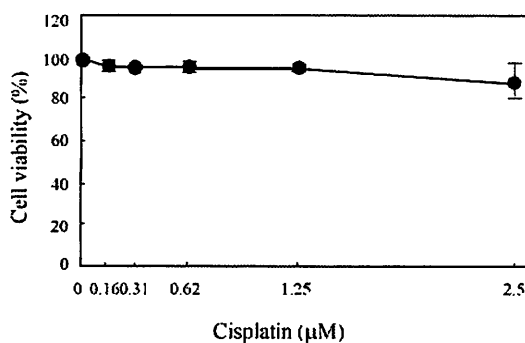


Fig. 5. Effect of cisplatin on cell viability in EATC  
Cells were incubated with 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 or 2.5 μM cisplatin for 24 hours. After incubation, cell viability was assayed by Trypan blue exclusion as described in materials and methods. Results are means ± S.D. from three experiments.

### 4 (S)-ACAまたは(R)-ACAとシスプラチンの同時添加によるガン細胞の細胞生存率におよぼす影響

シスプラチンは、ガン細胞内に存在するGSHによって抱合され、細胞外に排泄される。そのため、抗ガン作用を高めるためには、より高濃度のシスプラチンの投与が必要となる。その結果、副作用として、腎毒性、耳毒性や消化器障害を誘導することが知られている<sup>33,34)</sup>。したがって、細胞内GSH量を有効に低下させる成分との併用は、シスプラチンの抗ガン作用効果を高め、またその副作用の緩和に繋がることを示唆される。

そこで、細胞内GSH量を有意に低下させた10 μMの(S)-ACAまたは(R)-ACAを用いて、単独では全く細胞生存率に影響をおよぼさない濃度である0.31 μMのシスプラチンを添加したときの細胞生存率を測定したところ、それぞれの単独投与群では、96.69% または 94.87%でコントロール群との差は認められなかったにもかかわらず、(S)-ACA または (R)-ACAとシスプラチンを併用することによって、77.69% または 68.34%で細胞生存率は有意に低下した (Fig. 6)。

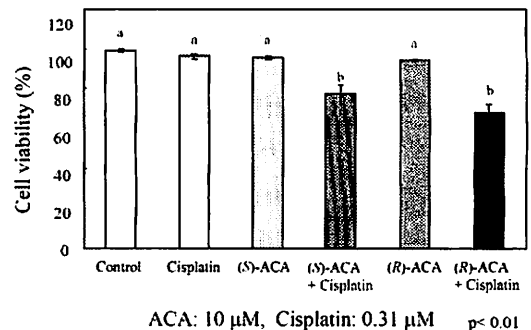


Fig. 6. Effect of cisplatin on cell viability in (S)-ACA or (R)-ACA-treated EATC  
Cells were incubated with DMSO or 10 μM (S)-ACA or 10 μM (R)-ACA plus 0.31 μM cisplatin for 24 hours. After incubation, cell viability was assayed by Trypan-blue exclusion. Results are means ± SD from three experiments. Data not sharing common alphabet are significantly different (p<0.01) using Fisher's test. \*\*; p<0.01 compared to cells untreated with cisplatin.

### 5 (S)-ACA、(R)-ACAまたはシスプラチンの単独および同時添加による正常細胞 (hepatocytes)の細胞生存率におよぼす影響

EATC細胞で相乗効果がみられた10 μMの(S)-ACAまたは(R)-ACAとシスプラチンを正常細胞であるhepatocytesに同時添加して細胞生存率を測定したところ、細胞生存率が低下しなかったため、細胞障害を与えないことが考えられる (Fig. 7)。

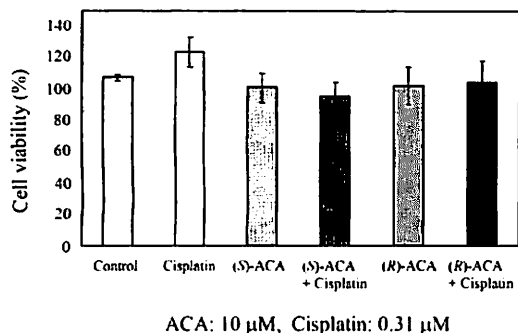


Fig. 7. Effect of cisplatin on cell viability in (S)-ACA or (R)-ACA-treated hepatocytes  
Cells were incubated with DMSO or 10 μM (S)-ACA or 10 μM (R)-ACA plus 0.31 μM cisplatin for 24 hours. After incubation, cell viability was determined by Neutral Red assay. Results are means ± SD from three experiments.

#### IV. 考 察

細胞内で生体外異物や毒物の代謝を担っている酵素の一つであるグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) は、異物や毒物をグルタチオン抱合し、GS-X pumpによって細胞外へ排出できる形にする。このグルタチオン抱合さらに細胞外への排出という一連の作用が、ガン細胞、特に抗ガン剤に耐性のあるガン細胞では発達していることが示唆されており、化学療法によるガン治療において非常に問題視されている<sup>26-28,35-37</sup>。また、GSHのシステインに含まれるSH基は化学反応性が強いので、シスプラチンやカルボプラチンなどの白金製剤の活性部分と反応して、これらの抗ガン剤の殺細胞作用を不活性化させる可能性がある<sup>36</sup>。そのため、抗ガン作用を高めるためには、より高濃度のシスプラチンの投与が必要となる。その結果、副作用として、腎毒性、耳毒性や消化器障害を誘導することが知られている<sup>33,34</sup>。

グルタチオンは細胞内では還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (グルタチオンジスルフィド; GSSG) の状態で存在しており、多くの細胞内で、GSHとして存在している<sup>35</sup>。その主な役割は、細胞内酸化還元状態の維持<sup>38</sup>、生体外異物や毒物の代謝<sup>25</sup>、細胞増殖の調節<sup>39</sup>、細胞死の調節<sup>36</sup> などさまざまな役割を担っている。細胞内酸化還元状態の維持に重要な酵素はグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) であり、この酵素によって、細胞内の過酸化水素やフリーラジカルは代謝され、その際、GSHは酸化を受けてGSSGとなる。GSSGはグルタチオンレダクターゼ (GR) の働きにより、もとのGSHに還元される。細胞内GSH量は、GRによる還元作用と、グルタチオンシンテターゼ (GS) およびGSH合成の律速酵素であるγ-グルタミルシステインシンテターゼ (γ-ECS) による合成によって維持されてい

る。

我々はすでに、(S)-ACAはGSとGRを阻害することによって、GSHの供給を低下させ、EATCをアポトーシス細胞死に誘導することを明らかにしている<sup>21</sup>。さらに、本研究において、我々は、(S)-ACAの光学異性体である(R)-ACAも細胞内GSH量を低下させることを見出した。しかしながら、(R)-ACAによる細胞内GSH量の低下作用の機序については今後の検討課題である。

近年、ガン治療において細胞内GSH量を調節することが重要視されている。すなわち、細胞内GSH量を低下させたガン細胞に抗ガン剤を投与すると、より少ない投与量で抗ガン剤の効果が発揮することが可能となることが数多く報告されている<sup>25-28</sup>。すなわち、細胞内GSH量と抗ガン効果との関係が示唆されることから、細胞内GSH量を顕著に低下させるACAは、抗ガン剤と併用することによって、より強力な抗ガン効果を期待することができると考えられるため、本研究では、(S)-ACAおよび(R)-ACAを用いて、シスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について検討した。その結果、天然型の(S)-ACAのみならず、その光学異性体の(R)-ACAにおいても、シスプラチンを併用することによって抗ガン作用の相乗効果を有することが明らかとなった。このことは、安価で合成することができる(S)-ACAおよび(R)-ACAの混合物であるラセミ体ACAでもこの効果が期待することができることが明らかとなった。

一方、シスプラチンは臨床応用で一般的に体表面積 (cm<sup>2</sup>) あたり15~20 mgの濃度で投与される<sup>34</sup>。よって、体重50 Kg、身長156 cmの人に対する投与量は、17.9 μM~23.8 μMになる。本研究では、(S)-ACAまたは(R)-ACAと併用することによってシスプラチンの濃度が0.31 μMという非常に低濃度であっても正常の細胞に障害を与えることなく顕著な抗ガン作用を有することが示唆された。

#### 要 約

(S)-ACAまたは(R)-ACAとシスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について調べたところ、以下のことが明らかになった。

1. (S)-ACAまたは(R)-ACAとシスプラチンを併用すると、ガン細胞の細胞生存率は、それぞれ単独添加した場合よりも、強い抗ガン効果を示した。
2. シスプラチンの有効濃度は0.31 μMであり、臨床で通常用いられている濃度 (17.9 μM~23.8 μM) に比べて1/50以上の低い濃度でも有効であることが示された。

3. (S)-ACA も (R)-ACA も同様な効果が認められたことから、安価で合成可能なラセミ体 ACA を利用できることが明らかとなった。

### 引用文献

- 1) 西野輔翼編：『がん抑制の食品事典』法研，東京，234-253 (2003)
- 2) Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T. Hatano, T., Okuda, H. and Arichi, S.: Studies on the activities of tannins and related-compounds from medicinal plants and drugs. 1. Inhibitory effects on lipid-peroxidation in mitochondria and microsomes of liver, *Chem. Pharm Bull.*, 31: 1625-1631 (1983)
- 3) Agarwal, R., Katiyar, SK., Zaidi, SIA. and Mukhtar, H.: Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithinedecarboxylase in senear mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives, *Cancer Res.*, 52: 3582-3588 (1992)
- 4) Cao, YH. and Cao, RH.: Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature.*, 398: 381 (1999)
- 5) Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Beneli, R. and Albini, A.: Tumor invasion, molecular shears blunted by green tea, *Nature Medicine.*, 5: 1216 (1999)
- 6) Kojima, A., Jin, J., Kennedy, DO. and Matsui-Yuasa I.: Green tea extract inhibits angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells through reduction of expression of VEGF receptors, *Life Sciences.*, 73: 1299-1313 (2003)
- 7) Kametani, S., Oikawa, T., Kojima, A., Kennedy, DO., Norikura, T., Honzawa, M. and Matsui-Yuasa I.: Mechanism of growth inhibitory effect of Cape Aloe Extract in Ehrlich Ascites Tumor Cell, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 1220-1229 (2007)
- 8) Huang, X., Kojima, A., Xu, S., Norikura, T., Kennedy, DO., Hasuma, T. and Matsui?Yuasa, I.: Green tea extract enhances the selective cytotoxic activity of Zizyphus jujuba extracts in HepG2 cells, *AM. J. Chin. Med.*, 36: 729-744 (2008)
- 9) 松村敬一郎編：『茶の科学』朝倉書店，東京，154-167 (1991)
- 10) 資料 WHO [World Health Statistics Annual] (1996-1999)
- 11) Nakamura, Y., Murakami, A., Ohto, Y., Torikai, K., Tanaka, T. and Ohigashi H.: Suppression of tumor promoter-induced oxidative stress and inflammatory responses in mouse skin by a superoxide generation inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate, *Cancer Res.*, 58: 4832-4839 (1998)
- 12) Murakami, A., Ohura, S., Nakamura, Y., Koshimizu, K. and Ohigashi, H.: 1' -Acetoxychavicol acetate, a superoxide anion generation inhibitor, potently inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in ICR mouse skin, *Oncology.*, 53: 386-391 (1996)
- 13) Ohnishi, M., Tanaka, T., Makita, H., Kawamori, T., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Murakami, A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K.: Chemopreventive effect of a xanthine oxidase inhibitor 1'-acetoxychavicol acetate, on rat oral carcinogenesis, *Jpn. J. Cancer Res.*, 87: 349-356 (1996)
- 14) Kawabata, K., Tanaka, T., Yamamoto, T., Ushida, J., Hara, A., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H., Stoner, GD. and Mori H.: Suppression of N-nitrosomethyl-benzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis by dietary feeding of 1'-acetoxych-avicol acetate, *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 148-155 (2000)
- 15) Tanaka, T., Kawabata, K., Kakumoto, M., Makita, H., Matsunaga, K., Mori, H., Satoh, K., Hara, A., Murakami, A., Koshimizu, K. and Ohigashi H.: Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by a xanthine oxidase inhibitor, 1'-acetoxychavicol acetate, *Jpn. J. Cancer Res.*, 88: 821-830 (1997)
- 16) Tanaka, T., Makita, H., Kawamori, T., Kawabata, K., Mori, H., Murakami, A., Satoh, K., Hara, A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K.: A xanthine oxidase inhibitor 1'-acetoxych-avicol acetate inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats, *Carcinogenesis.*, 18: 1113-1118 (1997)
- 17) Miyauchi, M., Nishikawa, A., Furukawa, F., Nakamura, H., Son, HY., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. and Hirose, M.: Inhibitory effects of 1'-acetoxychavicol acetate on N-Nitrosobis(2-oxopropyl)-amine-induced initiation of cholangiocarcinogenesis in Syrian hamsters, *Jpn. J. Cancer Res.*, 91: 477-481 (2000)
- 18) Ohata, T., Fukuda, K., Murakami, A., Ohigashi, H.,

- Sugimura, T. and Wakabayashi, K.: Inhibition by 1'-acetoxychavicol acetate of lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced nitric oxide production through suppression of inducible nitric oxide synthase gene expression in RAW264 cells, *Carcinogenesis*, 19: 1007-1012 (1998)
- 19) Moffatt, J., Kennedy, DO., Kojima, A., Hasuma, T., Yano, Y., Otani, S., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. and Matsui-Yuasa I.: Involvement of protein tyrosine phosphorylation and reduction of cellular sulfhydryl groups in cell death induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells, *Chem.-Biol. Interact.*, 139: 215-230 (2002)
- 20) Moffatt, J., Hashimoto, M., Kojima, A., Kennedy, DO., Murakami, A., Koshimizu, K., Ohigashi, H. and Matsui-Yuasa I.: Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation, *Carcinogenesis*, 21: 2151-2157 (2000)
- 21) Higashida, M., Xu, S., Kojima, A., Kennedy, DO., Murakami, A., Ohigashi, H. and Matsui-Yuasa, I.: 1'-Acetoxychavicol acetate-induced cytotoxicity is accompanied by a rapid and drastic modulation of glutathione metabolism, *Amino Acids*, (in print)
- 22) Azuma, H., Miyasaka, K., Yokotani, T., Tachibana, T., Kojima, A., Matsui-Yuasa I. and Ogino, K.: Lipase-catalyzed preparation of optically active 1'-acetoxychavicol acetates and their structure-activity relationships in apoptotic activity against human leukemia HL-60 cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 14: 1811-1818 (2006)
- 23) Unahara, Y., Kojima, A., Higashida, M., Kennedy, DO., Murakami, A., Ohigashi, H. and Matsui-Yuasa I.: Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of p27kip1 translocation and retinoblastoma protein phosphorylation by 1'-acetoxychavicol acetate, *Amino Acids*, 33: 469-476 (2007)
- 24) Xu, S., Kojima, A., Azuma, H., Huang, X., Norikura, T., Kennedy, DO. and Matsui-Yuasa, I.: (1' S)-Acetoxychavicol acetate and its enantiomer inhibit tumor cells proliferation via different mechanisms, *Chem.-Biol. Interact.*, 172: 216-223 (2008)
- 25) Zhang, K., Chew, M., Yang, EB., Wong, KP. and Mack, P.: Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms, *Mol. Pharmacol.*, 59: 837-843 (2001)
- 26) Sadzuka, Y., Sugiyama, T., Suzuki, T. and Sonobe, T.: Enhancement of the activity of doxorubicin by inhibition of glutamate transporter, *Toxicol. Lett.*, 23: 159-167 (2001)
- 27) Sugiyama, T. and Sadzuka, Y.: Theanine and glutamate transporter inhibitors enhance the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1653: 47-59 (2003)
- 28) Perez, RP.: Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *Eur. J. Cancer*, 34: 1535-1542 (1998)
- 29) 中村敏一: 『初代培養肝細胞実験法』学会出版センター, 東京, (1987)
- 30) Hansen, MB., Nielsen, SE. and Berg, K.: Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell-growth cell kill, *J. Immunol. Methods*, 119: 203-210 (1989)
- 31) Sack, R., Willi, A. and Hunziker, PE.: Determination of total glutathione in cell lysates by high performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde precolumn derivatization in the presence of tris(2-carboxyethyl)-phosphine, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 23: 2947-2962 (2002)
- 32) Bradford, MM., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248-254 (1976)
- 33) 後藤稔, 三浦裕士編: 『最新 医学大辞典』医歯薬出版, 東京, 591 (1996)
- 34) 梅田悦生編: 『常用医薬品の副作用』南江堂, 東京, 152-153 (1996)
- 35) 坂本幸哉, 谷口直之, 東胤昭, 木村光編: 『グルタチオン研究のエポック』共立出版, 東京, 1405-1416 (1988)
- 36) Hall, AG.: Review: The role of glutathione in the regulation of apoptosis, *Eur. J. Clin. Invest.*, 29: 238-245 (1999)
- 37) Conklin, KA.: Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects, *Nutr. Cancer*, 37: 1-18 (2000)



- 38) 谷口直之、淀井淳司編：『酸化ストレス・レドックスの生化学』共立出版，東京，2-27 (2000)      increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration, FASEB. J., 15: 19-21 (2001)
- 39) Huang, Z.Z., Chen, C., Zeng, Z., Yang, H., Oh, J., Chen, L. and Lu, S.C.: Mechanism and significance of

---

## (1'-S)- Acetoxychavicol acetate およびその光学異性体とシスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について

徐 聖輝、湯浅(小島) 明子、東 秀紀、湯浅 勲

要旨：我々はすでに、東南アジア原産の植物性食物であるナンキョウに含まれている (1'-S)- 1'-acetoxychavicol acetate ((S)-ACA)が、細胞内グルタチオン (GSH) を減少させることによりガン細胞の細胞死を引き起こすことを報告している。一方、シスプラチンは抗ガン剤の一種であるが、GSH 抱合されGS-X pumpによって細胞外に放出されるため、より効果的な抗ガン作用を得るには、高濃度のシスプラチンが必要となるため、それにより起こる腎毒性、耳毒性、消化器障害などの副作用が問題になっている。そこで、本研究では光学異性体である(S)-ACAまたは(R)-ACAとシスプラチンの併用による抗ガン作用の相乗効果について検討した。その結果、シスプラチンを添加する1時間前に(S)-ACAまたは(R)-ACAを添加することによって、シスプラチンは単独添加時よりもより低濃度でガン細胞の生存率の低下およびガン細胞増殖抑制効果が誘導された。即ち、(S)-ACAまたは(R)-ACAを添加するとEATCの細胞内GSH量が低下し、シスプラチンがGSH抱合作用により細胞外に排出されることを抑制し、より低濃度でも強力な抗ガン効果が誘導されることが示唆された。また、(S)-ACAまたは(R)-ACAどちらにもシスプラチンとの併用による抗ガン作用の相乗効果を有することから、ACAとシスプラチンの併用による相乗効果にラセミ体を利用できることが明らかとなった。