

山芋抽出物がグリオブラストーマへ与える影響

笹沼 いづみ^{*1}, リュウ ピンフォア^{*1}

Effect of Yam extracts on glioblastoma cells

Izumi SASANUMA, Pin Hua LIEW

Glioblastoma is a fast-growing glioma that develops from star-shaped glial cells that support the health of the nerve cells within the brain. Although researches about glioblastoma are increasing, effective treatments have not yet been developed. We investigate the effects of diosgenin and its glycosides on glioblastoma cells. We find that diosgenin and its glycosides have different effects on glioblastoma cells based on their different mechanisms. Glioblastoma cells whose proliferation is arrested by the presence of yam extracts exhibit stimulation of autophagy, including protein hydrolysis. Remarkably, coreajaponin, which is a glycoside of diosgenin, induces cell differentiation. Key to the differentiation is the activation of β -glucosidase, a glycosidase that exist in lysosomes. Coreajaponin stimulates autophagy activity in glioblastoma cells by signaling pathway of TGF, a cytokine that blocks growth signals.

KEYWORDS: glioblastoma, Aromas, Autophagy.

1. 緒言

グリオブラストーマは脳の神経細胞を支える神経膠細胞が腫瘍化したもので、最も悪性である腫瘍の一種である。現在でも、5年生存率は10%ほどで、世界標準治療は、開頭手術で可能な限り摘出すると定められている。しかし、最善の治療法は確立されていない。

近年、治療が困難とされているがんにおいて細胞の機能を調節する天然物が注目されている。山芋サポニン¹は神経細胞の軸索の再生と伸展で機能し、脳機能・認知症の改善において薬理効果があることが知られている。山芋サポニンで主要な効果を示す化合物はジオスゲニン²であると考えられて来たが、実際のところは、その配糖体を含む化合物との混合物がより高い薬効を示す。

本研究では、山芋抽出物のステロイドサポニン及びその配糖体がグリオブラストーマに与える影響について検討した。

2. 材料及び方法

供試細胞：グリオブラストーマ (RBC2530)。

成分抽出：減圧蒸留で精製した。

グリオブラストーマの培養：FBS/DMEM/NEAAを用いて培養した。

細胞数の測定：MTT法で行った。

β -グルコシダーゼ (GBA) 活性：サリシンまたはX-Glcを基質として測定した。

プロテアーゼ活性：ゼラチンザイモグラムで検出した。

糖鎖の検出：PAS染色で検出した。

タンパク質の分析：SDS-PAGEで行った。

ジオスゲニン及びその配糖体の抽出：山芋を粉碎後、EtOH抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。

受容体の検出：フィルターリタゼーションアッセイで行った。また、受容体としての β -グルコシダーゼはELISA法で行った。

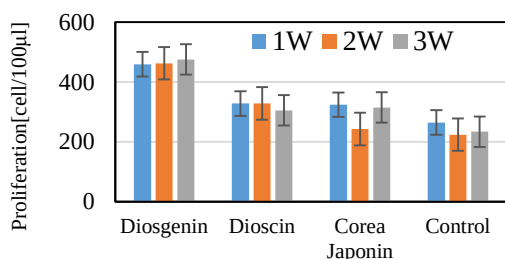
*1 物質工学科(Dept. of Materials Chemistry and Bioengineering), E-mail: sasaki@oyama-ct.ac.jp

3. 結果

3. 1 山芋の抽出物がグリオブラストーマに及ぼす影響

山芋抽出物がグリオブラストーマの増殖に与える影響を検討したところ、すべての培養で細胞数が増加した。コントロールでは培養に伴い細胞数が減少したが、ジオスゲニンではわずかな増加が認められた。ジオスシンではわずかに減少し、コリアジャポニンでは減少したあと増加した。(Fig. 1-A)。

A



B

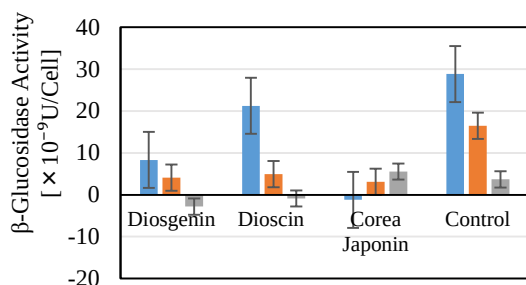


Fig. 1 Fig.1 The steroid saponins inhibits the proliferation of glioblastoma cells and alter the β -glucosidase activity. The steroid saponins added to glioblastoma cultures were diosgenin, dioscin and coreajaponin. A, Poliferatuion. B, β -glucosidase activity.

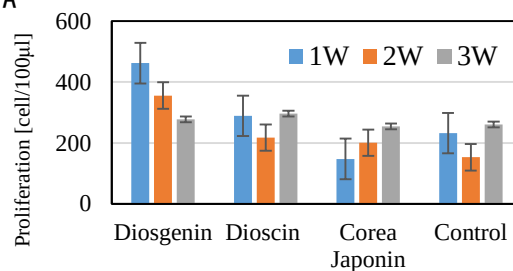
山芋抽出物がグリオブラストーマの β -グルコシダーゼ活性に与える影響を検討したところ、培養に伴い活性が増加するものはコリアジャポニンのみであった (Fig. 1-B)。

3. 2 山芋抽出物とレチノイン酸の相互作用がグリオブラストーマに与える影響

細胞数はジオスゲニンの培養で培養に伴い減

少した。ジオスシンでは、コントロールと同じように細胞数が減少したあと増加した。コリアジャポニンでは細胞数の増加が認められた。すべての培養の中で、最も細胞を減少させたものはジオスゲニンであった (Fig. 2-A)。

A



B

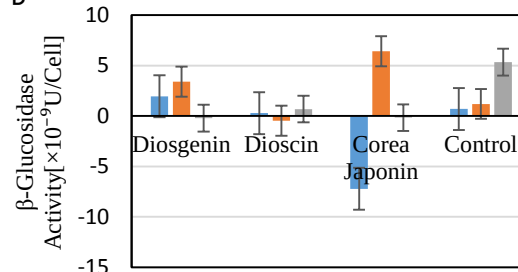


Fig. 2 The steroid saponins inhibits the proliferation of retinoic acid-conditioning glioblastoma cells and alter the β -glucosidase activity. The steroid saponins added to glioblastoma cultures were diosgenin, dioscin and coreajaponin. A, Poliferatuion. B, β -glucosidase activity.

β -グルコシダーゼ活性については、コントロールで培養に伴い活性が増加した。ジオスゲニンでは活性が増加したあと減少した。ジオスシンではわずかに減少したあと増加した。コリアジャポニンでは活性が増加したあと減少した。すべての培養の中で、最も β -グルコシダーゼ活性を上昇させたものは、コリアジャポニンであった (Fig. 2-B)。

3. 3 オートファジーに及ぼす影響

山芋の抽出物及びレチノイン酸を加えた培地で培養したグリオブラストーマ細胞の糖鎖の変化について検討した。レチノイン酸無しのコントロールと比較すると、コリアジャポニンを添加した培養は60, 180, 240kDaのタンパク質を始め多くのタンパク質が糖鎖化されている。ジオスシン、ジオスゲニンではこれらの糖鎖は分解されている。

レチノイン酸ありのコントロールにおいても多くのタンパク質が糖鎖化されている。ステロイドサポニンが添加されると糖鎖は分解されることが観察された。以上のことから、レチノイン酸とコリアジャポニン以外は糖鎖の分解を促進することが明らかになった (Fig. 3-A)。

プロテアーゼについては、三週目の培養で、全てのステロイドサポニンで活性化された (Fig. 3-B)。

すべての検体でオートファゴソーム形成活性が観察された。レチノイン酸あり (RA+) のジオスゲニンとレチノイン酸なし (RA-) のコリアジャポニンで、同じぐらいの強度であったが、コントロールでは、蛍光が観察されたが比較的活性が低かった (Fig. 3-C)。

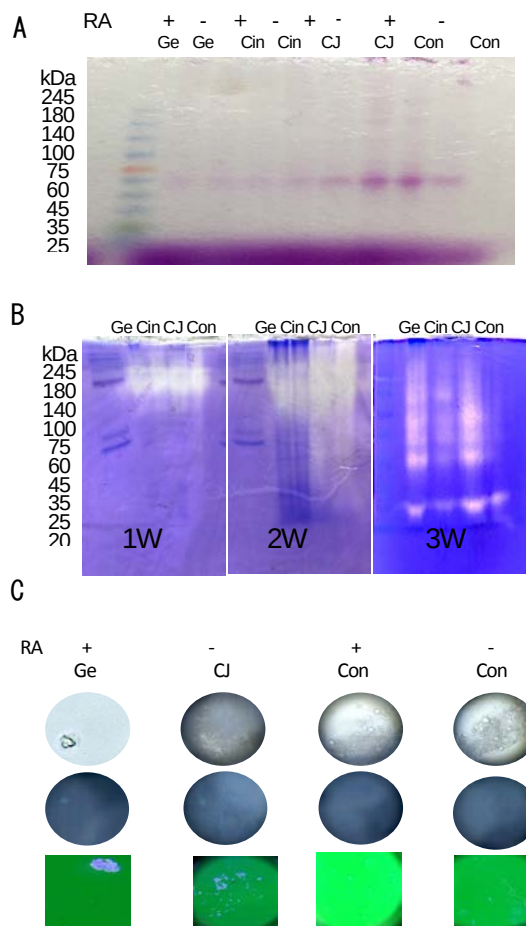


Fig. 3 The steroid saponins modulate autophagy activity. The steroid saponins added to glioblastoma cultures were diosgenin (Ge), dioscin (Cin) and coreajaponin(CJ). The indexes of the autophagy activity are glycosylation of proteins (A), proteinase activity (B) and autophagosome forming activity (C).

3. 4 ステロイドサポニン受容体の検出

一週目でジオスゲニンとコリアジャポニンが多くの受容体を活性化させた。二週目ではジオスゲニンとジオスシンが多くの受容体を活性化させた。三週目では、すべてのステロイドサポニンが受容体を活性化させた (Fig. 4-A)。レチノイン酸ありとなしのジオスシンが 140kDa 付近の受容体としての β -グルコシダーゼを活性化させた (Fig. 4-B)。

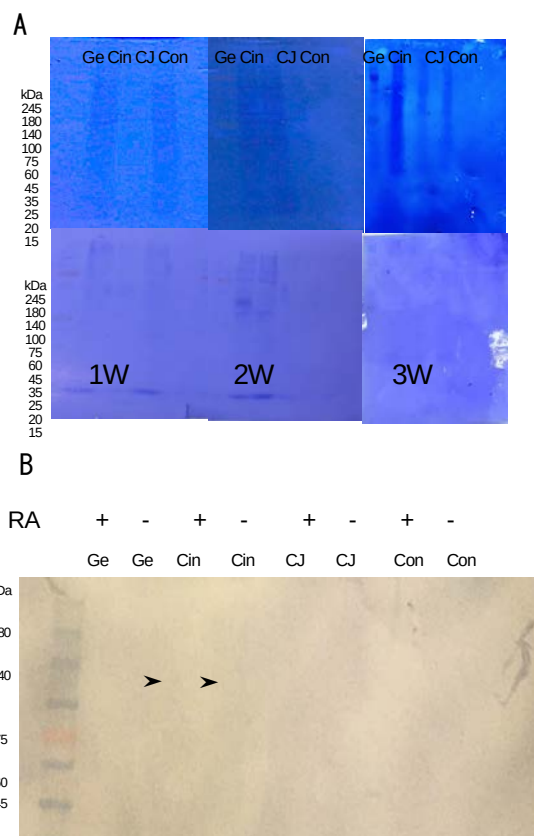


Fig. 4 The steroid saponins modulate receptors activity. Receptor activation glioblastoma cells treated by the steroid saponins. The proteins fractionated by semi SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose (activated receptor; A top) and PVDF (inactive receptors; A bottom) membranes. Beta-glucosidase detected by ELISA (B).

3. 5 グリオブラストーマの形態変化

一週目では、すべてのステロイドサポニンで接着伸展型の細胞が観察された。二週目では、ジオ

スゲニンを含んだ培地の細胞は接着性を失っていたが、ジオスシンとコリアジャポニンでは接着を維持していた (Fig. 5)。

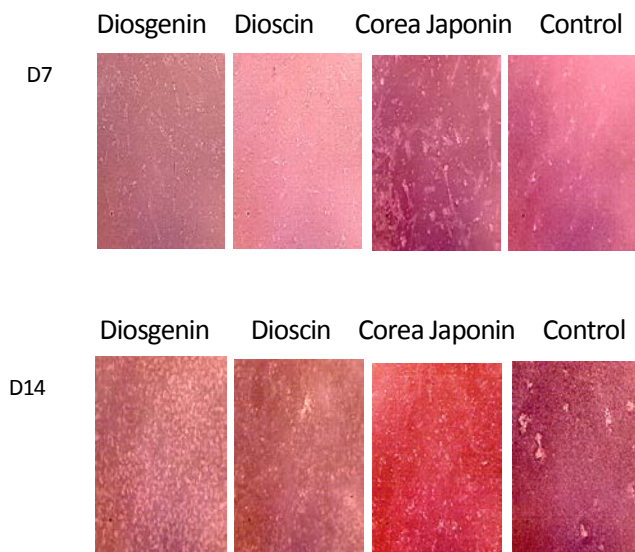


Fig. 5 Representative images of glioblastoma cells treated by the steroid saponins (day 7; top, day 14; bottom).

4. 考察

4. 1 山芋の抽出物がグリオブラストーマの生育量に及ぼす影響

ジオスシンでは細胞数のわずかな減少が認められた。ジオスシンはジオスゲニンの配糖体であり ROS(reactive oxygen species)を誘導することにより、DNA 損傷を含むミトコンドリアシグナル伝達系によりアポトーシスを引き起こすと報告がある 1)。よって、今回認められた、減少も ROS 発生によって起こるアポトーシスが原因と考えられる。

コリアジャポニンは最も細胞を減少させた。コリアジャポニンについては NGF-TrkA signaling の活性化により、神経を保護する作用が認められている 2)。この伝達系の受容体型プロテインチロシンホスファターゼ PTPRZ は中枢神経系において、神経細胞およびグリア細胞 (アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト) の両方に発現しており 3)、細胞外領域に多糖修飾が認められる。このように、この受容体は糖鎖の修飾によって活性

を変える。よって、コリアジャポニンは PTPRZ 受容体の糖鎖と相互作用または糖鎖増加因子として作用することによって、その活性を調節することが考えられた。

4. 2 山芋の抽出物がグリオブラストーマの β -グルコシダーゼ活性に及ぼす影響

ジオスゲニンでは β -グルコシダーゼ活性が低下し、細胞数が増加した。ジオスゲニンはステロイドサポニンのアグリコンである。よって、疎水性であるため、細胞膜を通過できたと考えられる。ステロイドの一種である VD はクロト遺伝子のスタートコドン上流の VD 反応因子に結合し、クロト遺伝子の転写を促進する 4)。よって、核内に移動したジオスゲニンはこの VD 結合タンパク質と競合し、遺伝子発現を抑制したと考えられた。

ジオスシンはジオスゲニンの配糖体であり ROS(reactive oxygen species)を誘導することにより、DNA 損傷を含むミトコンドリアシグナル伝達系によりアポトーシスを引き起こすと報告がある。また、 β -グルコシダーゼの遺伝子であるクロト遺伝子は ROS によるストレスにより負に制御されることが知られている 4)。培養後期の活性低下は ROS 発生による遺伝子転写の抑制によるものと考えられる。

コリアジャポニンでは β -グルコシダーゼ活性がわずかに増加した。コリアジャポニンはジオスゲニンの配糖体であり、細胞膜を透過できないため、細胞膜上の受容体に作用すると考えられた。チロシンキナーゼ型受容体(receptor tyrosine kinase; RTK)は細胞膜に局在し、リガンドにはステロイドを始め多くの化合物が認められている。コリアジャポニンはこの受容体に結合し、阻害効果を示したために、細胞増殖を抑制したことが考えられた。また、この阻害は AMPK (AMP-activated protein kinase) を活性化し、AMPK はオートファジーの開始に必須である 5)。よって、RTK と結合し、その作用を阻害することにより、細胞増殖を停止し、オートファジーを活性化させると考えられた。オートファジーの活性化に伴い、その消化酵素である β -グルコシダーゼが誘導され、活性が上昇したと考えられる。またこれに伴い mTOR 2 キナーゼの活性が抑制され、これと拮抗する mTOR 1 の活性化により 6-10) 細胞の分化が誘導されたと推察した。

4. 3 レチノイン酸との相互作用

ジオスゲニンはレチノイン酸と共存すると細胞を減少させた。よって、細胞が減少した理由はジオスゲニンとレチノイン酸の相乗効果でアポトーシスと分化が促進されたためと考えられた。 β -グルコシダーゼ活性は培養後期で低下することから、早い段階で分化が終了した、またはアポトーシスへと選択された可能性が高い。

ジオスシンについては一旦減少した後増加した。これは、前述したようにジオスシンによるROS誘導のため、アポトーシスとオートファジーの抑制が起こった結果、細胞数が減少したが、レチノイン酸の持つ還元作用で活性酸素種が除去され、その後、分化誘導された細胞が、正常に増加したと考えられた。 β -グルコシダーゼ活性についてはROSが除去された培養後期ではオートファジーが活性化されたため上昇したと考えられた。

コリアジャポニンは培養初期で著しく細胞を減少させ、その後増加させた。コリアジャポニンは細胞膜上のRTKと結合し、その作用を阻害することにより、細胞増殖を停止し、オートファジーを活性化させると考えられ、またレチノイン酸も細胞を分化させオートファジーを活性化させることから、早い段階で細胞分化が起こり、その結果、初期に細胞が減少したと考えられた。さらに、これに伴い β -グルコシダーゼ活性が低下したが、分化誘導が終了したため、活性が低下したのと考えられる。

4. 4 山芋抽出物がオートファジーに及ぼす影響

ステロイドサポニンが添加されると糖鎖は分解されることが観察され、レチノイン酸とコリアジャポニン以外は糖鎖の分解を促進することが明らかになった。このことから、レチノイン酸の効果でオートファジー活性は促進されるため、糖鎖の分解は起こりやすくなるが、リン酸化も同時に起こり、分解活性が低下するものと考えられた、さらにこのリン酸化はステロイドサポニンのアグリコンの部分で抑制されると仮定すると糖鎖の多いコリアジャポニンはその活性が低いことが予想できる。しかし、この件に関してはリン酸化についてさらなる検討が必要である。

蛋白質分解酵素については、ステロイドサポニン存在下で高分子量のプロテアーゼの生産が抑制され、低分子については活性化している。このことは、マトリックスメタロプロテアーゼ(高分子量)は活性が低下し、オートファジー関連プロテアーゼ(低分子量)は活性化していることを意味する。多形性グリア芽細胞腫(GBM)はマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)の活性化はグリオブラストーマの悪性化を招く。ステロイドサポニンは、神経変性を防止するタンパク質の消化機構を維持しつつ、腫瘍の悪性化を防ぐ効果があることが期待できる。

オートファゴソーム形成活性は、レチノイン酸ありのジオスゲニンとレチノイン酸なしのコリアジャポニンで高いことから、オートファジーの全ての過程(オートファゴソーム形成とリソソームでの消化活性)において最も促進したものはコリアジャポニンであることが明らかになった。

オートファジーを活性化させることは、増殖因子存在下のグリオブラストーマを増殖させることになる。しかし、前述したように、mTOR1,2の阻害を選択的に行えば、癌として増殖させることなく、分化を誘導できると考えられる。また、この選択ができる化合物はコリアジャポニンであることが推察された。

4. 5 ステロイドサポニンの受容体

ステロイドサポニンのうちジオスゲニンは配糖体ではないため、細胞膜を通過できる。よって、ジオスゲニンは細胞内のステロイド受容体に作用したのと考えられる。ジオスシンとコリアジャポニンは配糖体であるため、細胞膜を通過できない、よってこの2つは膜上受容体に作用し、細胞を増殖させたと考えられた。ジオスシンは受容体としての β -グルコシダーゼを活性化させたため、 β -グルコシダーゼが受容体であると考えられる。コリアジャポニンは多くの受容体を活性化させたが、膜上受容体の候補で最も有力であるものは、分化を促進するTGF- β 受容体であるが、前述のようにRTK受容体と拮抗することで分化を促進することも考えられた。

4. 6 グリオブラストーマの形態変化

コリアジャポニンは接着・伸展の細胞を維持す

ることから、細胞が細胞外基質と接着することを促す作用があることが予想された。グリオブラストーマは **tenascin-C** を生産して細胞外基質から遊離することで、増殖、浸潤を増強させることが知られ、このことは脱分化によって起こる (11)。コリアジャポニンを含んだ培地の細胞は接着を維持したということから、細胞の分化能を維持したことが推定された。

5. まとめ

山芋抽出物から調製したステロイドサポニンのグリオブラストーマ抑制効果を検討したところ、コリアジャポニンが最もグリオブラストーマに対する治療効果が高いことが推定された。コリアジャポニンは **TGF- β** 受容体の活性化と **RTK** 受容体の阻害により、細胞増殖を停止し、オートファジーを活性化させグリオブラストーマを分化させることによって、細胞機能を正常に戻す作用があることが推察された。

参考文献

- 1) L. Zheng et al.: Dioscin, a natural steroid saponin, induces apoptosis and DNA damage through reactive oxygen species: a potential new drug for treatment of glioblastoma multiforme, *Food Chem Toxicol* (59), pp. 657-669 (2013)
- 2) R. Venkatesan et al.: Phytochemicals That Regulate Neurodegenerative Disease by Targeting Neurotrophins: A Comprehensive Review, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* (2015), pp. 1-23 (2015)
- 3) T. Shintani et al.: Neurons as well as astrocytes express proteoglycan-type protein tyrosine phosphatase ζ /RPTP β : analysis of mice in which the PTP ζ /RPTP β gene was replaced with the LacZ gene, *Neurosci. Lett.* (247), pp. 135-138 (1998)
- 4) Y. Xu et al.: Sun-corresponding Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging, *Endocr Rev.* 36(2), pp. 174-193 (2015)
- 5) 坂元 一真, 門松 健治: 神経軸索におけるオートファジーとその破綻, *Journal of Japanese Biochemical Society* 90(1), pp. 27-34 (2018)
- 6) R.J. Dowling et al.: Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors, *Biochim. Biophys. Acta* 1804(3), pp. 433-9 (2010)
- 7) E.A. Dunlop et al.: Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms, *Cell. Signal.* 21(6), pp. 827-35 (2009)

- 8) C.A. Hoeffler et al.: mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease, *Trends Neurosci.* 33(2), pp. 67-75 (2010)
- 9) M. Laplante et al.: mTOR signaling at a glance, *J. Cell. Sci.* 122(20), pp. 3589-94 (2009)
- 10) T.P. Neufeld TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22(2), pp. 157-68 (2010)
- 11) E. Hirata et al.: Endogenous tenascin-C enhances glioblastoma invasion with reactive change of surrounding brain tissue, *Cancer Science* 100, pp. 1451-1459 (2009)

[受理年月日 2020年9月11日]