



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	山椒熱水抽出物により誘導されるオートファジー細胞死に関する研究
Author(s)	野崎, 怜雄
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13184号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13184
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69633
Type	doctoral thesis
File Information	Reo_Nozaki.pdf



博士学位論文

山椒熱水抽出物により誘導される
オートファジー細胞死に関する研究

野崎 怜雄

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

臨床病態解析学研究室

2018 年 3 月

目次

略語表.....	4
1. 序論	5
山椒について.....	7
2. 結果	8
2-1. ZFE の生理作用に関する解析	8
2-1-1. ZFE が各種細胞形態に及ぼす影響	8
2-1-2. ZFE が各種細胞増殖に及ぼす影響	12
2-1-3. ZFE が細胞死に及ぼす影響.....	14
2-2. ZFE とオートファジーの関連性の解析	15
2-2-1. ZFE がオートファジーに及ぼす影響.....	15
2-2-2. ATG5 ノックダウンが ZFE による細胞死および細胞形態に及ぼす影響... 18	
2-3. ZFE の誘導するオートファジー細胞死のシグナル伝達経路に関する解析	21
2-3-1. ZFE が JNK シグナルに与える影響	21
2-3-2. JNK inhibitor が ZFE による空胞形成に与える影響	23
2-3-3. JNK inhibitor が ZFE による空胞形成に与える影響	24
2-3-4. JNK activator を単独添加した際の影響	24
2-4. ZFE の主要成分 sanshools に関する検討	25
3. 考察	27
4. 結論	33
5. 実験材料および実験方法.....	36
5-1. 実験に使用した試薬と抗体.....	36
5-2. ZFE の調整方法	36
5-3. 実験に用いた細胞とその培養方法	37
5-4. 光学顕微鏡観察	37

5-5. 細胞増殖活性の測定	37
5-6. トリパンプルー染色と生細胞数のカウント	37
5-7. Caspase 3/7 活性測定	38
5-8. 電子顕微鏡観察	38
5-9. ウェスタンブロッティング	38
5-10. siRNA の導入.....	39
5-11. qRT-PCR	40
6. 参考文献	41

略語表

本論文に用いた略語を以下に示す。

AMPK	AMP-activated protein kinase
ATG	autophagy related
Ctrl	control
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DOX	doxorubicin
FBS	fetal bovine serum
HAS	hydroxy-alpha-sanshool
HBS	hydroxy-beta-sanshool
JNK	c-jun N-terminal kinase
KCNK9	potassium two pore domain channel subfamily K member 9
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
mTOR	mammalian target of rapamycin
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
PE	phosphatidylethanolamine
RNAi	RNA interference
SDS-PAGE	SDS - polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
WB	western blotting
ZFE	Zanthoxylum Fruits Extract

1. 序論

癌は世界の重大な死因の一つであり、日本においても癌患者数は年々増加の一途を辿っている。癌に対する三大治療は手術、化学療法、放射線療法である。化学療法は他の治療法と異なり全身治療にも有効であり、日々新たな化学療法の創薬資源が探索されている^{1,2}。薬用植物は今日用いられている主要な抗癌剤の創薬資源となっており、イリノテカンやパクリタキセルはその代表としてあげられる。

漢方薬は中国より伝わった中医学が日本独自の発展を遂げ形成された医薬である。現在では漢方薬は癌化学療法における副作用の軽減に対する効果が期待されており、実際に臨床で用いられている。例として、オキサリプラチンの末梢神経障害に対する牛車腎気丸 (*Goshajinkigan*) の有効性^{3,4}、FOLFIRI 療法による口腔粘膜細胞の障害を起因とする口内炎に対する半夏瀉心湯 (*Hangeshashinto*) の予防効果⁵、シスプラチンによる食思不振に対する六君子湯 (*Rikkunshito*) の食欲改善効果⁶などがあげられる。

現在最も多く処方されている漢方薬である大建中湯 (*Daikenchuto*) は 3 つの生薬 (乾姜、人參、山椒) の熱水抽出成分と膠飴から構成される。大建中湯は腸管血流を増加させ、腸の蠕動運動を促す作用があり、臨床現場ではクローン病や術後イレウスによる癒着を防止する目的で処方される^{7,8}。

近年では家族性大腸ポリポーシスの原因遺伝子である *Apc* 遺伝子変異と大腸癌誘発薬剤である *Azoxymethane* を組み合わせた大腸癌発癌モデルマウスにおいて、大建中湯による腫瘍抑制効果が明らかとなった⁹。しかしながら、大建中湯の癌増殖抑制効果および発癌抑制効果の発現機序については明らかとなっていない。大建中湯の癌増殖抑制および発現抑制に関わる構成生薬について、これまでに本研究室では大建中湯の各構成生薬の癌細胞への影響を検討してきた。その検討結果から大建中湯の構成生薬の中で、特に山椒に強い癌増殖抑制作用がある可能性が示唆された (Fig.1)¹⁰。さらに大建中湯の薬物動態に関する報告から、山椒成分は乾姜および人參と比較して 100 倍以上の量が迅速に血中に取り込まれることが明らかとなっており¹¹、山椒の生体内での働きを解明することは重要であると考えられる。そこで本研究では山椒に焦点を当て、山椒の癌

増殖抑制作用およびその機序について詳細な解析を行い、抗癌剤開発のための新たなターゲットとしての可能性を探った。

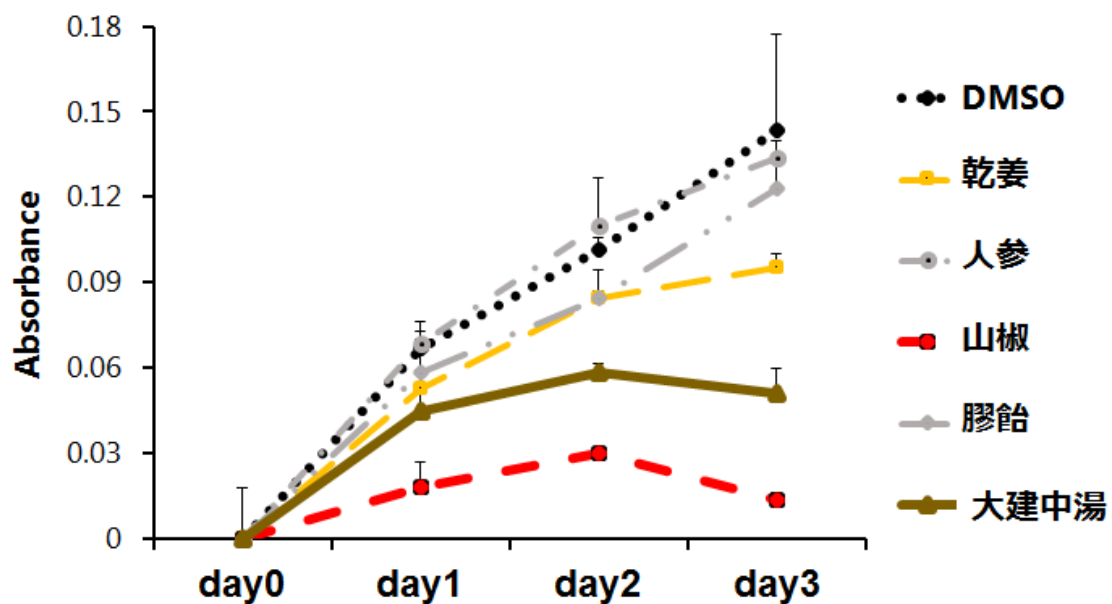


Fig.1 大建中湯の各構成生薬がヒト大腸癌細胞 DLD-1 の増殖に及ぼす影響

図に示す各生薬を含有する培地で3日間培養し、増殖活性を測定した結果。大建中湯の濃度は1 mg/ml であり、各生薬の濃度は大建中湯に含まれる割合に調整している。
(本研究室卒業生、坂牧佑一学士より提供)

山椒について

山椒 (*Zanthoxylum piperitum*: Japanese pepper) は日本原産の植物であり、その果皮の乾燥粉末はスパイスとして一般的に知られている。一方で、山椒は日本独自の生薬としても用いられてきた。山椒の生理作用に関して、これまでに山椒主要成分 hydroxy- α -sanshool が腸管上皮細胞の TRPA1 チャンネルを介して腸管運動や腸管血流を増加させること¹²、腸管神経細胞の KCNK9 カリウムチャンネルを抑制し、細胞膜電位を上昇させることで神経細胞の易刺激性を高めることが報告されている¹³。

山椒と癌との関連を示した過去の報告について、同種の山椒由来である糖タンパク質が、肝癌モデルマウスにおける肝癌発症を抑制すること¹⁴、中国産の山椒 (花椒: *Zanthoxylum bungeanum*, Sichuan pepper) の水抽出物が xenograft モデルマウスにおいて神経線維腫症 1 型腫瘍細胞の増殖を抑制すること¹⁵ が示唆されているが、報告数は少数に留まり、詳細な機序については明らかにされていない。

本論文では、山椒熱水抽出物 (Zanthoxylum Fruits Extract: ZFE) の抗癌作用について、ヒト由来である大腸癌、肝臓癌、肺癌、乳癌の各種細胞株を用いて検討を行った。さらに、その詳細なメカニズムについてヒト大腸癌細胞 DLD-1 を用いて解析を行った。また正常細胞への影響についてはラット正常小腸細胞である IEC-6 を用いて検討を行った。その結果を以下に詳述する。

2. 結果

2-1. ZFE の生理作用に関する解析

2-1-1. ZFE が各種細胞形態に及ぼす影響

始めに ZFE がヒト大腸癌由来 DLD-1 細胞に与える影響を形態学的に解析するため、光学顕微鏡による観察を行った。ZFE を添加した培地で 24 時間培養した DLD-1 細胞の細胞質に多量の空胞様構造が出現する事を確認した (Fig.2)。

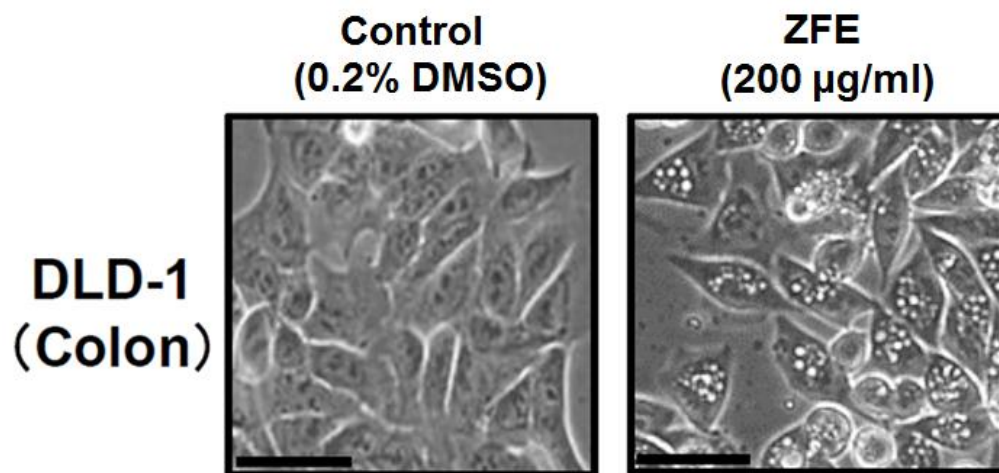


Fig.2 ZFE がヒト大腸癌細胞 DLD-1 の細胞形態に及ぼす影響.

DLD-1 を ZFE 200 µg/ml もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて 24 時間培養し、光学顕微鏡観察を行った。Scale bars, 50 µm.

さらに同様の観察を時系列で行ったところ、ZFE による細胞質の空胞形成は 8 時間以降に出現していることが明らかとなった (Fig.3)。

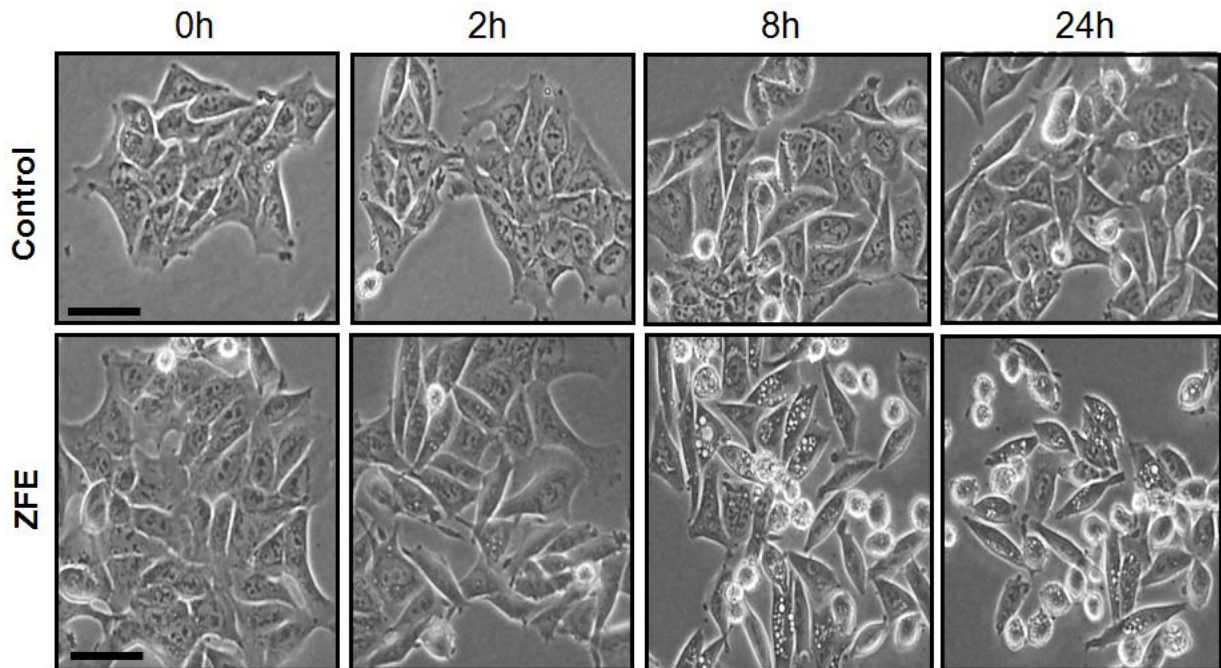


Fig.3 ZFE が DLD-1 の細胞形態に及ぼす影響（時系列）。

ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて図に示す時間で培養し、光学顕微鏡で観察した。Scale bars, 50 μm .

他の癌組織由来の細胞への影響を解析するため同様の観察を行ったところ、ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞では DLD-1 と同様の空胞様構造を確認した。ヒト肺癌由来 A549 細胞、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞では、細胞形態に変化は見られなかった (Fig.4)。また DLD-1 と同じ大腸癌由来である Caco-2 細胞、WiDr 細胞において、Caco-2 では空胞様構造が出現したが WiDr では形態に変化は見られなかった (Fig.5)。ラットの正常小腸由来である IEC-6 細胞で、同様の観察を行ったところ、細胞形態に変化は見られなかった (Fig.6)。

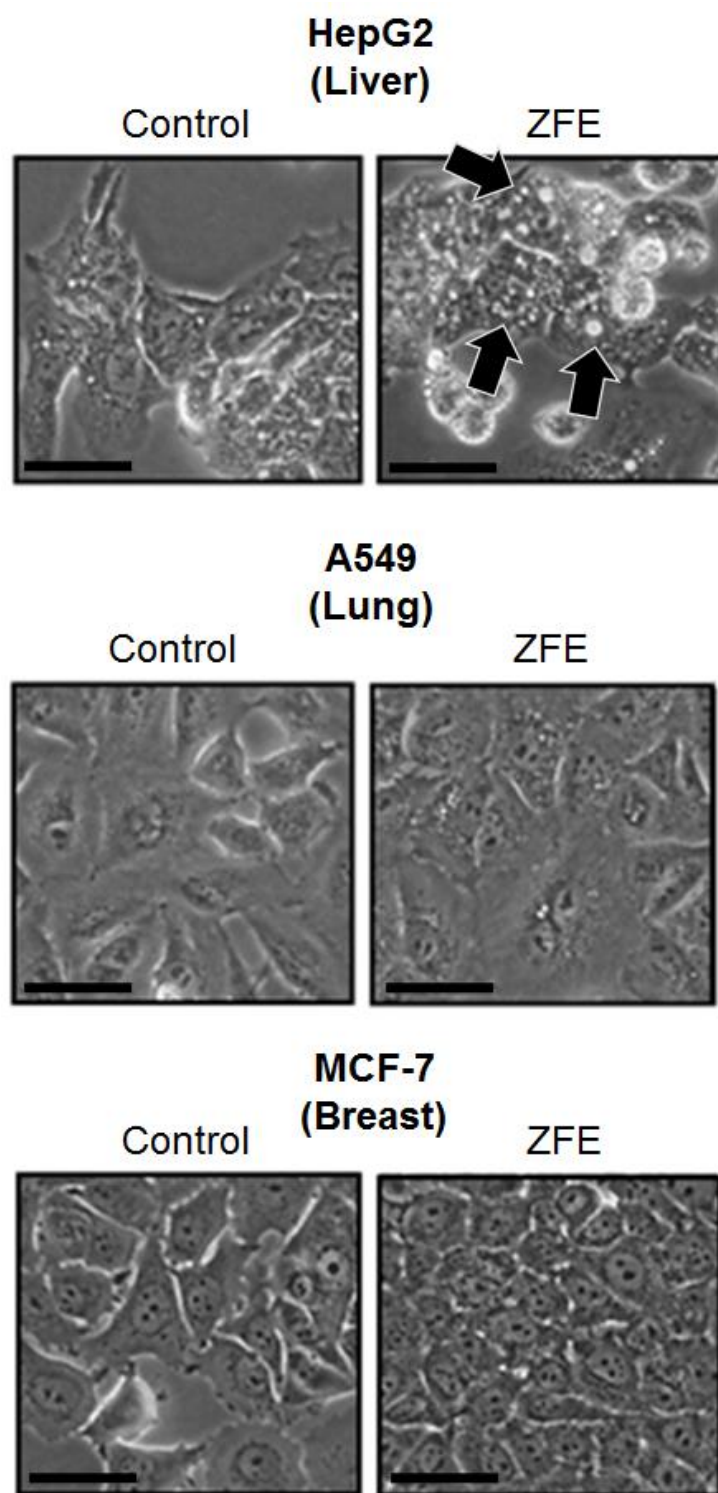


Fig.4 ZFE が各種癌細胞の細胞形態に及ぼす影響

図に示す癌細胞を ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて 24 時間培養し、光学顕微鏡で観察した。矢印は空胞構造を示している。
Scale bars, 50 μm .

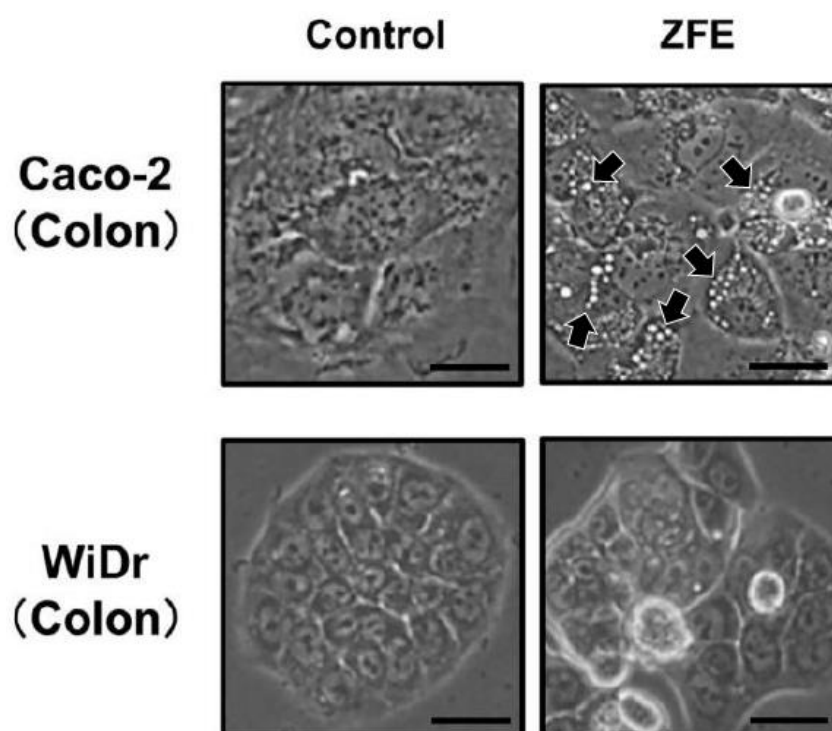


Fig.5 ZFE がヒト大腸癌細胞 Caco-2 および WiDr の細胞形態に及ぼす影響

ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて 24 時間培養し、光学顕微鏡で観察した。矢印は空胞構造示している。Scale bars, 50 μm .

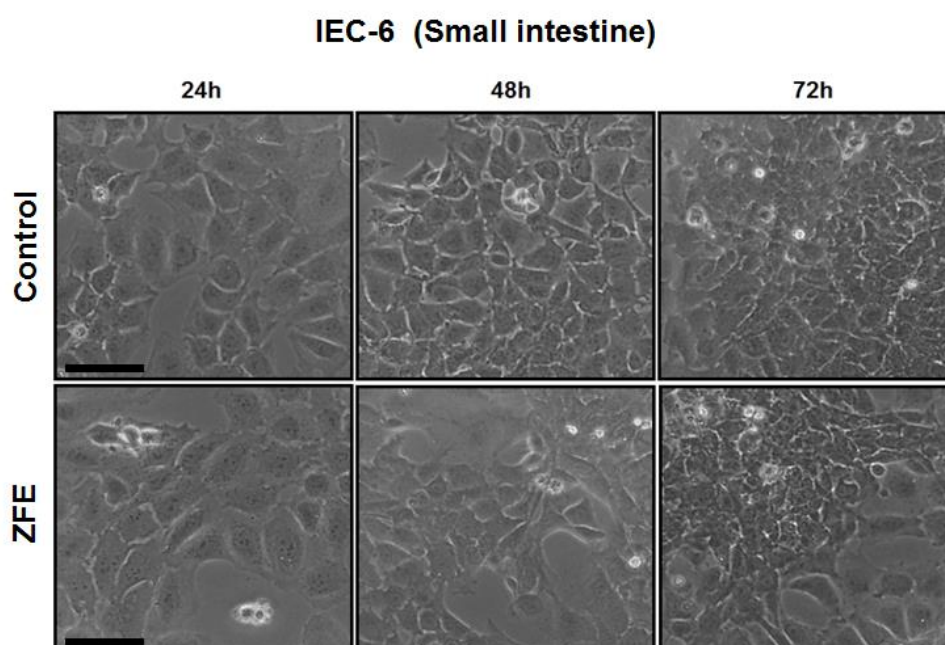


Fig.6 ZFE がラット正常腸細胞 IEC-6 の細胞形態に及ぼす影響

IEC-6 を ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて図に示す時間で培養し、光学顕微鏡で観察した。Scale bars, 50 μm .

2-1-2. ZFE が各種細胞増殖に及ぼす影響

続いて ZFE が各種癌細胞の増殖に及ぼす影響を解析するため、細胞増殖活性の測定を行った。ZFE 100 $\mu\text{g/ml}$ では 72 時間で DLD-1 の増殖を抑制していると考えられた、ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ では 48 時間以降で細胞死を起こしている可能性が示唆された (Fig.7)。以後は ZFE の濃度を 200 $\mu\text{g/ml}$ に設定し、他種癌細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、HepG2、Caco-2 では DLD-1 と同様に ZFE によって細胞死が誘導されている可能性が示唆された。一方で A549, MCF-7, WiDr, IEC-6 では増殖に変化を及ぼさなかった (Fig.8)。

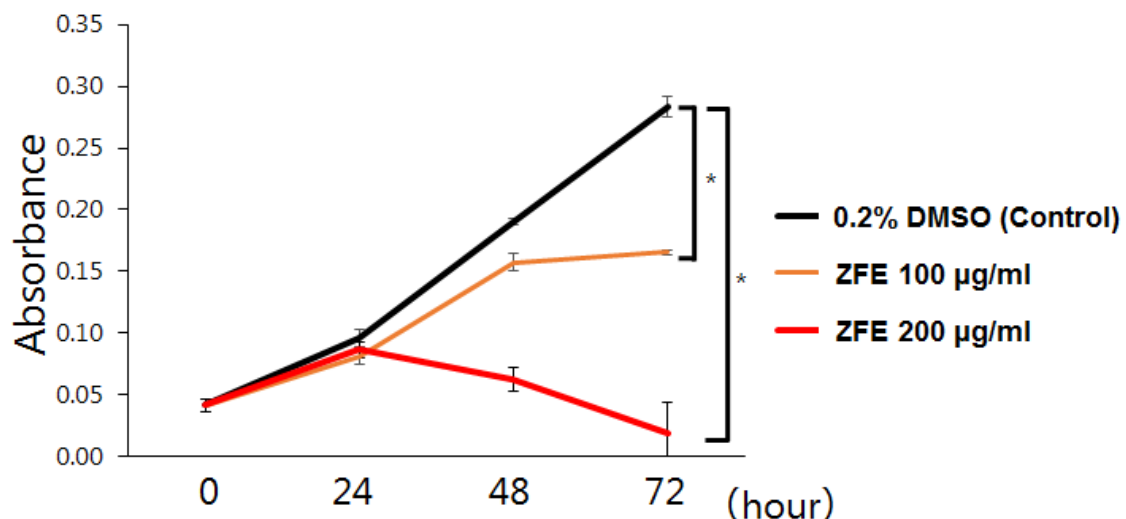


Fig.7 ZFE が DLD-1 の細胞増殖に及ぼす影響

ZFE 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で培養し、図に示す時間で細胞増殖活性の測定を行った。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。(* $p < 0.05$; Dunnett's test)

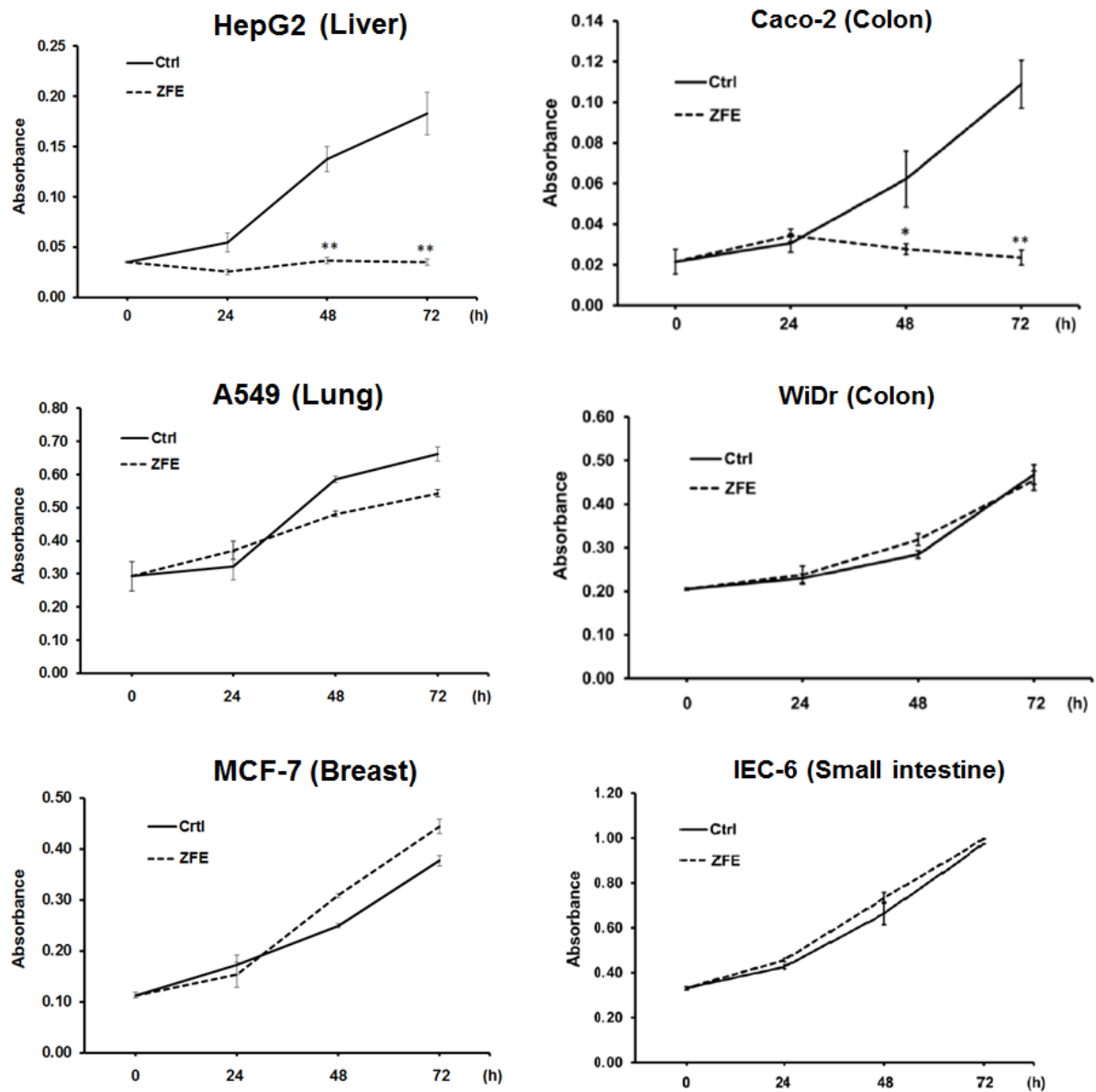


Fig.8 ZFE が各種細胞の増殖に及ぼす影響

ZFE 200 µg/ml もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で培養し、図に示す時間で細胞増殖活性の測定を行った。エラーバーは平均値±SD (n=3) を示す。
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Student's t-test)

2-1-3. ZFE が細胞死に及ぼす影響

ZFE が細胞死を誘導する可能性が示唆されたため、DLD-1 を用いてトリパンブルー染色による生細胞数の計測を行った。その結果、生細胞数の減少が確認されたため、ZFE が DLD-1 に細胞死を誘導していることが明らかとなった (Fig.9)。次に ZFE の引き起こす細胞死の種類を明らかにするため、カスパーゼ 3/7 活性の測定を行った。ポジティブコントロールとして用いたドキソルビシンに対し、ZFE の添加後 24, 48, 72 時間のいずれでもカスパーゼ 3/7 活性の亢進は見られなかった (Fig.10)。以上の結果より、ZFE によって DLD-1 にもたらされた細胞死は、カスパーゼ依存的なアポトーシスである可能性は否定的と考えられた。

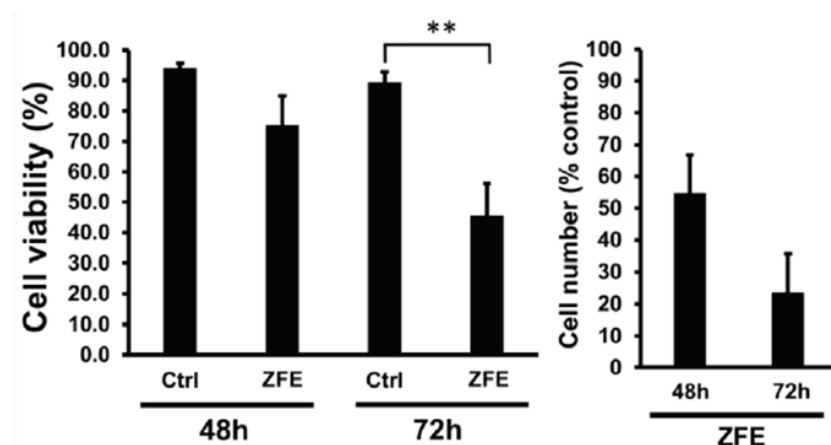


Fig.9 ZFE が DLD-1 の生存率に及ぼす影響

ZFE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて図に示す時間で培養し、トリパンブルーアッセイを行い細胞生存率および生細胞数を測定した。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。 (** $p < 0.01$; Student's t-test)

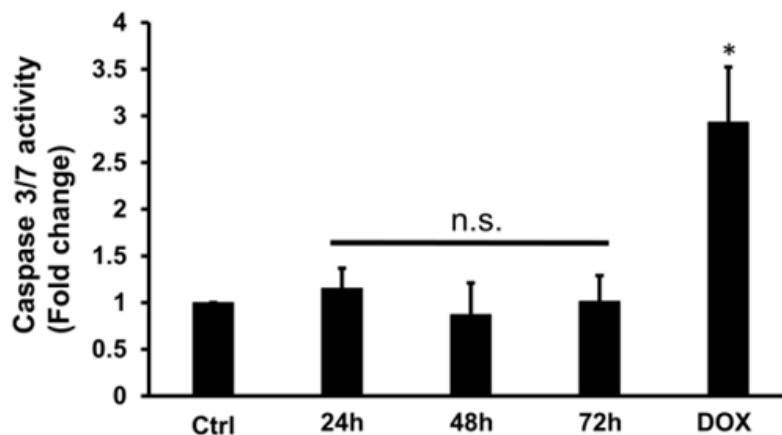


Fig.10 ZFE が DLD-1 のカスパーゼ 3/7 活性に及ぼす影響

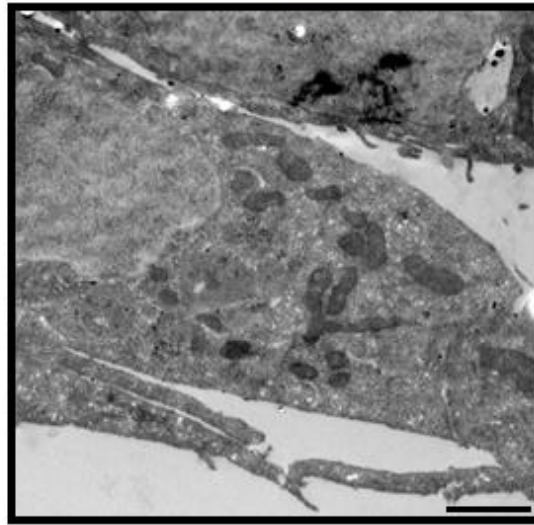
ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ を含有する培地にて図に示す時間で培養した。0.2 % v/v DMSO (コントロール)、ポジティブコントロールとしてドキソルビシン (DOX) 7 μM を含有する培地で 24 時間培養しカスパーゼ活性を測定した。縦軸はコントロールに対する比を表す。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。(* $p < 0.05$; Student's t-test)

2-2. ZFE とオートファジーの関連性の解析

2-2-1. ZFE がオートファジーに及ぼす影響

ZFE の添加によって出現した多量の空胞様構造をさらに詳細に解析するため、電子顕微鏡による観察を行った。ZFE を添加し 24 時間後の DLD-1 の電子顕微鏡像から、細胞内オルガネラを隔離する二重膜構造であるオートファゴソーム、およびその内容物と内側の膜が分解された一重膜構造であるオートリソソームが多量に観察された (Fig.11)。これらの形態学的な所見により、ZFE が DLD-1 にオートファジーを誘導している可能性が強く示唆された。さらにオートファジーマーカーである LC3 の WB を行ったところ、ZFE の添加後 6 時間から LC3-II のバンドが増強することが明らかとなった (Fig.12)。以上の結果から ZFE はオートファジーを誘導することが明らかとなった。

Control



ZFE

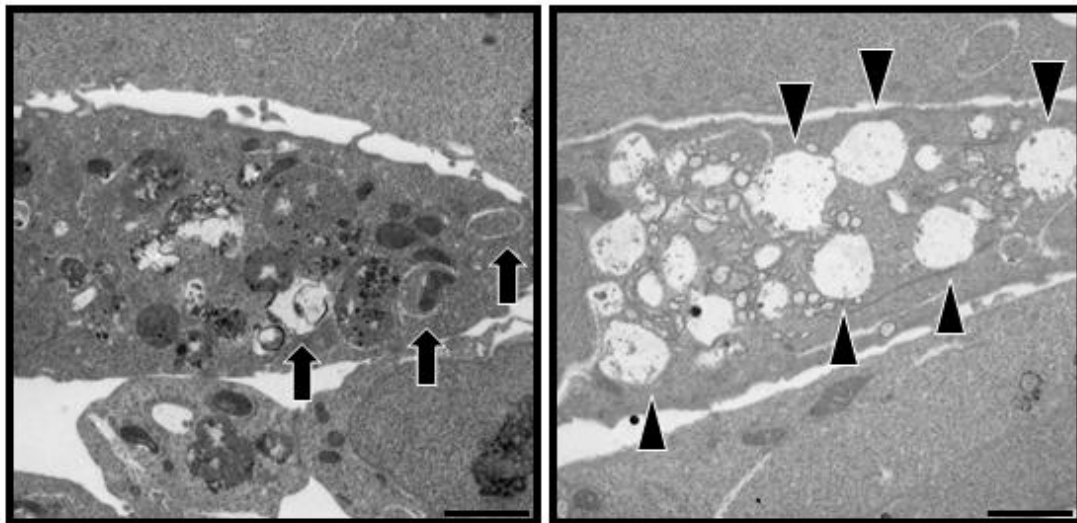


Fig.11 ZFE が DLD-1 の微細形態に及ぼす影響（電子顕微鏡像）

ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて図に示す時間で培養し、電子顕微鏡撮影を行った。Scale bars, 2 μm .

(Arrows: autophagosomes, Arrowheads: autolysosomes.)

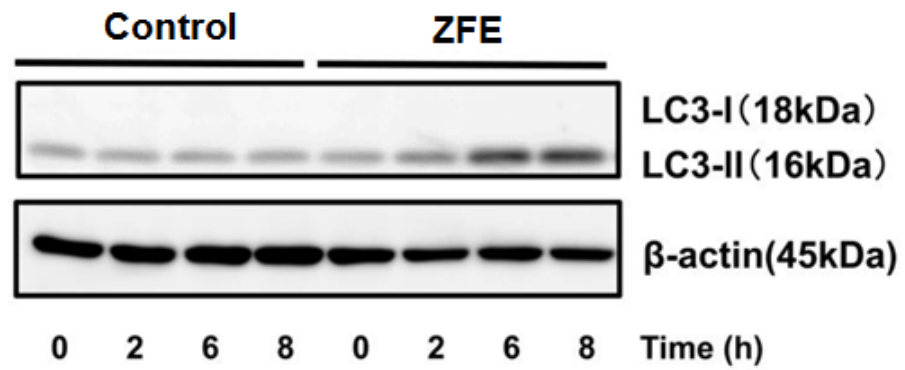


Fig.12 ZFE がオートファジーマーカーLC3 に及ぼす影響

ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地にて図に示す時間で培養、細胞のタンパク質を回収し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法を行った。

2-2-2. ATG5 ノックダウンが ZFE による細胞死および細胞形態に及ぼす影響

オートファジーは必須遺伝子である ATG ファミリーのノックダウンによって阻害される。DLD-1 に siRNA を導入し、ATG ファミリーの一つである ATG5 のノックダウンを行った。qRT-PCR と WB による解析から、遺伝子発現、タンパク質レベルの両方で siRNA による ATG5 のノックダウンを確認した (Fig.13)。

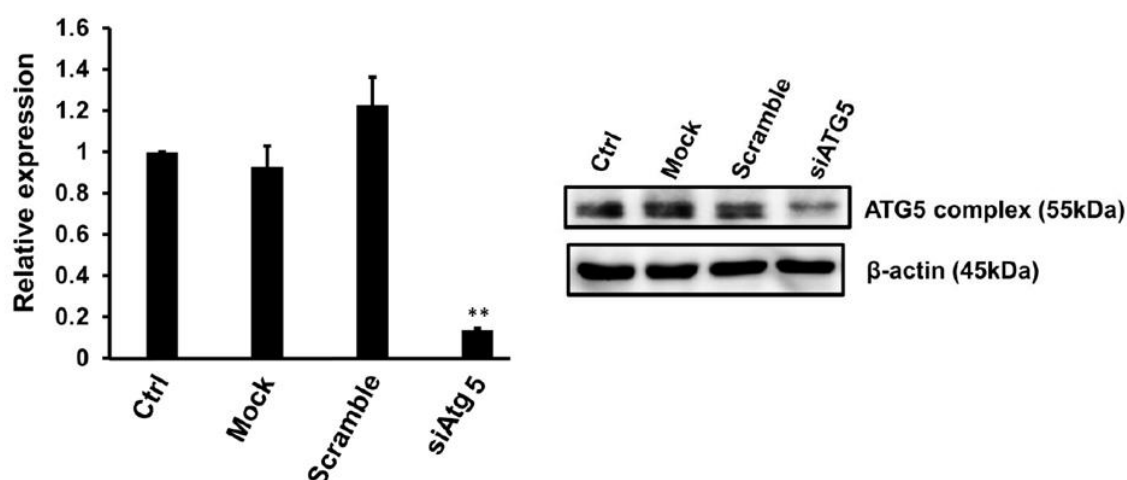


Fig.13 siATG5 導入による遺伝子発現およびタンパク質発現抑制の確認

DLD-1 を用い、以下に示す条件で siRNA を導入し mRNA 回収後、ATG5 遺伝子発現を (左) qRT-PCR で確認および ATG5 タンパク質発現を (右) ウェスタンブロット法で確認した。Ctrl: 無処理、Mock: トランスフェクション試薬のみを添加、Scramble: トランスフェクション試薬を用いて scramble siRNA を導入、siATG5: トランスフェクション試薬を用いて ATG5 siRNA を導入。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。(** $p < 0.01$; Student's t-test)

次に ATG5 ノックダウンが ZFE による細胞形態に及ぼす影響を光学顕微鏡観察によって解析したところ、ATG5 のノックダウンにより ZFE が誘導する空胞様構造の減少を確認した (Fig.14)。さらに、ATG5 のノックダウンによって ZFE による細胞死が軽減されることを確認した (Fig.15)。ATG5 ノックダウンの再現性を確認するため、以上で行った実験を配列の異なる ATG5 siRNA (siATG5#2) を用いて同様に実験を行ったが、結果は同様であった (Fig.16)。

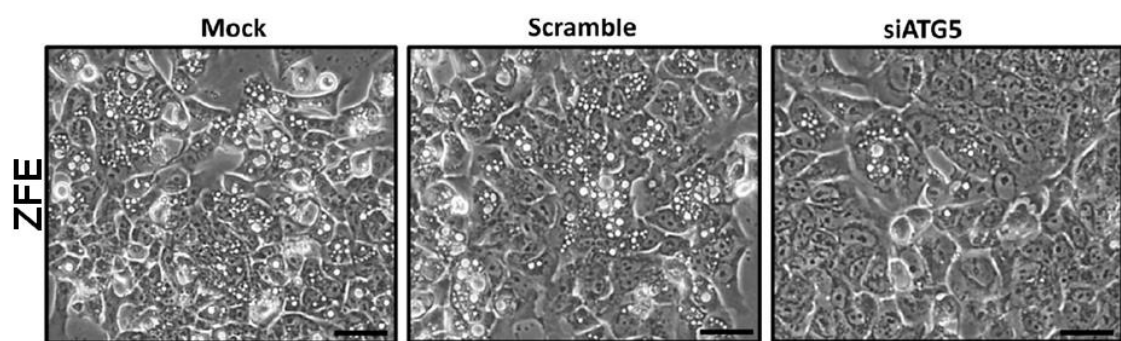


Fig.14 ATG5 ノックダウンが ZFE による細胞形態に及ぼす影響

DLD-1 に siRNA を導入後、ZFE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含有する培地で 24 時間培養し、光学顕微鏡観察を行った。Scale bars, 50 μm .

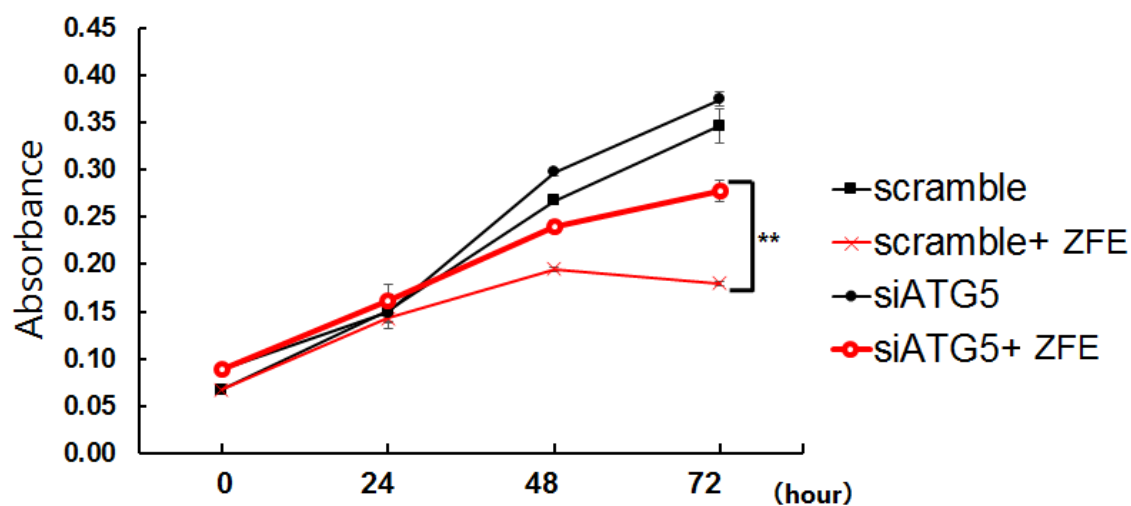


Fig.15 ATG5 のノックダウンが ZFE による細胞死に及ぼす影響

DLD-1 に siRNA を導入後、ZFE 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で図に示す時間培養し、細胞増殖活性の測定を行った。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。(** $p < 0.01$; Student's t-test)

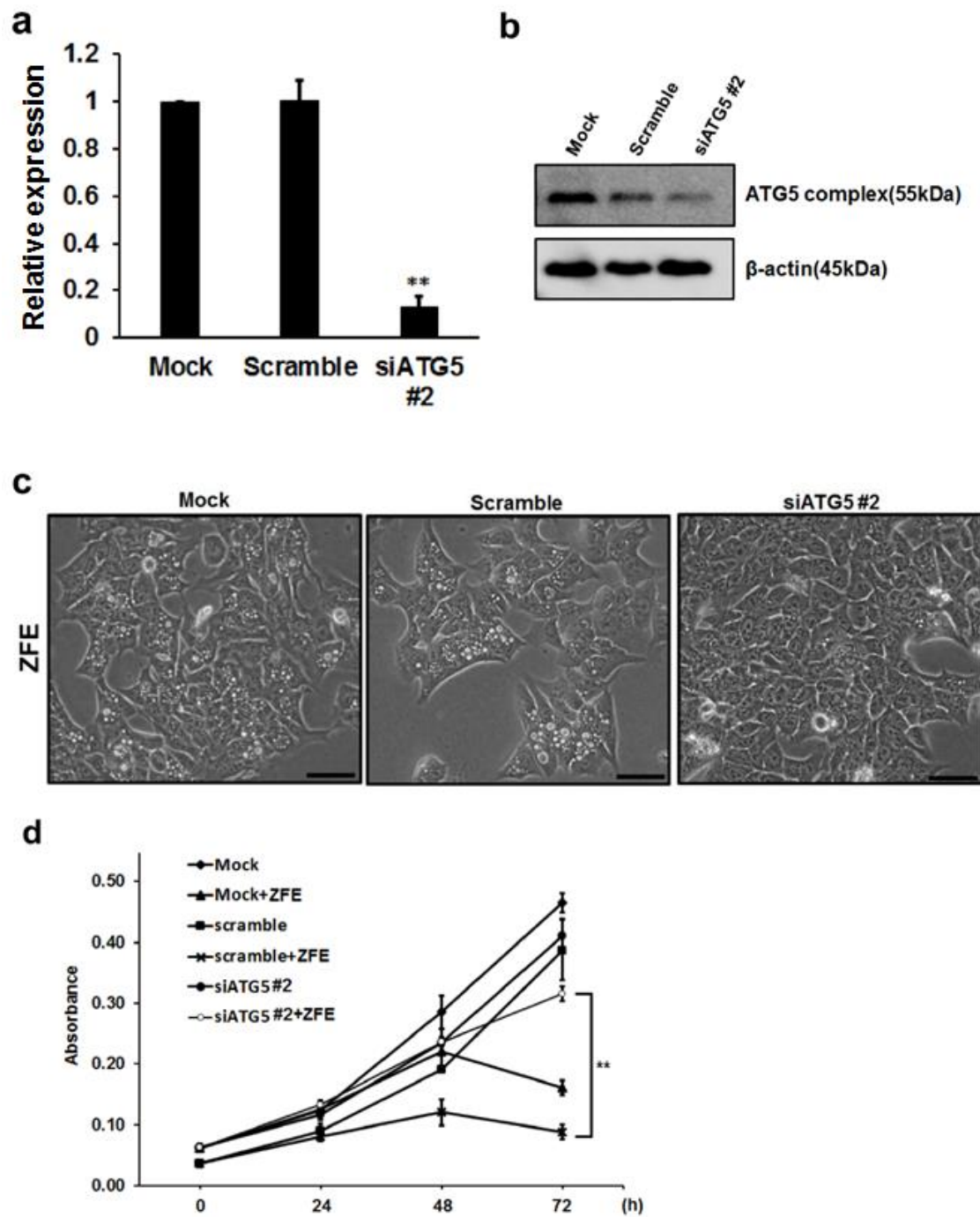


Fig.16 配列の異なる ATG5 siRNA (siATG5#2) を用いた再現性の確認

ATG5 遺伝子およびタンパク質発現抑制の確認 (a, b)、ATG5 ノックダウンが ZFE による細胞形態(c) および増殖抑制(d) に及ぼす影響について Fig.13-15 に示した結果と同様の実験を行った。エラーバーは平均値±SD (n=3) を示す。

(Scale bars, 50 μm, ** $p < 0.01$; Student's t-test)

2-3. ZFE の誘導するオートファジー細胞死のシグナル伝達経路に関する解析

2-3-1. ZFE が JNK シグナルに与える影響

ZFE の誘導するオートファジー細胞死に JNK が関与している可能性を探るため、ウェスタンブロット法を用いて、各種細胞における JNK のリン酸化活性を解析した。その結果、DLD-1, HepG2, Caco-2 では、ZFE 添加後に JNK のリン酸化が亢進していることが確認された。またこの時 HepG2 では LC3-II の増強が見られたが、Caco-2, WiDr においてそのような変化は認めなかった (Fig.17 および Fig.18)。一方、A549, MCF-7, WiDr, IEC-6 では JNK のリン酸化に変化は見られなかった、またこの時 IEC-6 では LC3-II が増強していた (Fig.18)。続いて ZFE の誘導するオートファジー細胞死における JNK の役割を明らかにするため、JNK inhibitor である SP600125 存在下で、ZFE がオートファジーに及ぼす影響の解析を行った。JNK inhibitor の存在下で ZFE による LC3-II の増強が抑制された (Fig.18)。

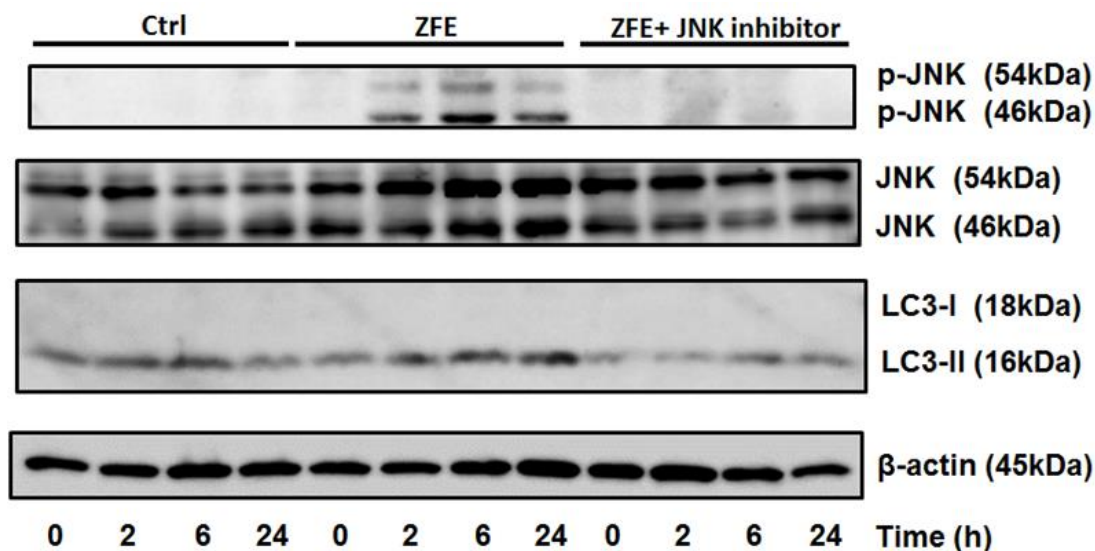


Fig.17 ZFE が JNK シグナルおよび LC3 に及ぼす影響と JNK inhibitor SP600125 の添加による影響

ZFE 200 μ g/ml 含有培地で JNK inhibitor (5 μ M SP600125) 非存在下もしくは存在下、0.2% v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で培養し、図に示す時間でタンパク質を回収後、図に示す抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。

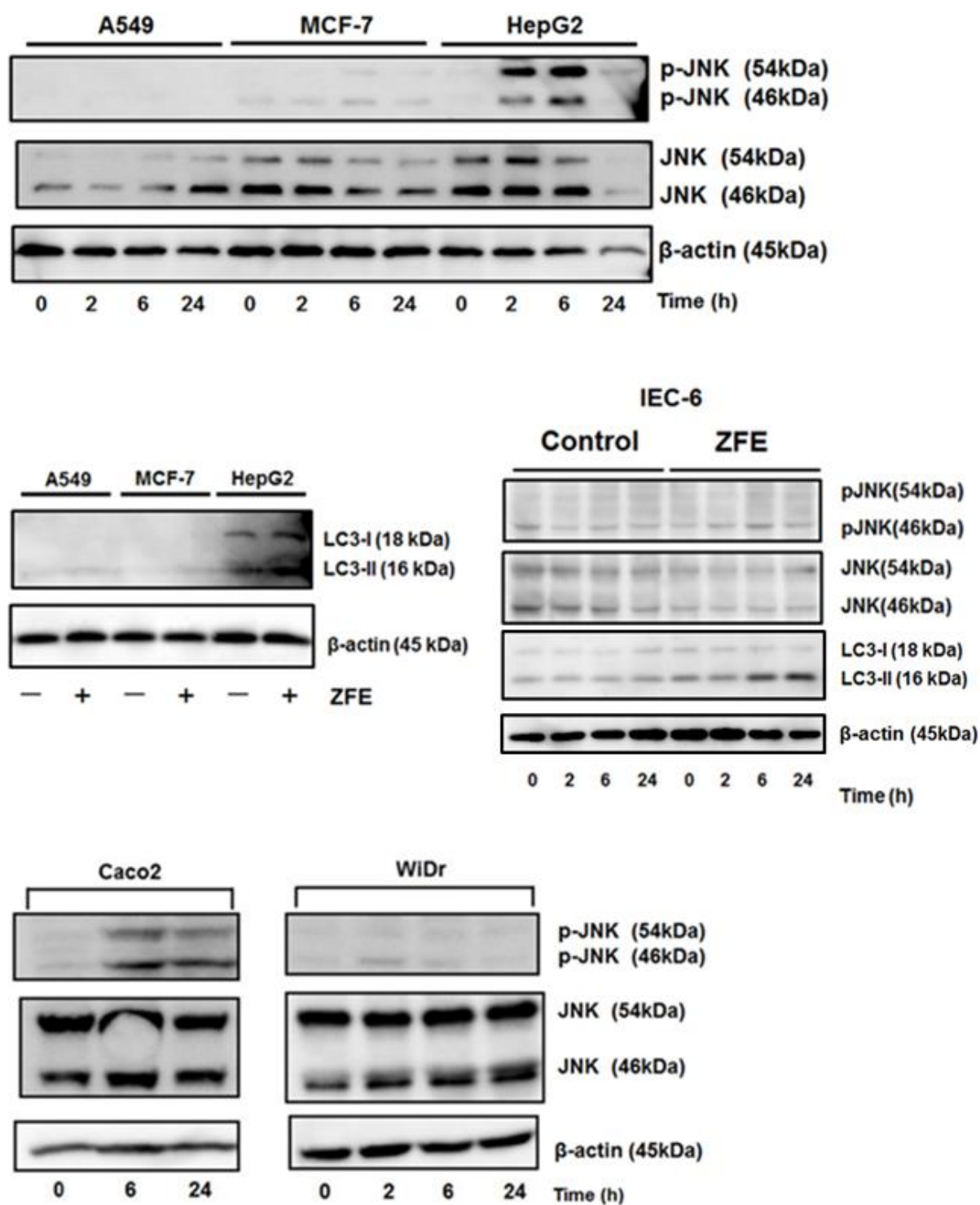


Fig.18 ZFE が各種細胞の JNK シグナルおよび LC3 に及ぼす影響

図に示す各種細胞を ZFE 200 µg/ml 含有もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で培養し、タンパク質を回収後、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法を行った。

2-3-2. JNK inhibitor が ZFE による空胞形成に与える影響

DLD-1 において JNK inhibitor 存在下で、ZFE が誘導する空胞形成に及ぼす影響の解析を行った。JNK の阻害によって ZFE による空胞形成を抑制することを確認した (Fig.19)。

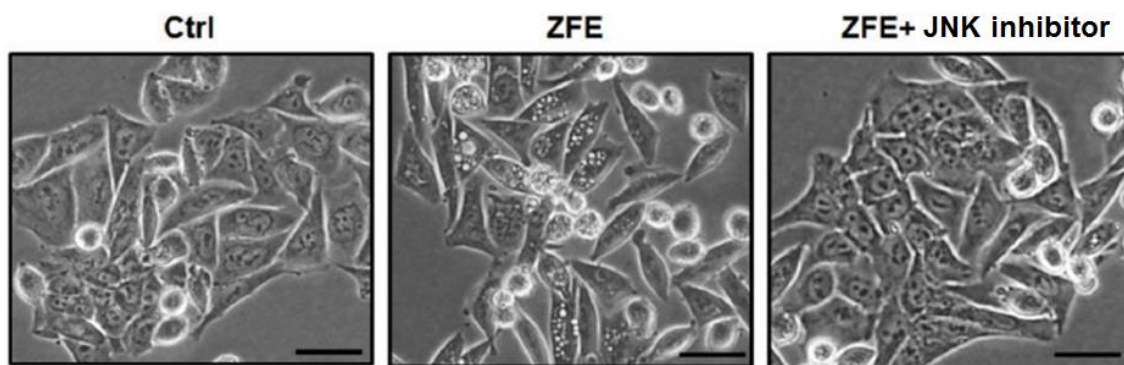


Fig.19 JNK inhibitor が ZFE による空胞形成に与える影響

DLD-1 を ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地で JNK inhibitor (5 μM SP600125) 非存在下もしくは存在下、0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で培養し、光学顕微鏡観察を行った。Scale bars, 50 μm .

2-3-3. JNK inhibitor が ZFE による細胞死に与える影響

DLD-1 において JNK inhibitor 存在下で、ZFE が誘導する細胞死に及ぼす影響の解析を行った。JNK の阻害によって ZFE による細胞死を抑制することを確認した (Fig.20)。

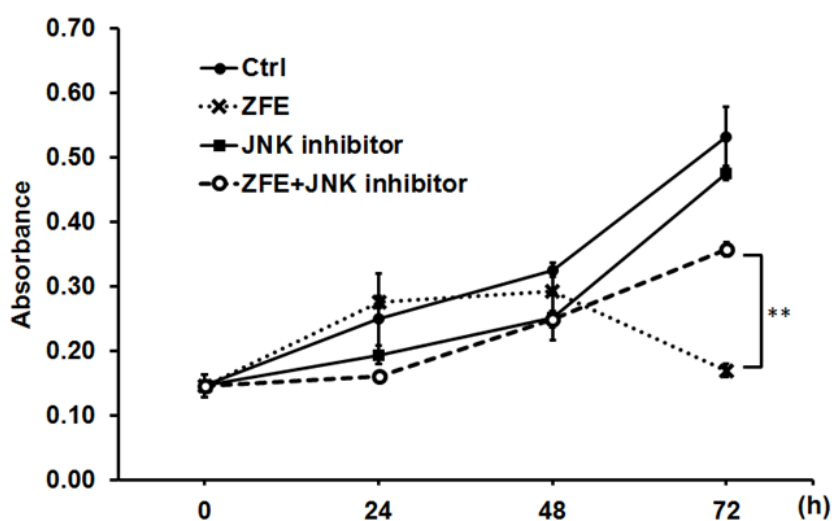


Fig.20 JNK inhibitor が ZFE による細胞死に与える影響

DLD-1 を ZFE 200 $\mu\text{g/ml}$ 含有培地で JNK inhibitor (5 μM SP600125) 非存在下もしくは存在下、0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で図に示す時間培養し、細胞増殖活性の測定を行った。エラーバーは平均値 $\pm$ SD (n=3) を示す。
(** $p < 0.01$; Student's t-test)

2-3-4. JNK activator を単独添加した際の影響

ZFE が引き起こす空胞形成および細胞死に JNK を必要とすることが明らかとなったため、DLD-1 において JNK activator である anisomycin を用いた JNK の活性化によって、同様の現象が見られるかを試みた。その結果、JNK activator は 2 時間で JNK を強力にリン酸化し、その強度は 6 時間以降減弱した。同時に行った光学顕微鏡による観察では DLD-1 に ZFE 添加で見られた空胞形成は出現しなかった (Fig.21)。

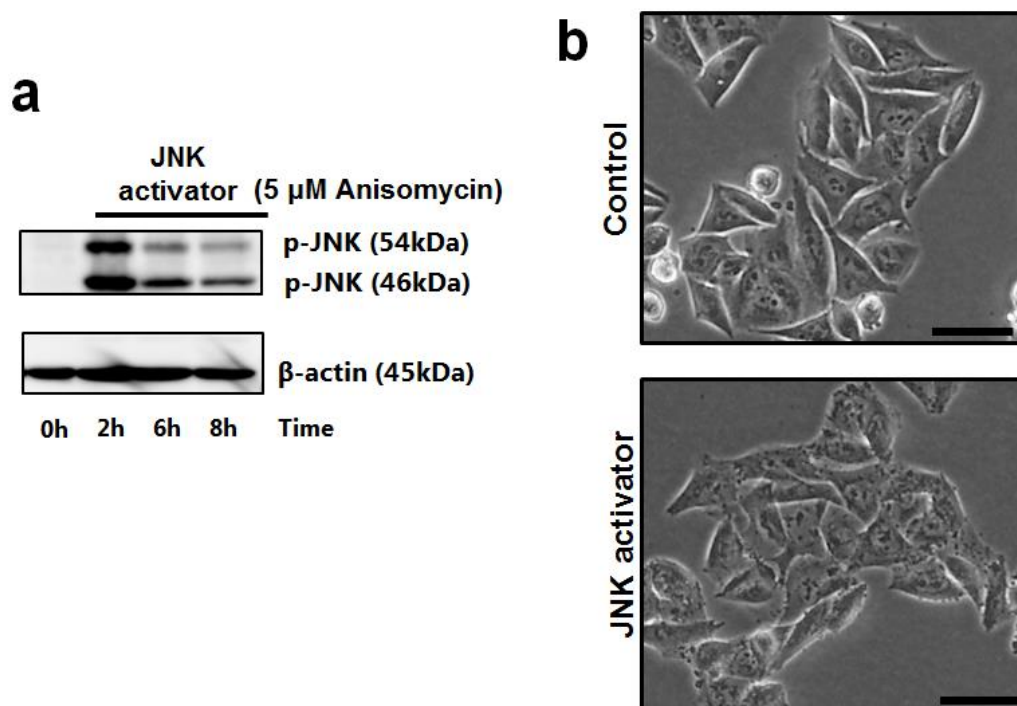


Fig.21 JNK activator anisomycin を添加した際の影響

(a) DLD-1 を JNK activator (5μM anisomycin) 含有培地で図に示す時間培養し、細胞のタンパク質を回収後、図に示す抗体を用いてウエスタンブロット法を行った。
 (b) DLD-1 を JNK activator (5μM anisomycin) 含有もしくは 0.2 % v/v DMSO (コントロール) を含有する培地で 8 時間培養し、光学顕微鏡観察を行った。Scale bars, 50 μm.

2-4. ZFE の主要成分 sanshools に関する検討

ZFE の主要成分である sanshools (hydroxy-α-sanshool, hydroxy-β-sanshool を混合し調整) を DLD-1 に添加し、光学顕微鏡による細胞形態の観察、オートファジーマーカー LC3-II のウエスタンブロット法、細胞増殖活性の測定をそれぞれ行った (Fig. 22)。その結果、sanshools の単独添加ではいずれの検討でも変化が見られなかった。

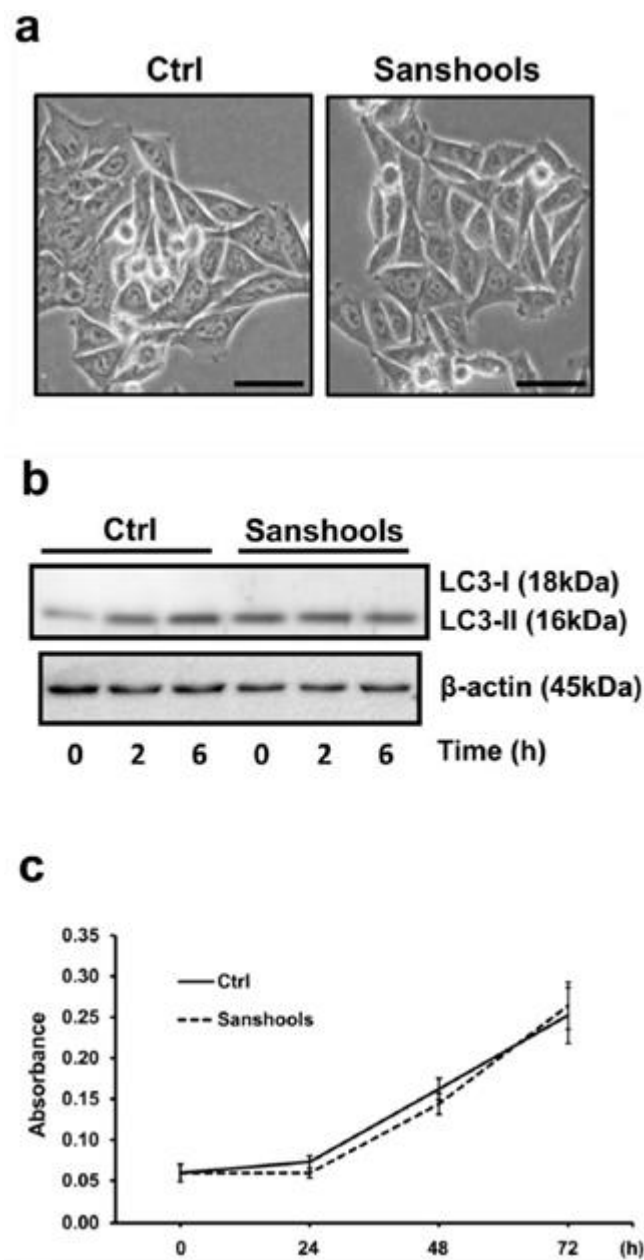


Fig.22 ZFE の主要成分 sanshools の影響

(a) DLD-1 を 38 μ M sanshools (HAS と HBS を同濃度で混合したもの) を含有した培地で 24 時間培養後、光学顕微鏡観察を行った。(b) 同条件で図に示す時間でタンパク質を回収し、ウエスタンブロット法を行った。(c) 同条件で図に示す時間で細胞増殖活性の測定を行った。Scale bars, 50 μ m.

3. 考察

本研究では、ZFE が癌細胞の細胞質にオートファジーによる多量の空胞形成を誘導し、最終的に細胞死を誘導することを明らかにした。さらに、過剰なオートファジーの活性化と JNK を必要因子とするオートファジー細胞死が、ZFE の抗癌作用の主要な機序であることが示唆された。

オートファジーは細胞質成分をリソソームで分解するための主要な細胞内分解機構である¹⁶。オートファジーは細胞内異常タンパク質の排除と再利用、ダメージを受けたミトコンドリアや小胞体のようなオルガネラの除去など、細胞の恒常性維持に寄与している^{17,18}。オートファジー関連遺伝子群 (ATG Genes¹⁹) は酵母からクローニングされ²⁰、2016年時点でATG1~41までが発見されている²¹。その中でもATG8の哺乳類ホモログであるLC3はオートファジーの指標として頻繁に用いられている。LC3は翻訳後、すぐにC末端側のプロセッシングを受けLC3-Iとなり、さらにオートファジーシグナルが誘導されると基質であるPEと結合しLC3-IIとなる²²。LC3-IIはLC3-Iよりも分子量は大きい、疎水性が高いためSDS-PAGE上ではLC3-I は18kDa, LC3-II は16kDa 相当に泳動される。

癌細胞では多くの場合、正常な細胞や組織よりもオートファジーに依存的であると言われている^{23,24}。これは癌細胞が生存困難なストレス環境、低酸素状態、低栄養状態などに曝露されても、増殖に必要なエネルギー源を優先的にオートファジーによって獲得しようとするためである²⁵。

一方、ある状況下では、過剰なオートファジーの活性化が細胞死を引き起こしうることが報告されている。これまでのプログラム細胞死 (アポトーシス、ネクロプトーシス) に加えて、新たな細胞死として過剰なオートファジー発現が引き金となるオートファジー細胞死の概念が登場した²⁶⁻²⁸。

過去にはオートファジー細胞死という名称は単に、「形態学的にオートファジーを伴う細胞死」として用いられてきた²⁹。しかしながら、アポトーシスや他の細胞死におけるストレス応答でも、生存のためにオートファジー自体は起こりうる。そのため近年では、オートファジーの必要性を伴う細胞死にのみ、この名称を用いるべきであるという提言がなされている³⁰。Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)の提案によるとオートファジー細胞死は以下のように定義付けされている³⁰

「細胞死の実行過程でオートファジーが誘導され、かつオートファジーの実行が細胞死に必要である。」

さらに、オートファジー細胞死を確かめる生化学的および機能的な手段について、薬剤および/もしくはRNAiなどの遺伝学的方法によるオートファジー経路の阻害によって細胞死が抑制されること、と提言されている。

オートファジー細胞死は形態学的に、特に電子顕微鏡観察によって、アポトーシス（クロマチン凝集、核の断片化）やネクローシス（細胞膜の破裂、オルガネラの膨張）における特徴が見られず、細胞質にオートファジー構造物（すなわち、オートファゴソームやオートリソソーム）を伴った空胞化が起きる。この形態学的定義を念頭に置き、癌細胞に対してZFEが及ぼす影響を観察した。さらに、この観察結果の補強としてオートファジーマーカーLC3-IIの発現増加という結果が得られた。今回の結果に示したアクチンに対するLC3-II比の増加はオートファゴソーム形成数を反映している。それゆえに、ZFEが引き起こした細胞死が、形態学的および生化学的に「オートファジー細胞死」の定義にある「細胞死の実行過程におけるオートファジーの誘導」を満たしていると言える。

一方、オートファジー細胞死の定義には「オートファジーの実行が細胞死に必要である」ことも要求される。これを解決するため本研究では、遺伝学的方法によるオートファジー経路の阻害によって細胞死が抑制されるかどうかを検討した。ATG5-ATG12複

合体はオートファゴソームの形成に必要なオートファジー早期段階の主要調節因子である³¹。本実験においてはATG5のノックダウンによって、ZFEの引き起こした細胞死およびオートファジーによる空胞形成が明確に抑制された。ここまででZFEが引き起こした細胞死はオートファジー細胞死の定義を満たすことを証明できた。しかし、ZFEの引き起こすオートファジー細胞死の根底にある正確なメカニズムは依然として不明である。

JNK シグナルは、飢餓、酸化ストレス、薬剤などの種々のストレッサーに応答して癌細胞のオートファジー調節に関与している³²⁻³⁴。加えて、近年の研究ではJNKの活性化がオートファジーおよびオートファジー細胞死に関与することが報告されている³⁵⁻³⁷。

本研究では、ZFEがオートファジー細胞死を誘導した癌細胞においてJNKのリン酸化を亢進していることを示した。また、JNK inhibitor によってオートファジーの誘導および細胞死が抑制されることを示した。一方、今回用いた一部の癌細胞 (A549, MCF-7, WiDr) ではこのような変化は見られなかった。これらの結果から、JNKシグナルの活性化がZFEの誘導するオートファジー細胞死に必要であることが明らかとなった。しかしながら、JNK activator の単独添加では強力にJNK活性化を引き起こしたものの、空胞形成が見られなかったことは、オートファジー細胞死の誘導にはJNKの活性化だけでは不十分であること示している。

JNKシグナルはアポトーシスの誘導に関与することでも知られる³⁸。しかしながら今回の結果はZFEの誘導する細胞死は少なくともカスパーゼ依存的なアポトーシスの可能性は低いと考えられる。清水らはアポトーシス経路を阻害した細胞のJNKを活性化すると、代償的にオートファジー細胞死が引き起こされることを示している³⁹。今回の検討では、ZFEによるアポトーシス経路の阻害効果を明らかにできていないため、詳細な検討が必要である。また清水らは子宮頸癌由来HeLa細胞においてはJNKのリン酸化が十分でないためオートファジー細胞死が誘導されにくいことを明らかにしている³⁹。

今後、ZFEによるオートファジー細胞死が有効な癌種を確かめるためには、JNKのリン酸化に与える影響を解析することが重要である。

近年ではオートファジーの調節が癌に対する新たな治療戦略の一つとして考えられている⁴⁰。特にオートファジーの調節による治療法が有効と考えられるのは既存のアポトーシス誘導を主な機序とする抗癌剤に耐性を持つ癌細胞である⁴¹。オートファジーを癌の治療に応用する戦略は主に二つあり、一つは癌のオートファジーを抑制して抵抗性を弱め、既存の治療法の効果を高めること、もう一つはアポトーシス経路とは別に、オートファジー細胞死を誘導することである。

前述したように、一般的に多くの癌細胞は厳しい環境下で生存するためにオートファジーへの依存度が高い。すなわち癌のオートファジー抑制もしくは阻害が治療標的となりうる可能性を示唆しており、実際に癌治療目的のためオートファジー阻害剤と抗癌剤を組み合わせた前臨床試験は行われている⁴²⁻⁴⁵。

一方、オートファジー細胞死はオートファジーの阻害よりも、むしろオートファジーの過剰な亢進によって起こる。オートファジー細胞死はアポトーシス経路に必要なBax/Bak 遺伝子をノックダウンした細胞において、アポトーシス代償的に行われるプログラム細胞死として発見された⁴⁶。その後、生体内におけるオートファジー細胞死の代表例として、ショウジョウバエの発生過程で実際に起きていることが証明された⁴⁷⁻⁴⁹。哺乳類の個体レベルでのオートファジー細胞死に関しては十分な解析が進んではないが、細胞レベルでの解析ではプログラム細胞死の機能として確かに存在していると理解される⁵⁰。このように現在のアポトーシス誘導を主流とする抗癌剤耐性を持つ細胞に対して、オートファジー細胞死を誘導するという戦略がある。

オートファジー細胞死を誘導する物質として、特に天然物由来成分の報告が多数ある。有効な治療標的が模索されているトリプルネガティブ乳癌細胞に対して、植物由来の物質であるParthenolide⁵¹やPhysagulide P⁵²がJNK活性化を伴うオートファジー細胞死

を引き起こすという報告や、大腸癌細胞 HCT116や乳癌細胞 MCF-7, MDA-MB-231に対してウコンの主成分であるクルクミン^{53,54} が同様にJNKの関与する細胞死を引き起こすという報告が見られ、これらは今回のZFEによるオートファジー細胞死誘導と類似する。他に、赤ワインなどに含まれるレスベラトロールでもin vitroで各種癌細胞にオートファジー細胞死を誘導することが報告されており、その機序にはmTOR, AMPK, JNK などの経路が関与するとされる^{45,55-57}。

このように、ZFEを含むオートファジー細胞死を誘導する天然物は、新たな創薬資源の一つとして有望な出発点となりうるだろう。

ZFEは山椒の含有する様々な化合物の混合物である。山椒に含まれる化合物には、果皮の精油成分としてはcitronellal, limonene, 1- β -phellandrene, geraniol, xanthoxinが報告されている⁵⁸。しかしながら、昨今の漢方製剤エキスの製法であるスプレードライ法では精油成分は揮発しほとんど含まれていないと考えられている。今回ツムラより提供を受けた山椒熱水抽出物についても同様の製法であり、精油成分の関与は考えにくい。他には、flavonoid類としてrutin, hyperoside, quercitrin を含むとされる⁵⁹⁻⁶¹。これら成分についてオートファジー誘導もしくは細胞死誘導に関する報告⁶²⁻⁶⁵も見られるが今回ZFEが引き起こしたオートファジー細胞死への関与については更なる解析が必要である。

本研究ではZFEの含有する化合物の中で最も割合の高い、sanshools (HASとHBSの混合物) について検討を行った。HASにはいくつかの生理作用が知られている。HASは、腸管上皮細胞を直接刺激し、強力な血管拡張ホルモンであるアドレノメデュリンの産生を増加させる⁶⁶。また、序論でも述べたようにKCNK9カリウムチャネルの阻害によって腸管運動の亢進に関わることも報告されている¹³。しかし、sanshools と癌との関連性は過去にも報告されておらず、本結果でもsanshoolsのみを添加した結果では、抗癌作用を確認することはできなかった。ZFEの含有するオートファジー細胞死に関与

する成分については、微量に含まれるflavonoid類や未同定の成分、あるいは複数の物質の相互作用である可能性も考えられ、今後の重要な検討課題である。

4. 結論

本研究結果をまとめると、山椒熱水抽出物であるZFEが癌細胞の細胞質に異常な空胞形成および細胞死を引き起こすことを足掛かりに解析を進め、ZFEが癌細胞にJNKシグナルを必要とするオートファジー細胞死を引き起こしていることを明らかにした。ATG5のノックダウン実験、JNK inhibitor および JNK activatorによる検討結果から、現在までに明らかにしたZFEのオートファジー細胞死誘導機序を図に示す（Fig.23）。

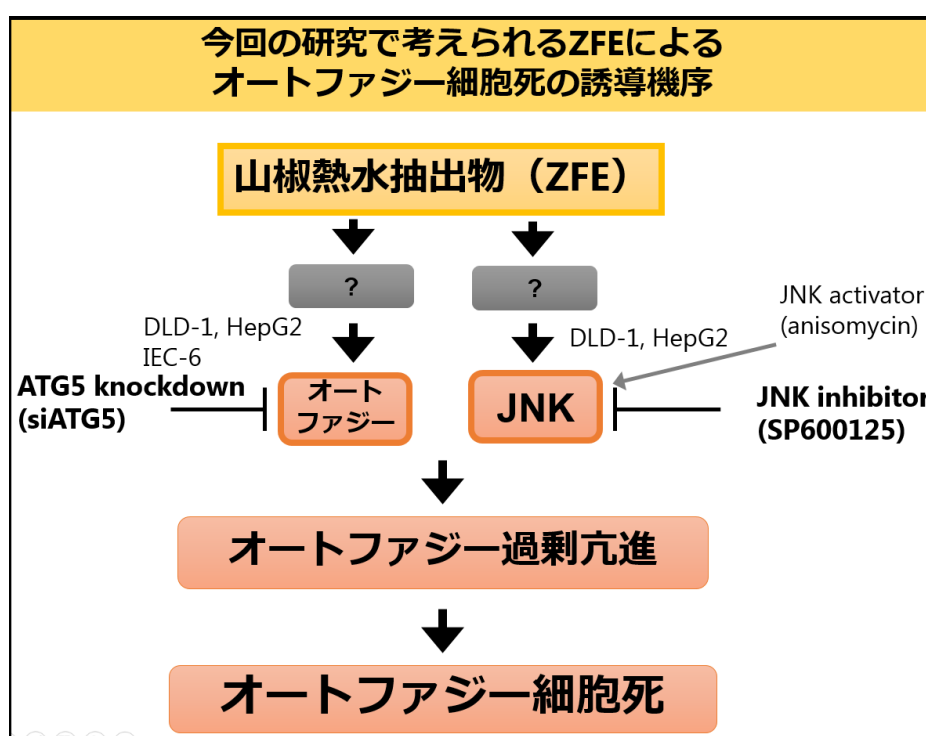


Fig.23 本研究で予測されるZFEによるオートファジー細胞死誘導機序

ZFEが誘導するオートファジー細胞死には少なくとも、「オートファジーの（過剰な）亢進」と「JNKシグナル活性化」の2つの要素が必要であり、それらを担う単体もしくは複数の化合物がZFEに含有されていると想定された。DLD-1とHepG2細胞ではそれら2つの要素によってオートファジー細胞死が誘導されたと考えられ、IEC-6ではオートファジーの亢進は起こっているものの、JNKの活性化は見られていないため、細胞死には至らなかったと推測できる。また、癌細胞でもオートファジーやJNKの活性化が見られる

ものとそうでないものがあり、細胞による基底レベルのオートファジー活性の違いやJNK活性化の度合いに着目し、今後ZFEの有効性を検証していく必要がある。

本研究では山椒熱水抽出物ZFEが癌細胞に対し、JNK活性化を必須とするオートファジー細胞死を誘導することを初めて明らかにした。本成果は、オートファジー細胞死を標的とした臨床応用に向け、新規抗癌剤開発のシーズとなることが期待される。

本論文の内容は、学術雑誌に掲載された下記の原著論文よりデータの引用を行っている。

1. Nozaki, R. et al. "Zanthoxylum fruit extract from Japanese pepper promotes autophagic cell death in cancer cells." *Oncotarget* **7**, 70437-70446, doi: 10.18632/oncotarget.11926. (2016)

5. 実験材料および実験方法

5-1. 実験に使用した試薬と抗体

使用試薬の入手先を以下に示す。

Dimethyl sulfoxide — Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)

Doxorubicin — Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

SP600125 — Sigma-Aldrich

Anisomycin — Sigma-Aldrich

Hydroxy- α -sanshool — Tsumura (Tokyo, Japan)

Hydroxy- β -sanshool — Tsumura

使用抗体の入手先を以下に示す。

anti-LC3 pAb (PD014) — Medical and Biological Laboratories Co. Ltd (Nagoya, Japan)

anti-Atg5 mAb (M153-3) — Medical and Biological Laboratories Co. Ltd

anti-phospho-JNK pAb (Thr183/Tyr185) (#9251S) — Cell Signaling (Danvers, MA, USA)

anti-JNK pAb (#9252S) — Cell Signaling

anti- β -Actin mAb (#4970) — Cell Signaling

5-2. ZFE の調整方法

山椒の熱水抽出物は株式会社ツムラ (Tokyo, Japan) より提供された。ツムラによる山椒抽出物の精製法について以下に示す。山椒 (*Zanthoxylum piperitum*) の果皮を精製水で 100°C、1 時間抽出し、可溶性抽出画分を不溶性画分から分離後、減圧下で水を除去することによって濃縮した。更にスプレードライ法によって乾燥抽出粉末を精製した。この乾燥抽出粉末を ZFE とし、以後実験に用いた。ZFE 粉末 10 mg を DMSO 100 μ l に溶解し、10 分間の超音波処理を行った後、3% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 含有 DMEM (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 10 mL 中

に溶解し、0.22 μm フィルターユニット (Toyo Roshi Kaisya Ltd., Tokyo, Japan) に通し濾過した。これを ZFE 溶液の原液とし、実験に必要な各種濃度に DMEM で希釈して用いた。

5-3. 実験に用いた細胞と培養方法

ヒト大腸癌由来細胞 DLD-1、Caco-2、WiDr、ヒト肝臓癌由来細胞 HepG2、ヒト肺癌由来細胞 A549、ヒト乳癌由来細胞 MCF-7 およびラット小腸上皮由来細胞 IEC-6 は 10% FBS 含有 DMEM 培地にて、37°C、5% CO₂ にて培養した。

5-4. 光学顕微鏡観察

各細胞の観察には CKX41 倒立型顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を用いた。

5-5. 細胞増殖活性の測定

細胞培養用 96-well プレート に対し、ヒト由来各種癌細胞を 4×10^3 cells/well の密度で、ラット小腸細胞 IEC-6 を 6×10^3 cells/well の密度で播種し、接着のため一晚培養した。翌日細胞の接着を確認後、ZFE もしくは試薬を各種実験結果に記載した薬剤の終濃度に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。陰性対照群は DMSO を終濃度 0.2% に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。これらの細胞は 37°C , 5% CO₂ 条件下で 24, 48, 72 時間 の培養を行った。細胞増殖の測定試薬は、CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega, Fitchburg, WI) を用い、試薬を添加し 1 時間後に吸光度を測定した。吸光度はプレートリーダー (Infinite f200; TECAN, Männedorf, Switzerland) を用いて測定した。

5-6. トリパンブルー染色と生細胞数のカウント

DLD-1 細胞を 12-well プレートに対し 5×10^4 cells/well の密度で播種し 48 時間培養した。次に、ZFE を終濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。陰性対照群は DMSO を終濃度 0.2% に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。これらの細胞は 37°C , 5% CO₂ 条件下で 48, 72 時間の培養を行った。細

胞を回収し、トリパンブルーを終濃度 0.2% となるよう細胞懸濁液に添加した。染色した細胞は Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) を用いて計測した。細胞生存率は生細胞（トリパンブルー陽性を除いた細胞）の割合で示した。それと同時に生細胞数も計測した。

5-7. Caspase 3/7 活性測定

DLD-1 細胞の播種培養条件については、細胞増殖活性の測定と同様の条件とした。接着を確認後、ZFE を終濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。陰性対照群は DMSO を終濃度 0.2% 、陽性対照群は doxorubicin を終濃度 7 μM に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。Caspase 3/7 活性測定には Caspase-Glo 3/7 assay kit (Promega) を用いた。各ウェルの蛍光強度測定にはマルチプレートリーダー (Infinite 200 PRO; Tecan) を用いた。測定した値からブランク（培地のみ、細胞無し）を差し引き、データは陰性対照に対する倍率で示した。

5-8. 電子顕微鏡観察

DLD-1 細胞を 100-mm ディッシュで 100%コンフルエントとなる前まで培養し、ZFE を終濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地で 24 時間培養した。陰性対照群は DMSO を終濃度 0.2% に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地で 24 時間培養した。細胞は 2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒドを含有する PBS (pH 7.2) にて 4°C で 30 分の固定を行い、続いて 1% OsO_4 を含有する PBS にて 4°C で 1 時間の処理を行った。細胞をディッシュから静かに剥がし、遠心してペレット化した。次に、ペレット化下細胞を段階的にエタノールで脱水し、最終的に Epon812 に包埋した。ウルトラミクロトームを用いて超薄切切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛にて染色した後、透過型電子顕微鏡 (H-7650; Hitachi High Technologies, Tokyo, Japan) を用いて観察を行った。

5-9. ウェスタンブロッティング

細胞培養用 6-well プレートに対し、ヒト由来各種癌細胞を 4×10^3 cells/well の密度

で、ラット小腸細胞 IEC-6 を 6×10^3 cells/well の密度で播種し、接着のため一晩培養した。翌日細胞の接着を確認後、ZFE もしくは試薬を各種実験結果に記載した薬剤の終濃度に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。陰性対照群は DMSO を終濃度 0.2% に調整した 3% FBS 含有 DMEM 培地に置き換えた。これらの細胞は 37°C, 5% CO₂ 条件下で各種実験結果に示した時間で培養を行った。その後、細胞を冷 TBS (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 137 mM NaCl) で 2 回ウォッシュし、100 μ l の cell lysis buffer (25 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.8% w/v SDS, 4% w/v glycerol, 0.008% w/v bromophenol blue, 2% v/v 2-mercaptoethanol) で溶解した。細胞溶解液は 95°C で 5 分間加熱し、10,000g で 5 分間遠心し、細胞タンパク質を回収した。その後、各サンプル 10 μ l を 10% もしくは 12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルにローディングし、トリス-グリシンバッファー (Tris 25 mM, glycine 191 mM, 0.1% w/v SDS) 中で電気泳動を行った。次に、Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA, USA) に対し、Transfer Buffer (Tris 25 mM, glycine 191 mM, 10% MeOH) を用いてセミドライ式により転写を行った。転写したメンブレンを 5% スキムミルク含有 TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 137 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) に浸して室温で 1 時間ブロッキングを行い、以下に示した抗体 (anti-LC3 pAb, anti-Atg5 mAb, anti-phospho-JNK pAb, anti-JNK pAb, and anti- β -actin mAb) を添加し、室温で一晩反応させた。その後メンブレンを TBS-T で 3 回洗浄し、TBS で希釈した horseradish peroxidase-conjugated antibody against rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) に室温で 30 分反応させた。Immobilon Western HRP Substrate detection reagents (Millipore) を用いて発光させ、LAS 4010 system (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) にてバンドの検出を行った。

5-10. siRNA の導入

Small interfering RNAs (siRNAs) targeting ATG5 (NM_004849) と scrambled siRNA は QIAGEN (Hilden, Germany) より購入したものをを用いた。siRNA のターゲットシーケンスを次に示す。

ATG5: 5'-AACCTTTGGCCTAAGAAGAAA-3'

ATG5#2: 5'-CTAGGAGATCTCCTCAAAGAA-3'.

細胞培養用 6-well プレートにて DLD-1 細胞を 60-70% コンフルエントまで培養し、Opti-MEM (Thermo) で希釈した siRNA を HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) と共に細胞に添加し、siRNA の導入を行った。siRNA 導入後、細胞タンパク質、Total RNA の回収を行った。また、細胞増殖活性の測定においては、siRNA 導入後の細胞を一度回収し、96-well プレートに播種し直して実験を行った。

5-11. qRT-PCR

Total RNA は ISOGEN reagent (Nippon Gene, Toyama, Japan) を用いて抽出を行った。抽出した RNA から PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて以下の条件で cDNA の合成を行った。

[37°C – 15 分、85°C – 5 秒、4°C – ∞]

作製した各 cDNA (10 ng) をテンプレートとして Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) を使い、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) にて定量的 PCR を行った。

[50°C – 2 分、95°C – 2 分]

↓

[95°C – 15 秒、60°C – 30 秒 72°C – 1 分] × 45 cycles

↓

[95°C – 15 秒、60°C – 15 秒、95°C – 15 秒、]

目的遺伝子の発現量は $\Delta\Delta CT$ 法によって算出し、コントロールとして GAPDH を用いた。

6. 参考文献

- 1 Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 111-129 (2015).
- 2 Surh, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3**, 768-780 (2003).
- 3 Kono, T. Hata, T., Morita, S. *et al.* Goshajinkigan oxaliplatin neurotoxicity evaluation (GONE): a phase 2, multicenter, randomized, doubleblind, placebocontrolled trial of goshajinkigan to prevent oxaliplatininduced neuropathy. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**, 1283-1290, (2013).
- 4 Kono, T., Mishima, H., Shimada, M., *et al.* Preventive effect of goshajinkigan on peripheral neurotoxicity of FOLFOX therapy: a placebo-controlled double-blind randomized phase II study (the GONE Study). *Jpn J Clin Oncol* **39**, 847-849, (2009).
- 5 Kono, T., Satomi, M., Chisato, N. *et al.* Topical Application of Hangeshashinto (TJ-14) in the Treatment of Chemotherapy-Induced Oral Mucositis. *World J Oncol* **1**, 232-235, (2010).
- 6 Takeda, H., Sadakane, C., Hattori, T. *et al.* Rikkunshito, an herbal medicine, suppresses cisplatin-induced anorexia in rats via 5-HT₂ receptor antagonism. *Gastroenterology* **134**, 2004-2013, (2008).
- 7 Kono, T., Kanematsu, T. & Kitajima, M. Exodus of Kampo, traditional Japanese medicine, from the complementary and alternative medicines: is it time yet? *Surgery* **146**, 837-840, (2009).
- 8 Kono, T., Shimada, M., Yamamoto, M. *et al.* Complementary and synergistic therapeutic effects of compounds found in Kampo medicine: analysis of daikenchuto. *Front Pharmacol* **6**, 159, (2015).
- 9 Hasebe, T., Matsukawa, J., Ringus, D. *et al.* Daikenchuto (TU-100) Suppresses Tumor Development in the Azoxymethane and APC(min/+) Mouse Models of Experimental Colon Cancer. *Phytother Res* **31**, 90-99, (2017).
- 10 坂牧佑一、大建中湯の抗腫瘍効果に関する検討、平成 25 年度薬学部卒業論文集、(2014).
- 11 Munekage, M., Kitagawa, H., Ichikawa, K. *et al.* Pharmacokinetics of daikenchuto, a traditional Japanese medicine (kampo) after single oral administration to healthy Japanese volunteers. *Drug Metab Dispos* **39**, 1784-1788, (2011).

- 12 Kono, T., Kaneko, A., Omiya, Y. *et al.* Epithelial transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-dependent adrenomedullin upregulates blood flow in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **304**, 28 (2013).
- 13 Kubota, K., Ohtake, N., Ohbuchi, K. *et al.* Hydroxy-alpha sanshool induces colonic motor activity in rat proximal colon: a possible involvement of KCNK9. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G579-590, (2015).
- 14 Lee, J. & Lim, K. T. Inhibitory effect of phytoglycoprotein (24 kDa) on hepatocarcinogenesis in N-nitrosodiethylamine-treated ICR mice. *J Pharm Pharmacol* **63**, 840-848, (2011).
- 15 Hirokawa, Y., Nheu, T., Grimm, K. *et al.* Sichuan pepper extracts block the PAK1/cyclin D1 pathway and the growth of NF1-deficient cancer xenograft in mice. *Cancer Biol Ther* **5**, 305-309 (2006).
- 16 Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 211-216 (2001).
- 17 Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12 (2010).
- 18 Pan, H., Chen, L., Xu, Y. *et al.* Autophagy-associated immune responses and cancer immunotherapy. *Oncotarget* **7**, 21235-21246, (2016).
- 19 Klionsky, D. J. Look people, "Atg" is an abbreviation for "autophagy-related." That's it. *Autophagy* **8**, 1281-1282, (2012).
- 20 Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174 (1993).
- 21 Klionsky, D. J. Abdelmohsen, K., Abe, A. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1-222 (2016).
- 22 Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728, (2000).
- 23 Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51-64, (2006).
- 24 Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A. *et al.* Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* **73**, 3-7, (2013).
- 25 White, E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* **125**, 42-46, (2015).
- 26 Liu, Y. & Levine, B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* **22**, 367-376, (2015).

- 27 Shen, H. M. & Codogno, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* **7**, 457-465 (2011).
- 28 Yu, L., Alva, A., Su, H. *et al.* Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**, 1500-1502, (2004).
- 29 Clarke, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* **181**, 195-213 (1990).
- 30 Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**, 107-120 (2012).
- 31 Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-398 (1998).
- 32 Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. *et al.* Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 81-94, (2014).
- 33 Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., *et al.* JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**, 678-688, (2008).
- 34 Zhou, Y. Y., Li, Y., Jiang, W. Q. *et al.* MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep* **35**, (2015).
- 35 Puissant, A., Robert, G., Fenouille, N. *et al.* Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res* **70**, 1042-1052, (2010).
- 36 Vegliante, R., Desideri, E., Di Leo, L. *et al.* Dehydroepiandrosterone triggers autophagic cell death in human hepatoma cell line HepG2 via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression. *Carcinogenesis* **37**, 233-244, (2016).
- 37 Zhang, C., Jia, X., Wang, K. *et al.* Polyphyllin VII Induces an Autophagic Cell Death by Activation of the JNK Pathway and Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Pathway in HepG2 Cells. *PLoS One* **11**, e0147405, (2016).
- 38 Dhanasekaran, D. N. & Reddy, E. P. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245-6251, (2008).
- 39 Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y. *et al.* Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* **29**, 2070-2082, (2010).
- 40 Janku, F., McConkey, D. J., Hong, D. S. *et al.* Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **8**, 528-539, (2011).
- 41 Kumar, A., Singh, U. K. & Chaudhary, A. Targeting autophagy to overcome drug resistance in cancer therapy. *Future Med Chem* **7**, 1535-1542, (2015).
- 42 Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S. *et al.* Autophagy modulation for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* **11**, 169-176, (2011).

- 43 Schoenlein, P. V., Periyasamy-Thandavan, S., Samaddar, J. S., *et al.* Autophagy facilitates the progression of ERalpha-positive breast cancer cells to antiestrogen resistance. *Autophagy* **5**, 400-403 (2009).
- 44 Samaddar, J. S., Gaddy, V. T., Duplantier, J. *et al.* A role for macroautophagy in protection against 4-hydroxytamoxifen-induced cell death and the development of antiestrogen resistance. *Mol Cancer Ther* **7**, 2977-2987, (2008).
- 45 Chen, N. & Karantza, V. Autophagy as a therapeutic target in cancer. *Cancer Biol Ther* **11**, 157-168 (2011).
- 46 Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N. *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**, 1221-1228, (2004).
- 47 Berry, D. L. & Baehrecke, E. H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**, 1137-1148, (2007).
- 48 Denton, D., Nicolson, S. & Kumar, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ* **19**, 87-95, (2012).
- 49 Chang, Y. Y. & Neufeld, T. P. Autophagy takes flight in *Drosophila*. *FEBS Lett* **584**, 1342-1349, (2010).
- 50 Kroemer, G. & Jaattela, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**, 886-897, (2005).
- 51 D'Anneo, A., Carlisi, D., Lauricella, M. *et al.* Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer. *Cell Death Dis* **4**, e891, (2013).
- 52 Yu, P., Zhang, C., Gao, C. Y. *et al.* Anti-proliferation of triple-negative breast cancer cells with physagulide P: ROS/JNK signaling pathway induces apoptosis and autophagic cell death. *Oncotarget* **8**, 64032-64049, (2017).
- 53 Lee, Y. J., Kim, N. Y., Suh, Y. A. *et al.* Involvement of ROS in Curcumin-induced Autophagic Cell Death. *Korean J Physiol Pharmacol* **15**, 1-7, (2011).
- 54 Wang, K., Zhang, C., Bao, J. *et al.* Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death. *Sci Rep* **6**, 26064, (2016).
- 55 Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S. *et al.* Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* **72**, 29-39, (2007).
- 56 Hasima, N. & Ozpolat, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds

- as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis* **5**, e1509, (2014).
- 57 Oipari, A. W., Jr., Tan, L., Boitano, A. E. *et al.* Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* **64**, 696-703 (2004).
- 58 鳥居塚和生. モノグラフ 生薬の薬効・薬理. (医歯薬出版株式会社, 2003).
- 59 Yamazaki, E., Imagaki, M., Kurita, O. *et al.* Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum* DC.) fruit. *Food Chemistry* **100**, 171-177. (2007)
- 60 Chang, H. J., Ki, H., S. Tyrosinase inhibitor isolated from the leaves of *Zanthoxylum piperitum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **68**, 1984-1987 (2004)
- 61 Yamada, Y. Suppressible Compounds from Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) against the Fishy Trimethylamine Odor. *J. Home Econ. Jpn* **60**, 723-726 (2009)
- 62 Fu, T., Wang, L., Jin, X. N. *et al.* Hyperoside induces both autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* **37**, 505-518, (2016).
- 63 Zhu, X., Ji, M., Han, Y. *et al.* PGRMC1-dependent autophagy by hyperoside induces apoptosis and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin treatment. *Int J Oncol* **50**, 835-846 (2017).
- 64 Perk, A. A., Shatynska-Mytsyk, I., Gercek, Y. C. *et al.* Rutin mediated targeting of signaling machinery in cancer cells. *Cancer Cell Int* **14**, 124 (2014).
- 65 Zhi, K., Li, M., Bai, J. *et al.* Quercitrin treatment protects endothelial progenitor cells from oxidative damage via inducing autophagy through extracellular signal-regulated kinase. *Angiogenesis* **19**, 311-324 (2016)
- 66 Kono, T., Omiya, Y., Hira, Y. *et al.* Daikenchuto (TU-100) ameliorates colon microvascular dysfunction via endogenous adrenomedullin in Crohn's disease rat model. *J Gastroenterol* **46**, 1187-1196, (2011).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました、北海道大学大学院薬学研究院 臨床病態解析学研究室 武田宏司 教授に深謝申し上げます。武田先生には、外部からの入学者である私を快く受け入れて頂いたことに加え、充実した研究環境、実験手法、研究戦略、論理的思考、プレゼンテーション、学会発表ならびに論文執筆など、研究全般において懇切丁寧にご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

また、懇切丁寧な指導と的確な助言を下さり、私の研究の基礎を形作って下さった 札幌東徳洲会病院 先端外科センター長 河野透 博士に深く感謝を申し上げます。

本論文の副査として御審査を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 臨床薬剤学研究室 井関健 教授ならびに小林正紀 准教授に深く感謝を申し上げます。

さらに、実験において多くの有益なご助言、ご指導を頂きました北海道大学大学院薬学研究員 臨床病態解析学研究室 中川宏治 講師、大久保直登 助教に深謝致します。中川宏治講師には併せて、副査としてご審査を賜り重ねて御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり種々の検討にご協力頂きました、本研究室卒業生 坂牧佑一 学士、桶谷芳里 学士ならびに臨床病態解析学研究室の全ての方々に心より感謝申し上げます。

研究生生活を続けるために働かせて頂いた、札幌東徳洲会病院 臨床研究センターの職員の皆様にも深く感謝を申し上げます。

最後に、長い間いつも支えと励ましをくれた親愛なる家族に多大なる感謝を捧げます。