

2018 年度 課程博士学位論文

*Cassia auriculata* 種子含有アントラセノン二量体の *microphthalmia*  
関連転写因子を介したメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用

王 巍程

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Weicheng Wang, Yi Zhang, Souichi Nakashima, Seikou Nakamura, Tao Wang, Masayuki Yoshikawa, Hisashi Matsuda. Inhibition of melanin production by anthracenone dimer glycosides isolated from *Cassia auriculata* seeds. *J. Nat. Med.* in press.  
(<https://doi.org/10.1007/s11418-018-01276-2>) [第 1 章, 第 2 章:第 1 節]
  
- 2) Weicheng Wang, Souichi Nakashima, Seikou Nakamura, Yoshimi Oda, Hisashi Matsuda. Anti-proliferative effect of auriculataoside A on B16 melanoma 4A5 cells by suppression of Cdc42-Rac1-RhoA signaling protein levels. *J. Nat. Med.* in press.  
(<https://doi.org/10.1007/s11418-018-01278-0>) [第 2 章:第 2 節]

# 目次

略語表.....	1
序章.....	4
本論.....	11
第一章 <i>C. auriculata</i> 種子含有アントラセノン二量体の単離と構造決定.....	11
第一節 <i>C. auriculata</i> 種子含有アントラセノンの抽出および単離.....	11
第二節 含有成分の化学構造.....	13
第一項 新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (1) および B (2) の化学構造.....	13
第二項 Auriculataoside A (1) および B (2) の立体化学.....	17
小括.....	19
第二章 メラノーマ細胞に与える影響の検討.....	20
第一節 メラノーマ細胞に対する単離化合物の細胞増殖およびメラニン生成への影響.....	20
第一項 Theophylline のメラニン生成およびメラノーマ細胞生存率への影響.....	21
第二項 単離化合物のメラニン生成への影響.....	23
第三項 TYR に対する阻害作用.....	28
第四項 自動酸化抑制作用.....	29
第五項 Auriculataoside A (1) および B (2) の TYR, TRP-1, TRP-2 および 転写因子 MITF タンパク質発現量への影響.....	30
第二節 Auriculataoside A (1) のメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用の検討.....	33
第一項 Auriculataoside A (1) の B16 melanoma 4A5 細胞および HDF 細胞に対する増殖抑制作用の検討.....	33
第二項 B16 melanoma 4A5 細胞の発現量変化タンパク質の解析.....	38
第三項 Cdc42, Rac1 および RhoA のタンパク質発現への影響.....	39
第四項 細胞周期への影響.....	42
小括.....	49
結論.....	50
実験の部.....	52
第一章の実験.....	52
第一節の実験.....	53
第二節の実験.....	54
第二章の実験.....	56
第一節の実験.....	58
第二節の実験.....	62
引用文献.....	65
謝辞.....	74
Supplemental Data.....	75

## 略語表

AC:	Adenylate cyclase
AKT (PKB):	Protein kinase B
APC:	Adenomatous polyposis coli
AMPK:	AMP-activated protein kinase
ATP:	Adenosine triphosphate
BCA:	Bicinchoninic acid
BCL2:	B-cell leukemia-2
BRAF:	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CAFs:	Cancer associated fibroblasts
CaMK:	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase
cAMP:	Cyclic adenosine monophosphate
CD:	Circular dichroism
Cdc42:	Cell division cyclin 42
CDK2:	Cyclin-dependent kinase-2
CDKI:	Cyclin-dependent kinase inhibitor
CK1 $\alpha$ :	Casein kinase-1 $\alpha$
Conc.	Concentration
CREB:	cAMP-response element binding protein
c-Myc:	Cellular-myelocytomatosis viral oncogene
CT:	Computed tomography
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte (associated) antigen-4
DHICA:	5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid
DMEM:	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DNA:	Deoxyribonucleic acid
Elu.:	Euate
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
Ext.:	Extract
FAB-MS	Fast atom bombardment-mass spectrometer
FBS:	Fetal bovine serum
FDA:	Food and drug administration
Fr.:	Fraction
GAP:	GTPase activating protein
GDI:	GDP dissociation inhibitor

GDP:	Guanosine diphosphate
GEF:	Guanine nucleotide exchange factor
GSK-3 $\beta$ :	Glycogen synthase kinase-3 $\beta$
GTP:	Guanosine triphosphate
GTPase:	Guanosine triphosphatase
HMBC:	Heteronuclear multiple-bond connectivity
HPLC:	High performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub> :	Half maximal (50%) inhibitory concentration
IR:	Infrared absorption spectrometry
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
LC-MS/MS:	Liquid chromatograph-tandem mass spectrometer
L-DOPA:	L-3,4-Dihydroxyphenylalanine
LRP:	Low-density lipoprotein receptor related protein
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MEK:	Mitogen-activated protein kinase kinase
mir:	MicroRNA
MITF:	Microphthalmia-associated transcription factor
MRI:	Magnetic resonance imaging
mRNA:	Messenger ribonucleic acid
$\alpha$ -MSH:	$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone
MSHR:	Melanocyte stimulating hormone receptor
mTOR:	Mammalia target of rapamycin
MTT:	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2- <i>H</i> -tetrazolium bromide
NADH:	Lipoamide reductase
NF- $\kappa$ B:	Nuclear factor-kappa B
NMR:	Nuclear magnetic resonance
NOESY:	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NUAK1 (ARK5):	AMPK-related protein kinase-5
ODS:	Octadecylsilyl
PAGE:	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS:	Phosphate buffered saline
PCP:	Planar cell polarity
PDE:	Phosphodiesterases
PK1:	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PD-1:	Programmed cell death-1
PD-L1:	Programmed cell death ligand-1

PET:	Positron emission tomography
Pi:	Phosphate
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
PKA:	Protein kinase A
PKC:	Protein kinase C
PLC- $\beta$	Phospholipase C- $\beta$
PVDF:	Polyvinylidene fluoride
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Raf:	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
RhoA:	Rac homolog gene family member A
R.t.:	Room temperature
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
TLC:	Thin layer chromatography
TRP-1:	Tyrosinase-related protein-1/DHICA oxidase
TRP-2:	Tyrosinase-related protein-2/Dopachrome tautomerase
TMS	Tetramethylsilane
T-TBS:	Tween-Tris buffered saline
TYR:	Tyrosinase
UV:	Ultraviolet

## 序章

メラノサイトは胎生期における神経節を起源とし、表皮基底層、毛嚢、目のブドウ膜、口腔粘膜、内耳、腹腔膜、眼窩に分布する。皮膚における表皮細胞のおよそ8%はメラノサイトで、メラニンの生成により、紫外線の傷害から皮膚を保護する重要な役割を担っている<sup>1,2</sup>。メラノサイトの細胞小器官であるメラノソームはエンドソームからの膜輸送を起源に形成され、成熟過程に従って、メラニンの合成、貯蔵および輸送する役割を担っている<sup>3</sup>。皮膚メラニンの生成は、紫外線の照射により活性化されたメラノサイトで、 $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)<sup>4,5</sup> 刺激ホルモンの分泌により adenylate cyclase (AC) が活性化され、cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 量を増加させることで細胞内シグナル伝達を活性化する。活性化した cAMP が転写因子である microphthalmia-associated transcription factor (MITF) の活性化、メラニン生成に重要なタンパク質であるチロシナーゼ (tyrosinase, TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質-1 (tyrosinase-related protein 1/5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid oxidase, TRP-1/DHICA oxidase) および TRP-2 (dopachrome tautomerase) といった酵素の messenger ribonucleic acid (mRNA) 転写および翻訳を促す。次に、メラノソームで、L-tyrosine を基質として、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)、dopaquinone を経て dopachrome が生成されるが、dopachrome 以降は自動的に酸化・重合が繰り返されることでメラニンが生成される (Figure 1)<sup>6-8</sup>。

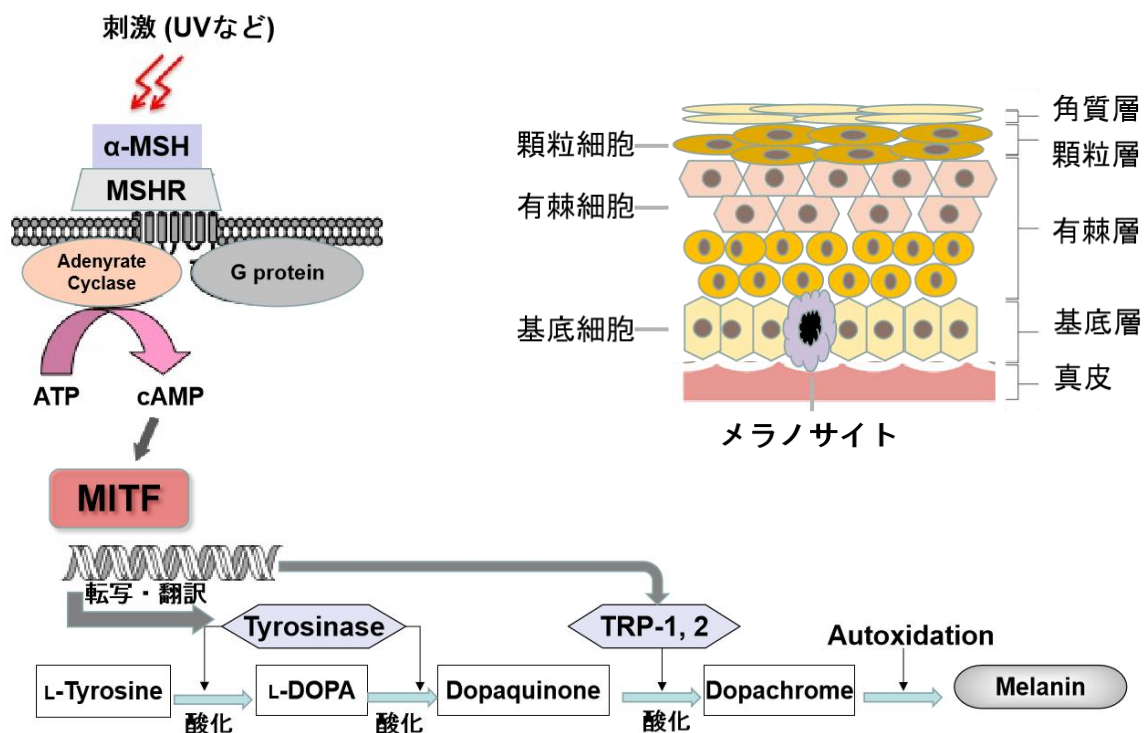
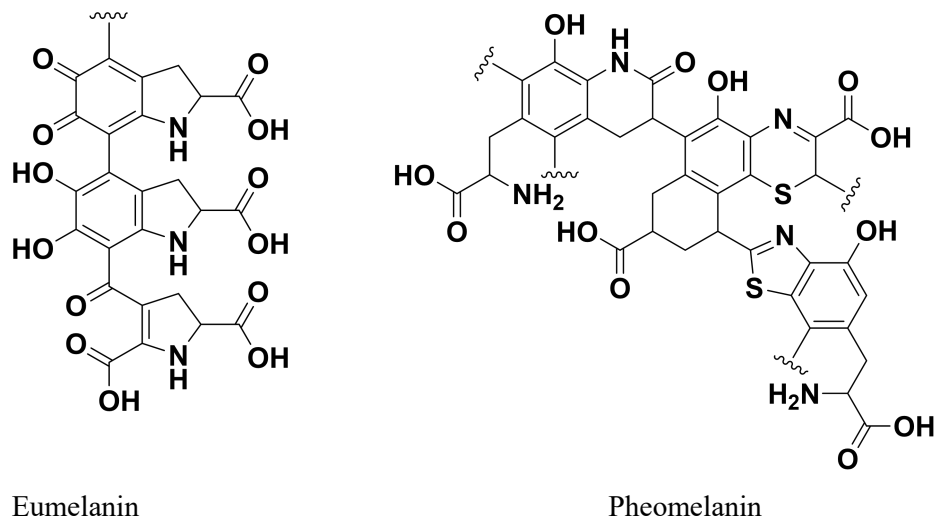


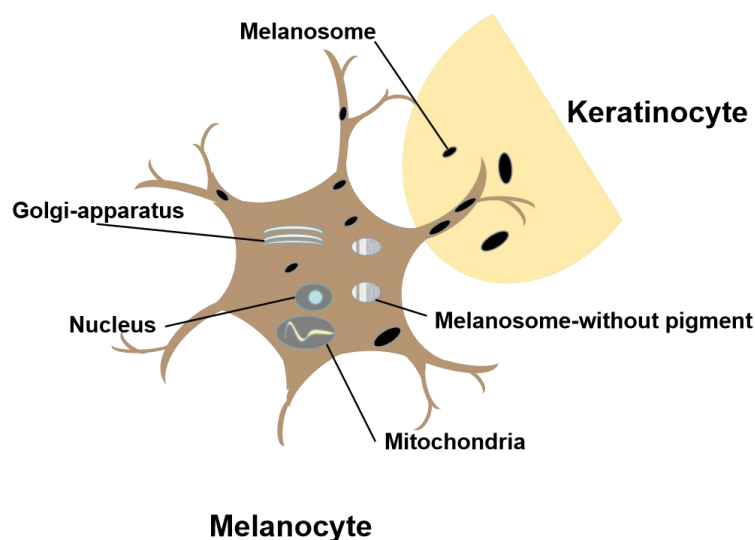
Figure 1 Biosynthesis scheme of melanin in skin.

ヒトにみられるメラニンには、主に黒褐色の真性メラニン (eumelanin) および黄色の亜メラニン (pheomelanin) の2種類がある (Figure 2). 皮膚や髪に存在するメラニンは、この2種類の複合体であり、その比率により皮膚や毛髪の色に違いが生じる<sup>9</sup>.



**Figure 2** Chemical structures of melanin (eumelanin and pheomelanin).

また、メラニンの生成とともに、メラノサイトが肥大し、樹状突起が増加・伸長し、周囲の角質細胞に接着する。メラノソームは生成されたメラニンを携えてメラノサイトの樹状突起の先端へ向かい、キネシンを介して微小管に沿って運搬される。その後、メラノソームはメラノサイトの樹状突起の先端より放出され、周囲の角質細胞と溶合し、角質細胞内に放たれる。角質細胞はメラニンの貯留所として働き、メラニンを合成したメラノサイトよりも多くメラニンを含有している。角質細胞と溶合したメラニンは角化過程が進行するにつれて、基底層から角質層に上昇する。最後に角質層でメラノソームが加水分解酵素で分解され、メラニンが溶出することが知られている (Figure 3)<sup>10</sup>.



**Figure 3** Melanin transport.



メラニンが紫外線により産生したフリーラジカルと結合し、細胞とくに deoxyribonucleic acid (DNA) を保護する。一方、メラノサイト自体は紫外線による障害を特に受けやすい細胞であり、DNA の損傷によりがん化する可能性がある。また、chlorpromazine, streptomycin, chloroquine, phenothiazine など数種類の薬物はメラニンと静電結合しやすいため、これらの薬物は体内に蓄積し、副作用を起こす可能性があるとして報告されている<sup>11-13</sup>。

がんは、制御されない細胞増殖を特徴とする病気であり、世界全体では死因の第2位であったが、日本では死因の第1位となっており、その割合は年々増加している<sup>14</sup>。

悪性黒色腫（メラノーマ）は転移性が高く、最も悪性度が高い皮膚がんである。近年、大気中のオゾンが減少するにつれて、より多くの紫外線が地表に到達するため、メラノーマの発症率は年々増加し続けている。

メラノーマは表皮の基底層に分布しているメラニンを産生する皮膚の細胞メラノサイトから悪性化した腫瘍と考えられている。メラノーマの明確な発症原因はまだよくわかっていないが、アジア人を含む有色人種よりも、白色人種での発症率が数倍高く、年間を通して紫外線が多い地域に住む白色人種ではさらに発症率が高くなると報告されていることから、紫外線の刺激などとの関連性が深いと考えられている。また、足の裏や爪など、いつも刺激を受けている部位にできやすいことから、外からの物理的な刺激も関係していると考えられている<sup>15</sup>。

メラノーマは左右非対称な形をし、辺縁はギザギザと不整で、色のにじみ出を認め、色調は不均一で色むらを認めるなどの特徴を有する。また、長径が6 mm 以上であることが多く、これらの所見により視診にて診断する<sup>16</sup>。また、リンパ節や内臓などへの転移を調べるためには、X線、超音波（エコー）、computed tomography (CT)、magnetic resonance imaging (MRI)、positron emission tomography (PET) などの画像診断を行う。

メラノーマの進行度により、原発巣のみの0～II期、リンパ節転移を認めるIII期、内臓転移を認めるIV期の5つの病期に分類される。また、メラノーマ腫瘍のサイズや潰瘍の有無により、I期はAおよびB、II期はA、B、Cに分類される。全病期における5年相対生存率は、全症例の平均69.5%で、I期で86.2%、II期で79.6%とあり、早期治療の切除によって高い治癒率を示すが、III期では53.1%、IV期では11.0%となり、内臓に転移した患者の治癒率が低く、再発の可能性も高いため、生存率はわずかである<sup>17</sup>。

治療手段については、第一選択の治療は外科的切除である。また、術後補助療法や手術不能例に対して、化学療法として、ダカルバジン<sup>18</sup>などの抗がん剤が使われている。一方、メラノーマは特異的ながん遺伝子であるMITFのシグナル伝達により、メラノーマの生存・増殖を促す。また、メラノーマに蓄積したメラニンが抗がん剤またはフリーラジカルと結合し、細胞を保護するため、放射線治療および化学療法が奏効率が低く、再発率は高い<sup>6-8</sup>。

最近、根治切除不能なメラノーマに対する免疫療法<sup>19</sup>が認可され、ペムプロリズマブ (Programmed cell death-1, PD-1 標的抗体), イピリムマブ [Cytotoxic T-lymphocyte (associated) antigen-4, CTLA-4 標的抗体] など<sup>20-22</sup>の免疫チェックポイント阻害薬など多種類の治療薬が発売されたが、体内 T 細胞の量および状態により、これらの治療薬の適用性および薬剤耐性の問題が生じている<sup>23-25</sup>。

また、分子標的薬の研究に伴い、mitogen-activated protein kinase kinase kinase (RAF)/mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) シグナル伝達経路, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT/PKB)/mammalia target of rapamycin (mTOR) シグナル伝達経路, Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路, および protein kinase A (PKA)/cAMP-response element binding protein (CREB) シグナル伝達経路など、メラノーマ増殖に関係する数多くのシグナル伝達経路は明らかにされている (Figure 4)。近年, RAF/MEK/ERK シグナル伝達経路に関する分子標的薬として、ベムラフェニブ, ダブラフェニブ (v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, BRAF 阻害薬) およびトラメチニブ (MEK 阻害薬) が開発された<sup>25</sup>。今後、免疫療法と分子標的治療薬を併用する免疫複合療法が期待されている。しかし、現在使用されている BRAF 阻害薬には耐性の獲得および二次性の皮膚癌 (扁平上皮癌など) を惹起するという皮膚毒性である2つの欠点がある。すなわち、新しい分子標的治療薬の開発が急務である<sup>26</sup>。

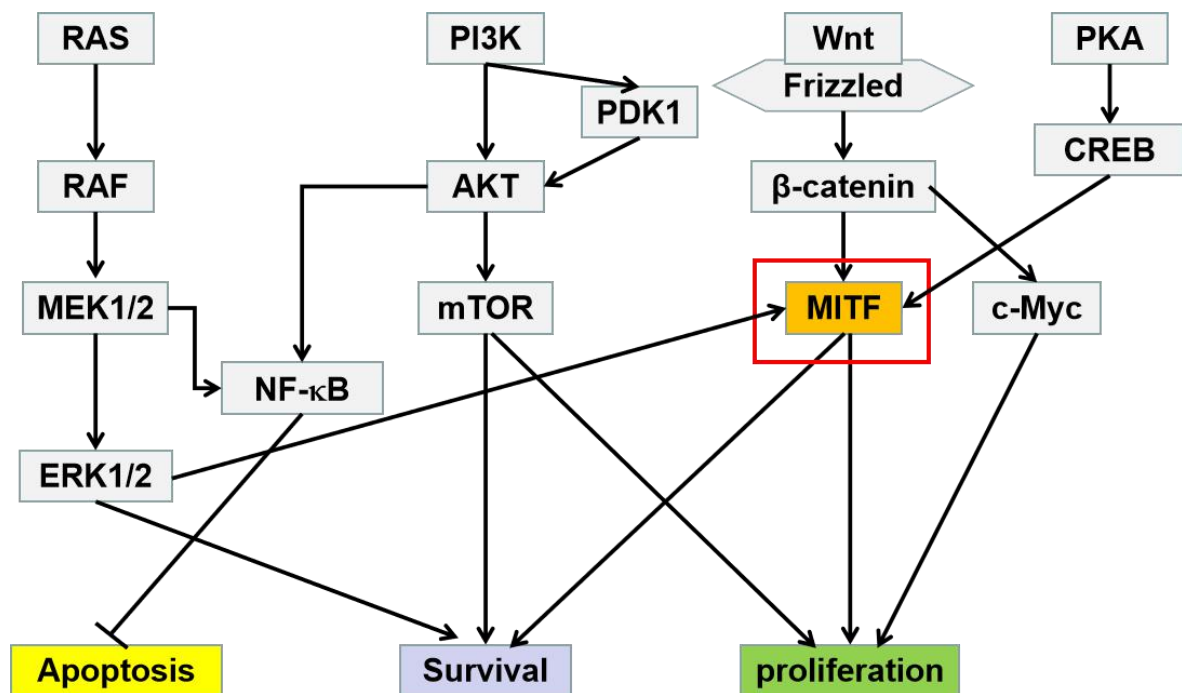


Figure 4 Signals of melanoma cell proliferation.

MITF はメラノサイトの形成・分化に重要な調節因子であり、メラニンの生成において、紫外線の刺激により PKA/CREB 経路を介して活性化され、TYR, TRP-1 および TRP-2 といったメラニン生成に必要な酵素の発現あるいはメラニンの生成など様々な機能を担っている<sup>5-7</sup>。一方、MITF の変異により、細胞の分化およびアポトーシスを阻害し、メラノサイトがメラノーマに腫瘍化する<sup>27</sup>。また、メラノーマ細胞における ERK, Wnt/ $\beta$ -catenin, Notch など、多くのシングル伝達経路が MITF を介して細胞の転移・浸潤・増殖などの生理活性を制御している<sup>28</sup>。MITF 活性化されることにより、色素産生・分泌関連の他、抗アポトーシス遺伝子である B-cell leukemia 2 (BCL2)<sup>29</sup>、細胞周期関連遺伝子である cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)<sup>30</sup>、細胞運動・転移関連遺伝子の micro ribonucleic acid-211 (mir-211)<sup>31,32</sup> など多くの遺伝子が発現され、また、MITF 抑制されることにより、mir-222/221 が発現されることが報告されている (Figure 5)<sup>33</sup>。

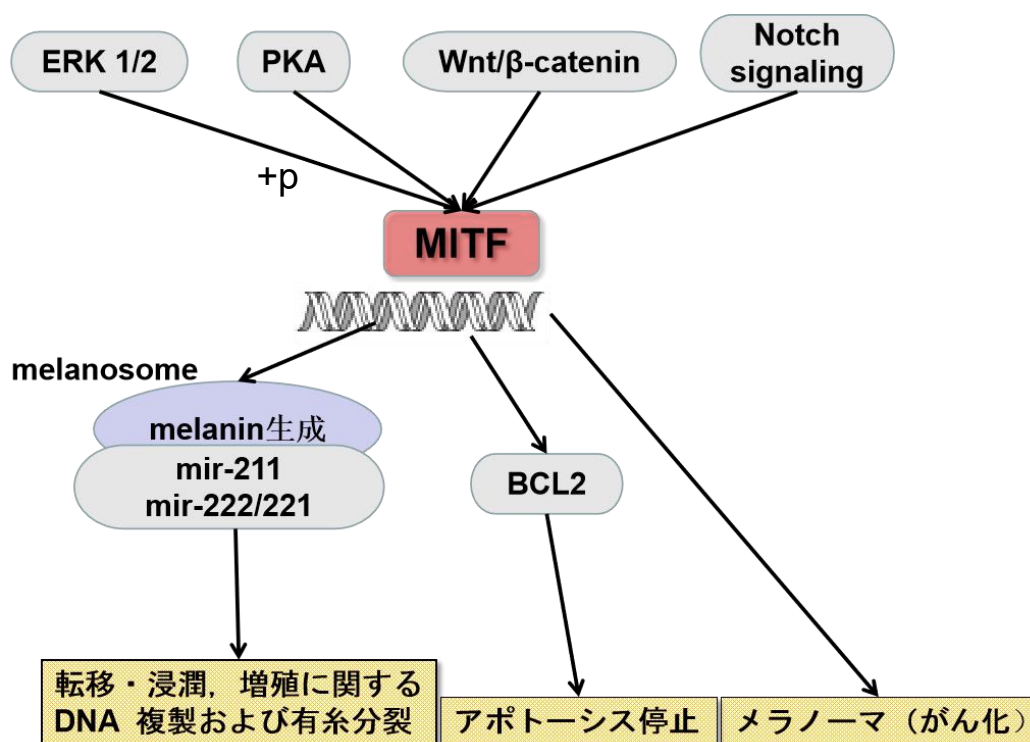


Figure 5 Signals of MITF.

最近、メラノーマの増殖および転移については、MITF の低発現量では、転移性が高くなり、増殖力が低くなること、中程度の発現量では、転移性が低くなり、増殖力が高くなること、高発現量では、メラノーマの増殖が抑制され、分化が促進されることが報告されている<sup>34</sup>。

また、メラノーマ細胞における MITF の異常活性化により、メラノサイトと同様に、メラノーマは肥大し、樹状突起が増加・伸長する<sup>9</sup>。上層にある角質細胞と接着すると、Notch シグナル伝達経路が活性化されることにより、MITF を抑制し、メラノーマの増殖が抑制されるが、mir-222/221 の転写が促進され、メラノーマの転移を促進すると報告されている<sup>33</sup>。

一方、メラノーマの肥大により、基底層下にある真皮中の間質線維芽細胞 (stromal fibroblasts) に接着すると、樹状突起から mir-211 およびメラニンを携帯するメラノソームを線維芽細胞に注入し、mir-211 により、線維芽細胞を cancer associated fibroblasts (CAFs) に再編集する<sup>32,35-39</sup>。CAFs は発癌、原発性および転移性など、メラノーマの進行に重要な役割を果たしている<sup>40-42</sup>。メラノーマにおける、CAFs はメラノーマと共存すると、CAFs の ERK シグナル伝達経路が活性化され、血管新生などを促進することにより、メラノーマの増殖を促進する<sup>43-45</sup>。また、増殖したメラノーマが真皮血管と接着すると、転移が始まる (Figure 6)。

すなわち、メラノーマは MITF の活性化により肥大し、樹状突起が伸長し、線維芽細胞および角質細胞と接着することにより、増殖は抑制されるが、転移は促進される。

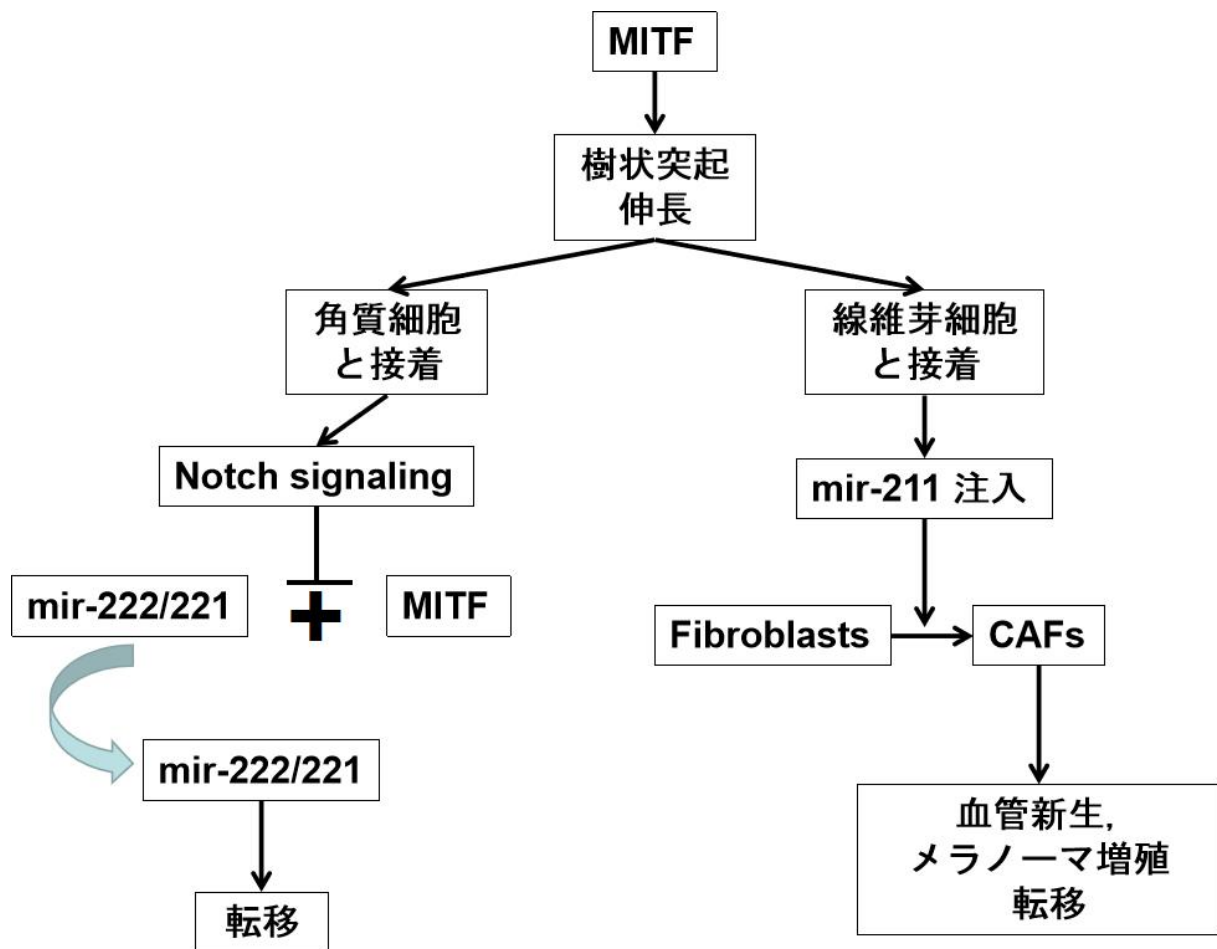


Figure 6 MITF and microRNA.

これらの報告から、MITF はメラノーマの進行と強く関連すると考えられる。MITF を抑制すると増殖が抑制されるが、転移性が高くなる。しかし、メラノーマの転移には血管との接着が不可欠な条件となるため、MITF を抑制することはメラノーマの治療に必要と考えられる。そこで、MITF に着目し、メラニン生成抑制作用を指標にメラノーマ細胞に対する選択的な増殖抑制物質の探索を試みた。

アントラセノン類は、タデ科、ユリ科およびマメ科植物などに含有され、メラニン生成抑制作用や細胞増殖抑制作用など様々な作用を有することが報告されている<sup>46-48</sup>。アントラセノンの一種として、aloe-emodin はヒト神経芽細胞腫細胞系 (Human Brain Neuroblastoma cell line, IMR-32) に対して特異的で用量依存的な細胞毒性 [Half maximal (50%) inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>: 1~13 μM] を示すことが報告されている。さらに、比較的高濃度 (IC<sub>50</sub>: 40~100 μM) で子宮頸癌細胞 (Cervix carcinoma cells, HeLa), 結腸癌細胞 (Colon adenocarcinoma, LoVo109) および T 細胞白血病細胞 (T-cell leukemia cells, CEM) などのがん細胞に対して増殖抑制作用を示すことが報告されている<sup>49</sup>。また、アントラセノン類としての emodin は BRAF/MEK/ERK (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK) シグナル伝達経路を介して MITF を抑制する作用が報告されている<sup>50</sup>。

*Cassia auriculata* はインド、スリランカなどに自生する多年生マメ科植物であり、インド伝統医学のアーユル・ヴェーダにおいて糖尿病、結膜炎および皮膚病の治療を目的に用いられてきた<sup>51</sup>。著者所属するの研究室ではこれまでに、*C. auriculata* 葉部からフラボノイド類、カテキン類およびアントラセノン類を単離、報告している<sup>52</sup>。また、*C. auriculata* 葉部からの抽出物に肝保護作用が報告されている<sup>53</sup>。

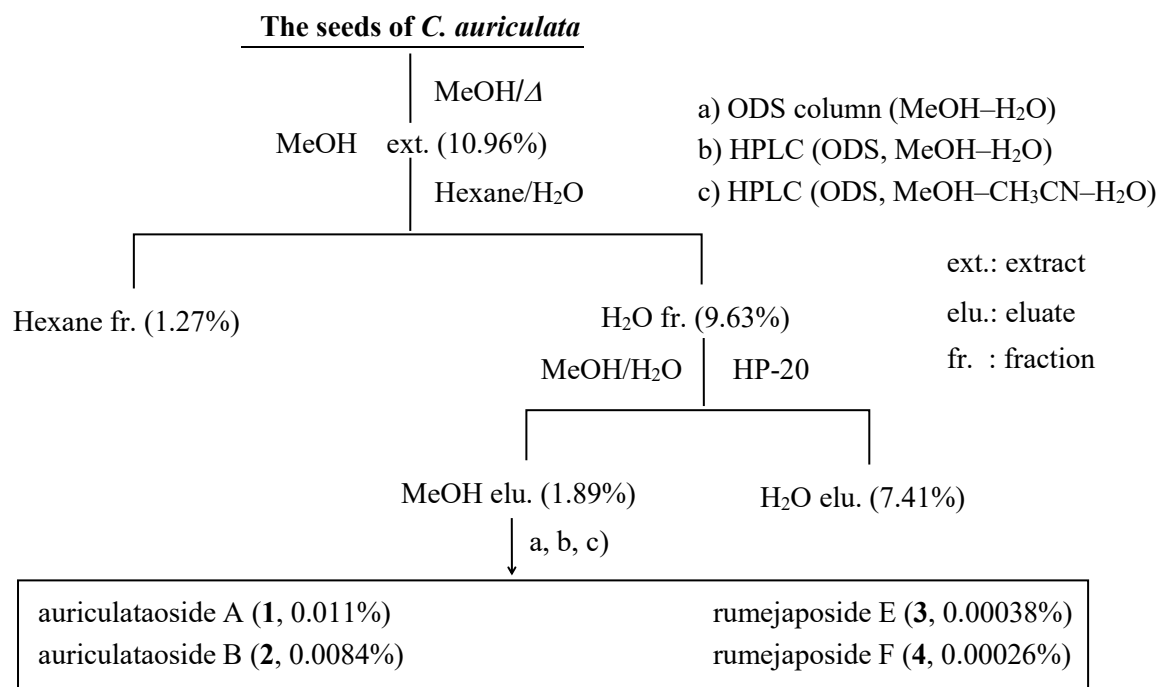
一方、*C. auriculata* 種子の成分研究に関する報告はほとんどない、そこで、*C. auriculata* 種子について特にメラノーマ細胞に対して特異的な増殖抑制作用を示す物質を見出すことを目的として、細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用を指標に成分の探索を行った。

# 本論

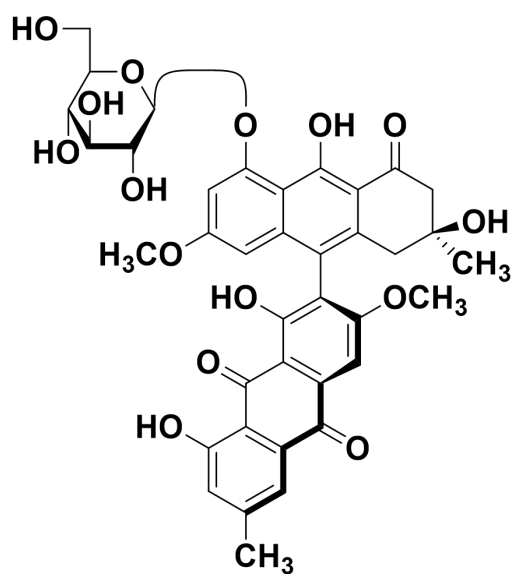
## 第一章 *C. auriculata* 種子含有アントラセノン二量体の単離と構造決定

### 第一節 *C. auriculata* 種子含有アントラセノンの抽出および単離

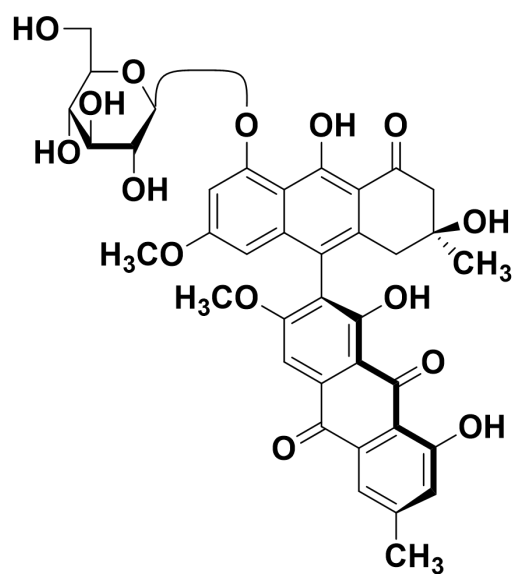
*C. auriculata* 乾燥した種子 3,929 g をメタノール (MeOH) を用いて 80 °C で熱時 3 回抽出し, MeOH 抽出エキス (430.6 g, 10.96%) を作製した. 得られた MeOH 抽出エキスの一部 (399 g) を *n*-hexane と H<sub>2</sub>O で分配し, *n*-hexane 移行部 (46.4 g, 1.27%) および H<sub>2</sub>O 移行部 (352.6 g, 9.63%) を得た. さらに H<sub>2</sub>O 移行部の一部 (322.7 g) を Diaion HP-20 カラムロマトグラフィーを用い, H<sub>2</sub>O, 次いで MeOH で溶出し, MeOH 溶出部 (63.2 g, 1.89%) および H<sub>2</sub>O 溶出部 (259.5 g, 7.41%) を得た. 得られた MeOH 溶出部を逆相 (Octadecylsilyl, ODS) カラムクロマトグラフィーおよび high performance liquid chromatography (HPLC) を用いて分離精製を繰り返し, 新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (**1**, 0.011%), auriculataoside B (**2**, 0.0084%), を単離・構造決定するとともに, 既知化合物 rumejaposide E (**3**<sup>54</sup>, 0.00038%), rumejaposide F (**4**<sup>54</sup>, 0.00026%) を単離・同定した (Chart 1, Figure 7).



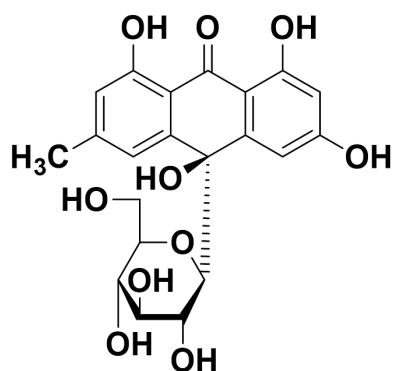
**Chart 1** Isolation from the seeds of *C. auriculata*.



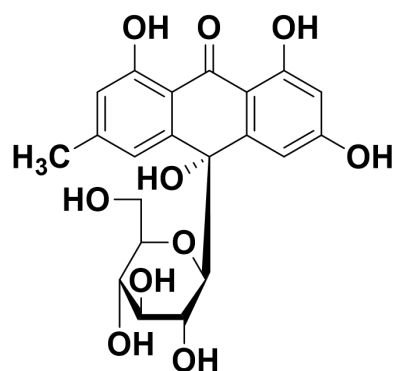
auriculataoside A (1)



auriculataoside B (2)



rumeojaposide E (3)



rumeojaposide F (4)

**Figure 7** Chemical structures of 1–4.

## 第二節 含有成分の化学構造

### 第一項 新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (1) および B (2) の化学構造

Auriculataoside A (1) および auriculataoside B (2) は負の旋光性 (1:  $[\alpha]_D^{24} -129.5^\circ$ ; 2:  $[\alpha]_D^{22} -41.3^\circ$  in 1,4-dioxane) を示す赤色粉末として得られ, fast atom bombardment-mass spectrometer (FAB-MS) においてそれぞれ擬似分子イオンピークが  $m/z$  755 ( $M+Na$ )<sup>+</sup> に観測された. 1 および 2 は, 高分解能 FAB-MS により共通した分子式  $C_{38}H_{36}O_{15}$  を有する化合物であることが明らかとなった. また, 1 および 2 の赤外吸収 (Infrared absorption spectrometry, IR) スペクトルにおいて, 水酸基, カルボニル基およびエーテルに由来する吸収 (1 and 2: 3,450, 1,655, and 1,070  $cm^{-1}$ ) が認められた. 1 および 2 を 1.0 M HCl で酸加水分解するとそれぞれの構成糖として, HPLC-旋光度検出器において D-glucose が検出された (Figure 8). 1 および 2 の水素核磁気共鳴 (<sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H-NMR, DMSO-*d*<sub>6</sub>, Table 1) スペクトルと炭素核磁気共鳴 (<sup>13</sup>C-NMR, Table 2) スペクトルから 2 個のメチル [1:  $\delta$  1.15, 2.24 (3H each, both s,  $CH_3$ -3', 3); 2:  $\delta$  1.18, 2.24 (3H each, both s,  $CH_3$ -3', 3)], 2 個のメチレン [1:  $\delta$  2.61 (2H, br s,  $H_2$ -4'), 2.74, 2.88 (1H each, both d,  $J = 16.8$  Hz,  $H_2$ -2'); 2:  $\delta$  2.57, 2.75 (1H each, both d,  $J = 16.2$  Hz,  $H_2$ -4'), 2.72, 2.90 (1H each, both d,  $J = 16.8$  Hz,  $H_2$ -2')], 2 個のメトキシ基 [1:  $\delta$  3.65, 3.89 (3H each, both s,  $OCH_3$ -6', 6); 2:  $\delta$  3.66, 3.85 (3H each, both s,  $OCH_3$ -6', 6)], 5 個の芳香族プロトン [1:  $\delta$  6.20, 6.88 (1H each, both d,  $J = 2.1$  Hz, H-5', 7'), 7.22, 7.59 (1H each, both br s, H-2, 4), 7.55 (1H, s, H-5); 2:  $\delta$  6.20, 6.89 (1H each, br s, H-5', 7'), 7.18, 7.53 (1H each, both br s, H-2, 4), 7.52 (1H, s, H-5)] および 1 個のβ結合した D-グルコース [1:  $\delta$  5.04 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1''); 2:  $\delta$  5.02 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz, H-1'')] の存在が示唆された.

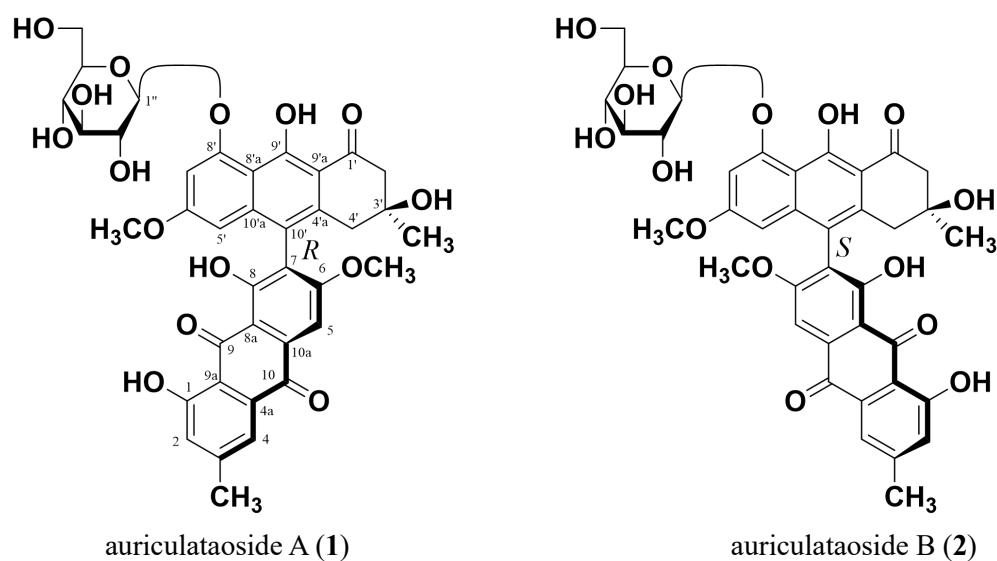


Figure 8 Chemical structures of 1 and 2.



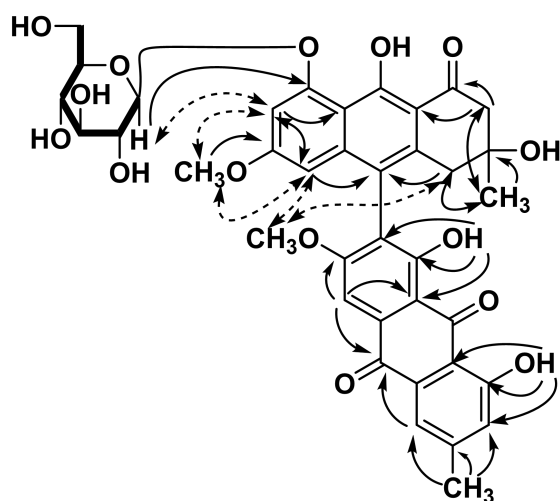
**Table 1** <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic data for **1** and **2** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Position	<b>1</b>	<b>2</b>	Position	<b>1</b>	<b>2</b>	Position	<b>1</b>	<b>2</b>
1			1'			1''	5.04 (d, 7.7)	5.02 (d, 7.7)
2	7.22 (br s)	7.18 (br s)	2'	2.74 (d, 16.8)	2.72 (d, 16.8)	2''	3.47 (m)	3.47 (m)
				2.88 (d, 16.8)	2.90 (d, 16.8)			
3			3'			3''	3.35 (m)	3.35 (m)
4	7.59 (br s)	7.53 (br s)	4'	2.61 (2H, br s)	2.57 (d, 16.2)	4''	3.21 (m)	3.22 (m)
4a			4'a		2.75 (d, 16.2)	5''	3.43 (m)	3.44 (m)
5	7.55 (br s)	7.52 (br s)	5'	6.20 (d, 2.1)	6.20 (br,s)	6'' a	3.48 (m)	3.50 (m)
6			6'			6'' b	3.74 (dd, 112, 5.5)	3.75 (dd, 116, 5.5)
7			7'	6.88 (d, 2.1)	6.89 (d, 2.1)	CH <sub>3</sub> -3	2.24 (s)	2.24 (s)
8			8'			CH <sub>3</sub> -3'	1.15 (s)	1.18 (s)
8a			8'a			OCH <sub>3</sub> -6	3.89 (s)	3.85 (s)
9			9'			OCH <sub>3</sub> -6'	3.65 (s)	3.66 (s)
9a			9'a			OH-1	11.88 (br s)	11.90 (br s)
10			10'			OH-8	12.19 (br s)	12.27 (br s)
10a			10'a			OH-3'	4.79 (br s)	4.79 (br s)
						OH-9'	19.20 (br s)	19.20 (br s)

**Table 2**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopic data for **1** and **2** in  $\text{DMSO-}d_6$ .

Position	<b>1</b>	<b>2</b>	Position	<b>1</b>	<b>2</b>	Position	<b>1</b>	<b>2</b>
1	161.4	161.4	1'	204.1	204.2	1''	101.6	101.8
2	124.2	124.2	2'	51.6	51.4	2''	73.4	73.4
3	148.6	148.6	3'	68.8	68.8	3''	76.4	76.4
4	120.6	120.6	4'	41.2	41.0	4''	69.8	69.8
4a	132.8	132.6	4'a	136.6	136.7	5''	77.3	77.3
5	103.2	103.3	5'	99.6	99.4	6''	60.8	60.8
6	163.8	163.8	6'	161.4	161.4	CH <sub>3</sub> -3	21.5	21.5
7	120.1	120.1	7'	100.7	100.8	CH <sub>3</sub> -3'	28.2	28.5
8	161.1	161.2	8'	159.2	159.3	OCH <sub>3</sub> -6	56.8	56.5
8a	110.7	110.7	8'a	109.6	109.6	OCH <sub>3</sub> -6'	55.1	55.1
9	190.5	190.5	9'	164.7	164.6			
9a	113.4	113.4	9'a	109.4	109.4			
10	181.3	181.2	10'	117.1	117.1			
10a	134.6	134.5	10'a	139.4	139.4			

次に、単離精製物 **1** および **2** の heteronuclear multiple-bond connectivity (HMBC) スペクトルにおいて、1''-H と C-8'に相関がみとめられたことから、8'位にグルコースを有することが確認された。また、Figure 9 で示すプロトン-カーボン間 (H-4 and C-10; H-5 and C-6, 8a, 10; H-2' and C-1', 9'a, CH<sub>3</sub>-3; H-4' and C-10', CH<sub>3</sub>-3'; H-5' and C-6', 7', 10'; H-7' and C-5', 8', 8'a; CH<sub>3</sub>-3 and C-2, 3, 4; CH<sub>3</sub>-3' and C-2', 3', 4'; OH-1 and C-1, 2, 9a; OH-8 and C-7, 8, 8a; OH-3' and C-3', 4', CH<sub>3</sub>-3'; OH-9' and C-8'a, 9', 9'a; OCH<sub>3</sub>-6 and C-6; OCH<sub>3</sub>-6' and C-6') に <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C long range 相関が認められた。また、nuclear overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) スペクトルにおいて、Figure 9 で示すプロトン-プロトン間 (H-1'' and H-7'; CH<sub>3</sub>-3 and H-2, 4; OCH<sub>3</sub>-6 and H-4', 5, 5'; OCH<sub>3</sub>-6' and H-5', 7') に相関が観測された。以上のことから、**1** および **2** は、1 個のグルコースを有し、C-7 位と C-10'位が結合したアントラセノン二量体であり、互いにアトロプ異性体であることが明らかになった。なお、非糖部は酸処理によって分解が認められ、単離することができなかった。また、β-glucosidase などの酵素処理によっても加水分解が困難であった。



auriculataoside A and B (1 and 2)

→ HMBC — DQF COSY <--> NOESY

Figure 9 Important 2D-NMR correlations of **1** and **2**.

## 第二項 Auriculataoside A (1) および B (2) の立体化学

単離精製物 **1** および **2** における不斉軸の絶対立体配置については、既知アントラセノン二量体と circular dichroism (CD) スペクトルの比較を行うことにより決定した。すなわち、*S* 配置を有する既知アントラキノン二量体 (*3'S,P*)-anhydrophlegmacin-9,10-quinone 8'-*O*-methyl ether (**5**, Figure 10) は、CD スペクトルにおいて、267 nm で正のコットン効果 ( $\Delta\epsilon +22.6$ ) を、283 nm で負のコットン効果 ( $\Delta\epsilon -34.4$ ) を示すことが報告されている<sup>55</sup>。また、275 nm を中心とする **5** のコットン効果は、ナフタレノイド環とアントラキノン環の発色団の長軸間には反時計回りのねじれがあり、Prelog-Helmchen の規則<sup>56</sup>によって、既知アントラキノン二量体は **5** の軸方向配置であることが決定された (Figure 10)。 **2** は、270 nm で正のコットン効果 ( $\Delta\epsilon +28.3$ ) および 288 nm で負のコットン効果 ( $\Delta\epsilon -27.9$ ) を示し、**5** と非常に類似した CD スペクトルを示したことから (Figure 11)、その絶対配置は *S* であると決定した。一方、**1** は、270 nm での負のコットン効果 ( $\Delta\epsilon -38.0$ ) および 284 nm での正のコットン効果 ( $\Delta\epsilon +25.5$ ) を示したことから、**1** は **2** とのアトロブ異性体であり、**1** の絶対立体配置は *R* であると決定した。

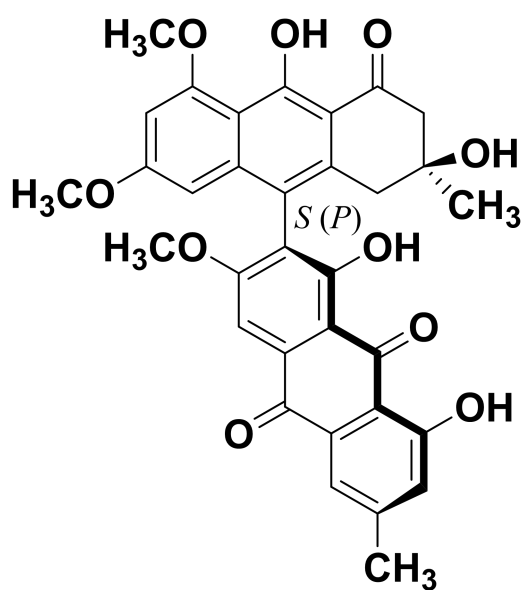
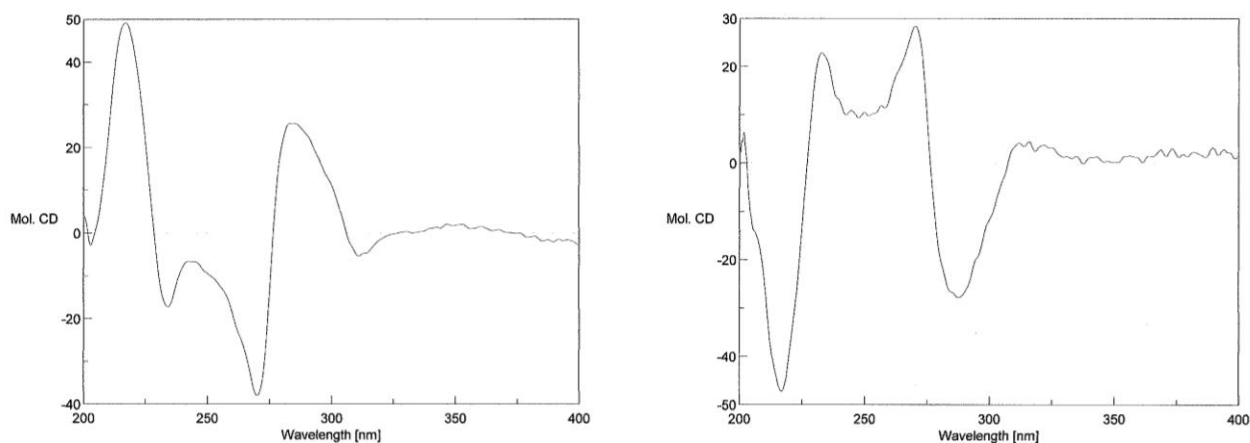
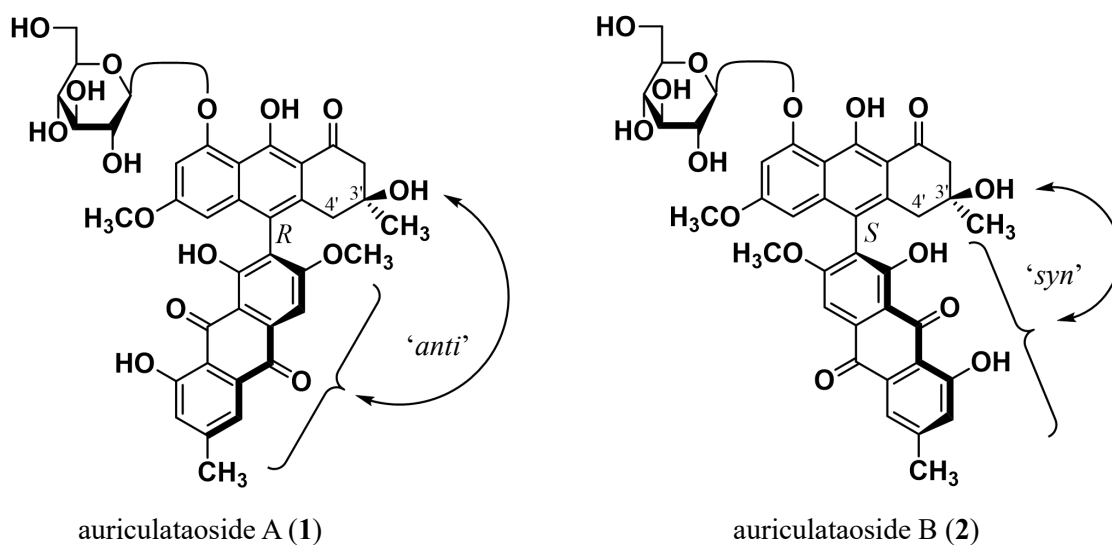


Figure 10 Structure of (*3'S,P*)-anhydrophlegmacin-9,10-quinone 8'-*O*-methyl ether (**5**).



**Figure 11** CD spectra (MeOH) of auriculataosides A (1) and B (2).

一方、3'位における立体構造に関しては、数多くの *phelgmacin* 類について軸不斉と 4'-H<sub>ax</sub> と 4'-H<sub>eq</sub> のケミカルシフトの相関性が報告されている<sup>55</sup>。すなわち、C-3'水酸基の配置が C-10'-アントラセノン (アントラキノン) 環と同じ側にある場合 ('*syn*'), 4'-H<sub>ax</sub> と 4'-H<sub>eq</sub> の間のケミカルシフトの差 ( $\Delta\delta$ ) は大きくなる傾向にある ( $\Delta\delta = 0.15 - 0.25$ )。一方、C-3'水酸基が C-10'-アントラセノン (アントラキノン) 環の反対側にある場合 ('*anti*'),  $\Delta\delta$  は小さくなる ( $\Delta\delta \leq 0.08$  ppm)。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて、**1** の 4'-H<sub>ax</sub> と 4'-H<sub>eq</sub> ケミカルシフトは同じ値 ( $\Delta\delta = 0$  ppm) であったが、**2** の  $\Delta\delta$  は 0.18 ppm であったことから、**1** および **2** の 3'位における立体配置は *S* であると推定した。

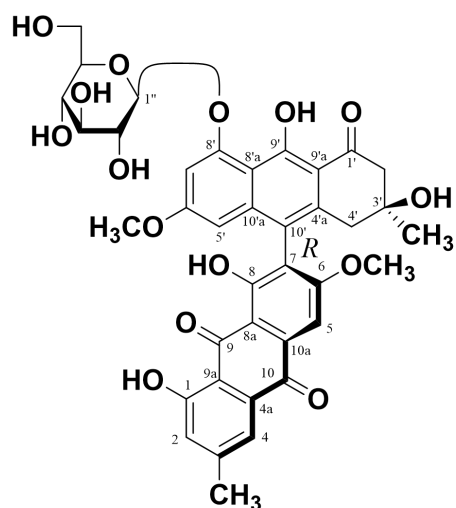
以上の結果より、auriculataoside A (**1**) および auriculataoside B (**2**) の化学構造をそれぞれ Figure 11 に示したものと決定した。

## 小括

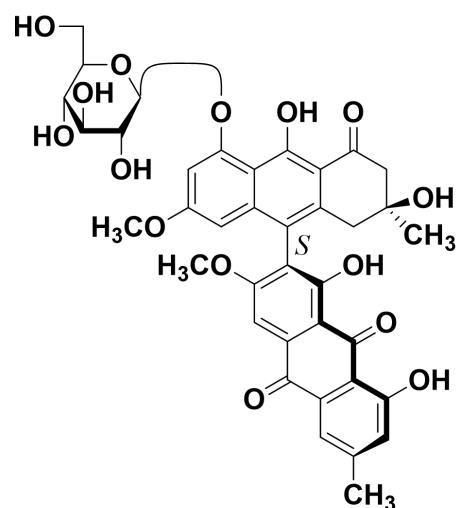
第一章では、マメ科植物 *Cassia auriculata* 種子より新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (**1**) および B (**2**) を単離し、絶対立体配置を含めて、化学構造の決定を行った。

すなわち、赤色粉末として単離精製物 **1** および **2** を得た。次に、 $^1\text{H}$ -、および  $^{13}\text{C}$ -NMR の詳細な解析により、これらは2つのアントラセノンおよびグルコースから成ることが明らかとなった。また、各種2次元 NMR スペクトルおよび NOE 相関から、8'位にグルコースを有し、7位と10'位が結合したアントラセノン二量体であると決定した。

立体化学に関しては、既知アントラセノン二量体と CD スペクトルの比較を行うことにより、**1** は **2** とのアトロプ異性体であり、**1** の絶対配置は *R*、**2** の絶対立体配置は *S* であると決定した。さらに、3'位における立体構造に関しては、 $^1\text{H}$ -NMR スペクトルにおいて、**1** の 4'- $\text{H}_{\text{ax}}$  と 4'- $\text{H}_{\text{eq}}$  ケミカルシフトは同じ値 ( $\Delta\delta = 0$  ppm) であったが、**2** の  $\Delta\delta$  は 0.18 ppm であったことから、**1** および **2** の3'位における立体配置は *S* であると推定した。



auriculataoside A (**1**)



auriculataoside B (**2**)

## 第二章 メラノーマ細胞に与える影響の検討

### 第一節 メラノーマ細胞に対する単離化合物の細胞増殖およびメラニン生成への影響

メラノサイトおよびメラノーマ細胞においては、紫外線照射や $\alpha$ -MSH<sup>4,5</sup>刺激ホルモンの刺激により、cAMP量を増加させることで細胞内シグナル伝達が活性化し、転写因子であるMITFを活性化させ、TYR、TRP-1およびTRP-2といった酵素の messenger ribonucleic acid (mRNA) 転写および翻訳が促される。メラニン生成反応では、L-tyrosineを基質として、L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), dopaquinone を経て、dopachrome が生成されるが、dopachrome以降は、自動的に酸化・重合を繰り返すことでメラニンが生成される<sup>6-8</sup>。また、theophylline<sup>57</sup> および forskolin<sup>58</sup> などの競合的非選択的ホスホジエステラーゼ阻害薬は cAMP の環状リン酸ジエステルを加水分解する酵素である phosphodiesterase (PDE) の酵素活性阻害作用により、細胞内の cAMP が蓄積し、メラニン生成が促進される (Figure 12)。

そこで MITF 発現を抑制する物質を探索するため、メラニン生成抑制作用を指標としてメラニンの生成およびその作用様式への作用について検討を行った。

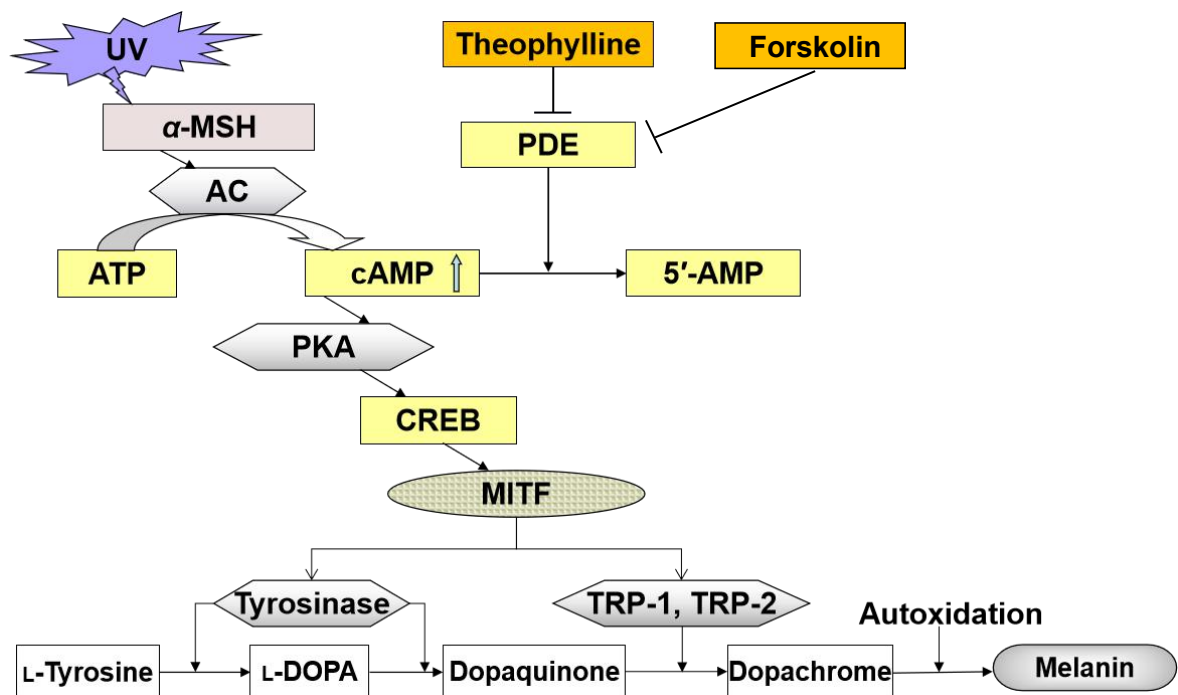


Figure 12 Biosynthesis scheme of melanin by stimulation with UV, theophylline or forskolin.

## 第一項 Theophylline のメラニン生成およびメラノーマ細胞生存率への影響

Theophylline (Figure 13)<sup>57</sup> は競合的非選択的ホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害薬であり, cAMP の環状リン酸ジエステルを加水分解する酵素である PDE の酵素活性を阻害することにより, 細胞内の cAMP が蓄積し, TYR などの酵素の mRNA 転写および翻訳を促すことで, メラニンを促進する.

そこで, theophylline のメラノーマ細胞生存率および MITF 発現への影響について検討を行った.

結果として, 200  $\mu\text{M}$  でメラノーマ細胞増殖促進作用 (生存率: 112.7%) が確認された. また, 300  $\mu\text{M}$  から theophylline のメラノーマ細胞増殖促進作用が濃度依存的に減少し, 1,000  $\mu\text{M}$  から細胞増殖抑制作用 (生存率: 1,000  $\mu\text{M}$ , 90.4%; 2,000  $\mu\text{M}$ , 75.0%) を示した (Table 3, Figure 14).

MITF 発現への影響については, theophylline の処理により MITF 発現量が 10~2,000  $\mu\text{M}$  の濃度域で濃度依存的に増加することを示した. さらに, MITF の上流にある cAMP-response element binding protein (CREB) のリン酸化および下流にある TYR 発現の増加が認められた (Figure 15).

これらの結果は, MITF の発現量が低濃度域では, 増殖力が低くなり, 中程度の濃度では, 増殖力が高くなり, 高濃度ではメラノーマの増殖が抑制され, 分化促進することに関する報告<sup>34</sup>と一致するため, MITF 発現を抑制する物質の探索, メラニン生成抑制作用を指標としてメラニンの生成およびその作用様式について検討を行った.

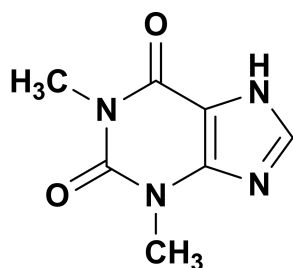


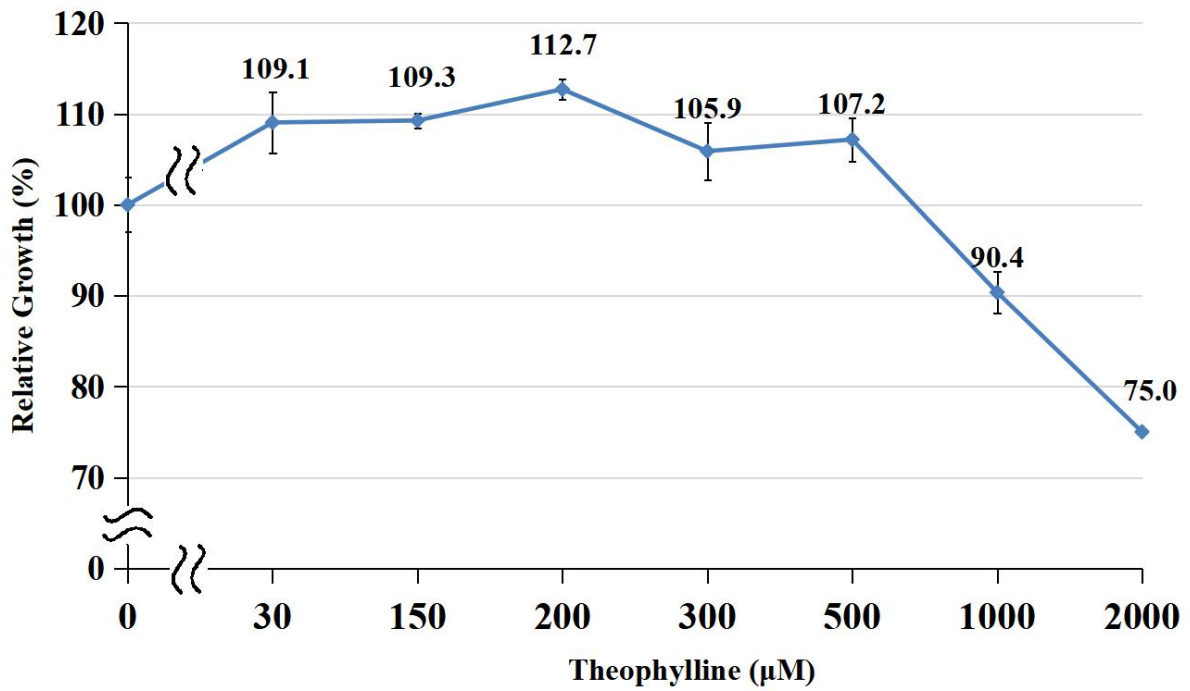
Figure 13 Chemical structure of theophylline.

Table 3 Inhibitory effects of MeOH extract and its fractions from the seeds of *C. auriculata* on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

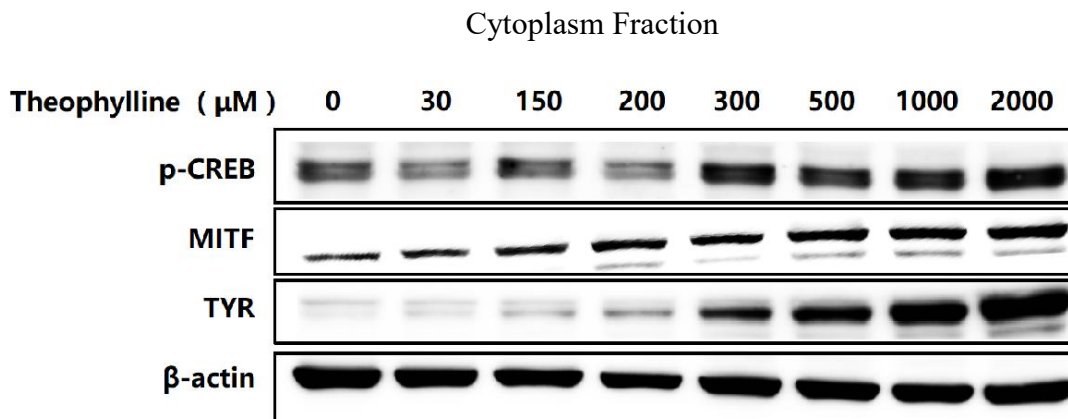
Theophylline Conc.( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)			
	0	30	150	200
	100.0 $\pm$ 1.6	109.1 $\pm$ 3.0	109.3 $\pm$ 3.4	112.7 $\pm$ 0.8*
Conc. ( $\mu\text{M}$ )	300	500	1000	2000
	105.9 $\pm$ 1.1	107.2 $\pm$ 3.1	90.4 $\pm$ 2.4*	75.0 $\pm$ 2.3**

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .





**Figure 14** Inhibitory effects of theophylline on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells. Each value represents the mean±S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .



**Figure 15** Effects of theophylline on p-CREB, MITF and TYR protein levels. β-Actin were used as loading control.

## 第二項 単離化合物のメラニン生成への影響

はじめに、メラニン生成抑制作用を指標に抽出した各画分のメラニン生成への影響を評価したところ、*C. auriculata* 種子の MeOH 溶出部に、theophylline 刺激条件下、100  $\mu\text{g/mL}$  で 57.2% の細胞増殖抑制作用および 30  $\mu\text{g/mL}$  で 27.8% と有意なメラニン生成抑制作用が認められた (Table 4, 5; Figure 16, 17).

**Table 4** Inhibitory effects of MeOH extract and its fractions from the seeds of *C. auriculata* on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Sample	Conc.		Relative Growth (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	3	10	30	100	
MeOH ext.	100.0 $\pm$ 2.5	106.0 $\pm$ 2.2	103.1 $\pm$ 2.1	96.6 $\pm$ 1.8	96.9 $\pm$ 3.2	107.8 $\pm$ 3.4	— <sup>2)</sup>	
MeOH-eluted fr.	100.0 $\pm$ 3.6	95.1 $\pm$ 3.4	98.5 $\pm$ 2.8	96.7 $\pm$ 1.5	80.1 $\pm$ 0.6**	42.8 $\pm$ 1.3**	80.5	
H <sub>2</sub> O-eluted fr.	100.0 $\pm$ 4.1	97.6 $\pm$ 3.6	101.0 $\pm$ 0.6	102.5 $\pm$ 1.0	97.2 $\pm$ 3.8	101.6 $\pm$ 2.7	— <sup>2)</sup>	

1) Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.

3) Conc.: concentration.

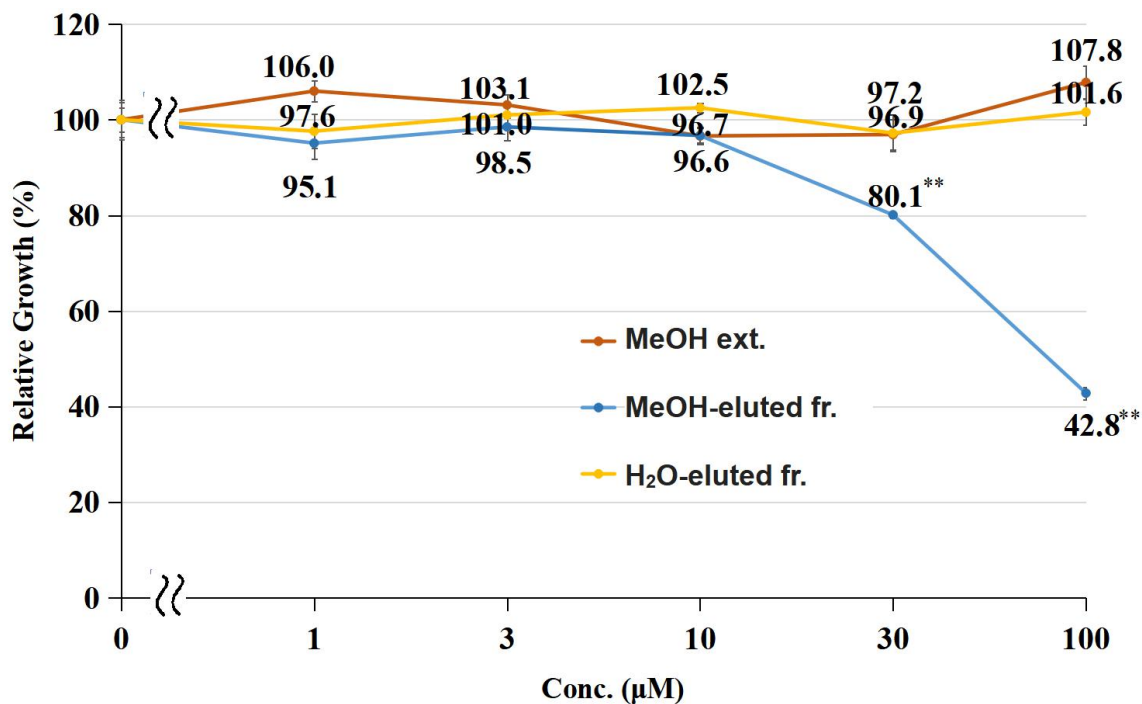
**Table 5** Melanin inhibitory effects of MeOH extract and its fractions from the seeds of *C. auriculata* in B16 melanoma 4A5 cells.

Sample	Conc.		Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )
	( $\mu\text{g/mL}$ )	0	1	3	10	30	100	
MeOH ext.	0.0 $\pm$ 1.3	29.2 $\pm$ 2.9**	28.7 $\pm$ 2.6**	32.0 $\pm$ 1.7**	35.1 $\pm$ 2.7**	36.1 $\pm$ 3.7**	— <sup>2)</sup>	
MeOH-eluted fr.	0.0 $\pm$ 2.7	-2.0 $\pm$ 3.6	7.2 $\pm$ 4.2	22.2 $\pm$ 4.6**	27.8 $\pm$ 1.5**	— <sup>3)</sup>	— <sup>2)</sup>	
H <sub>2</sub> O-eluted fr.	0.0 $\pm$ 4.9	5.3 $\pm$ 3.1	8.9 $\pm$ 3.0	10.5 $\pm$ 5.9	13.5 $\pm$ 4.9	27.7 $\pm$ 1.8**	— <sup>2)</sup>	

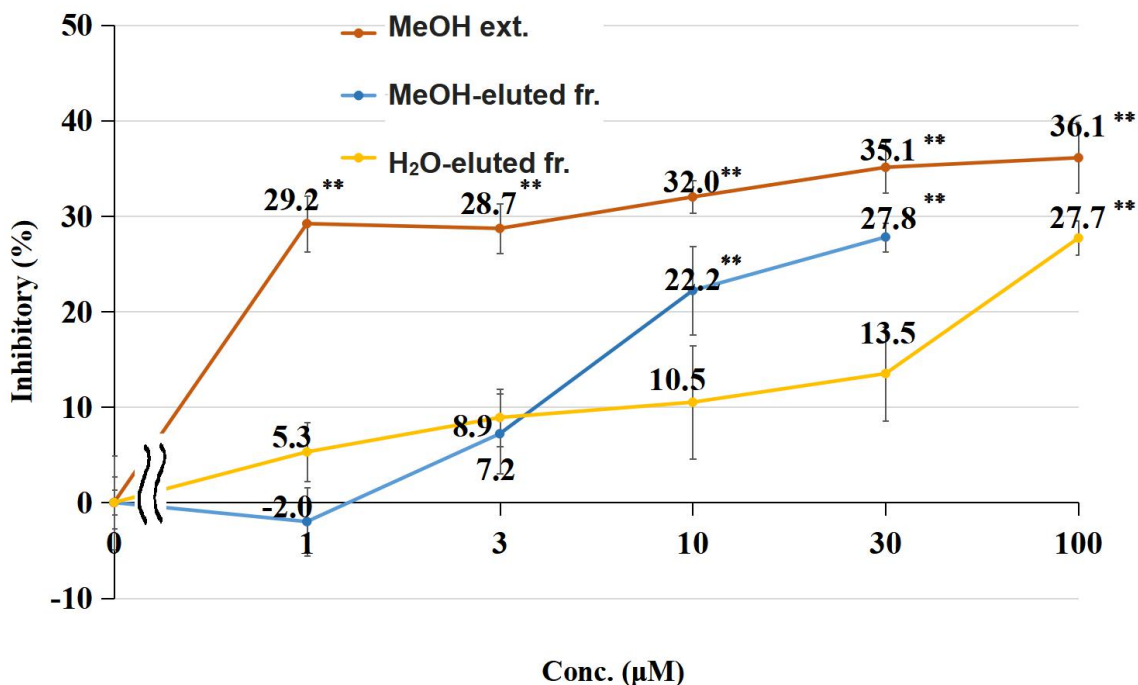
1) Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.

3) The cytotoxic effects was observed.



**Figure 16** Inhibitory effects of MeOH extract and its fractions from the seeds of *C. auriculata* on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells. Each value represents the mean±S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .



**Figure 17** Melanin inhibitory effects of MeOH extract and its fractions from the seeds of *C. auriculata* in B16 melanoma 4A5 cells. Each value represents the mean±S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

続いて、MeOH 溶出部に細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が認められたことから、MeOH 溶出部から得られた成分である **1-4** について 0.01~1  $\mu\text{M}$  の濃度域で細胞増殖およびメラニン生成に対する抑制作用を検討した。その結果、アントラセノン二量体 auriculataoside A (**1**) および auriculataoside B (**2**) に 1  $\mu\text{M}$  で細胞増殖抑制作用 (抑制率: 73.0% および 71.0%) および 0.3  $\mu\text{M}$  でメラニン生成抑制作用 (生存率: 27% および 29%; 抑制率: 45.1% および 36.5%) を見出した (Table 6, 7; Figure 18, 19)。すなわち、メラニン産生に対しては **1** の方がやや強く抑制する傾向にあったが、細胞増殖に対しては **1** と **2** はほぼ同程度の抑制効果を示した。これらの結果から、軸不斉による影響については、少なくとも細胞増殖抑制に対してはほとんど影響がないものと考えられる。また、アントラセノン単量体 **3** および **4** に弱いメラニン生成抑制作用が認められたが、有意な細胞増殖抑制作用は認められなかった。単量体 **3** および **4** は有意な作用が認められなかったことから二量体となることで作用が増強する可能性が示唆された。

**Table 6** Inhibitory effects of **1-4** on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Sample	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
		0	0.01	0.03	0.1	0.3	1	
<b>1</b>		100.0 $\pm$ 0.8	101.8 $\pm$ 1.9	101.8 $\pm$ 1.7	104.7 $\pm$ 1.9	94.7 $\pm$ 3.2	27.0 $\pm$ 2.1**	0.75
<b>2</b>		100.0 $\pm$ 1.8	104.6 $\pm$ 1.3	103.3 $\pm$ 1.1	100.4 $\pm$ 2.7	91.9 $\pm$ 1.1*	29.0 $\pm$ 1.4**	0.75
<b>3</b>		100.0 $\pm$ 1.0	104.5 $\pm$ 0.9	102.6 $\pm$ 0.8	103.5 $\pm$ 0.8	102.4 $\pm$ 0.8	99.5 $\pm$ 0.8	— <sup>2)</sup>
<b>4</b>		100.0 $\pm$ 1.3	102.0 $\pm$ 1.1	104.0 $\pm$ 3.6	102.1 $\pm$ 2.0	101.1 $\pm$ 1.1	100.5 $\pm$ 1.0	— <sup>2)</sup>

1) Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.

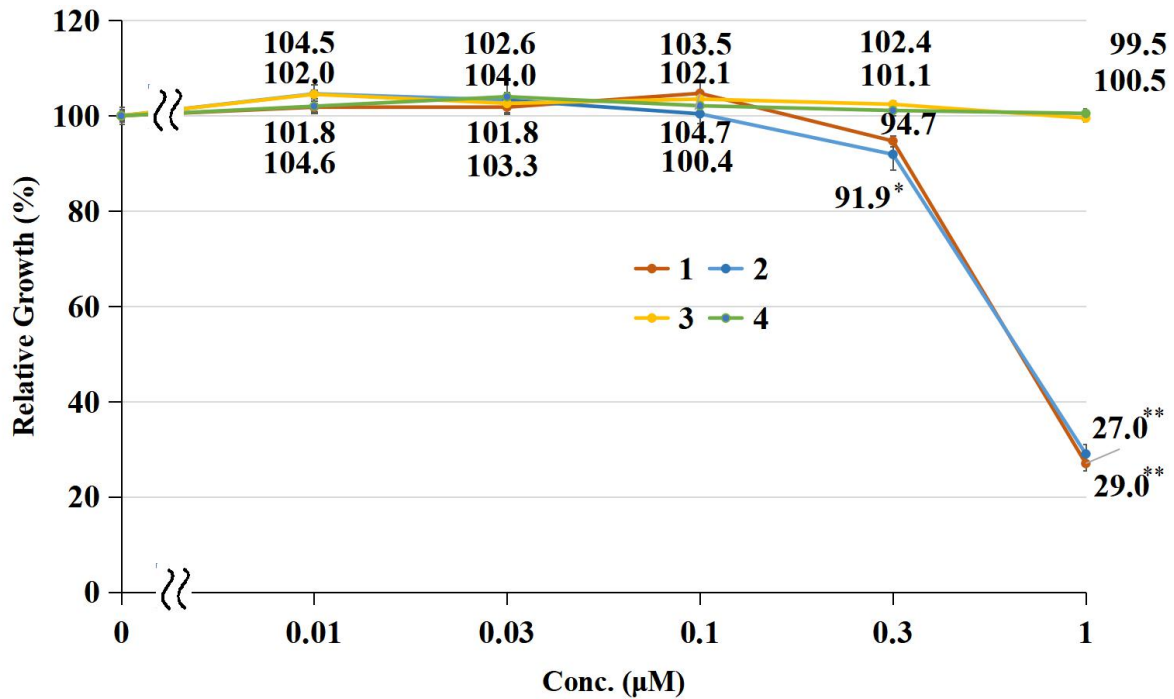
**Table 7** Melanin inhibitory effects of **1-4** in B16 melanoma 4A5 cells.

Sample	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Inhibitory (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
		0	0.01	0.03	0.1	0.3	1	
<b>1</b>		0.0 $\pm$ 4.0	17.5 $\pm$ 3.4**	21.5 $\pm$ 2.7**	31.9 $\pm$ 2.1**	45.1 $\pm$ 0.4**	— <sup>3)</sup>	— <sup>2)</sup>
<b>2</b>		0.0 $\pm$ 4.1	8.8 $\pm$ 4.0	17.2 $\pm$ 4.0*	19.6 $\pm$ 5.3*	36.5 $\pm$ 3.3**	— <sup>3)</sup>	— <sup>2)</sup>
<b>3</b>		0.0 $\pm$ 1.1	15.4 $\pm$ 0.6**	13.2 $\pm$ 3.9*	21.2 $\pm$ 3.8**	22.0 $\pm$ 2.2**	24.7 $\pm$ 1.1**	— <sup>2)</sup>
<b>4</b>		0.0 $\pm$ 3.9	12.2 $\pm$ 4.5	16.4 $\pm$ 3.4*	15.9 $\pm$ 1.9*	8.5 $\pm$ 3.5	16.8 $\pm$ 2.4**	— <sup>2)</sup>

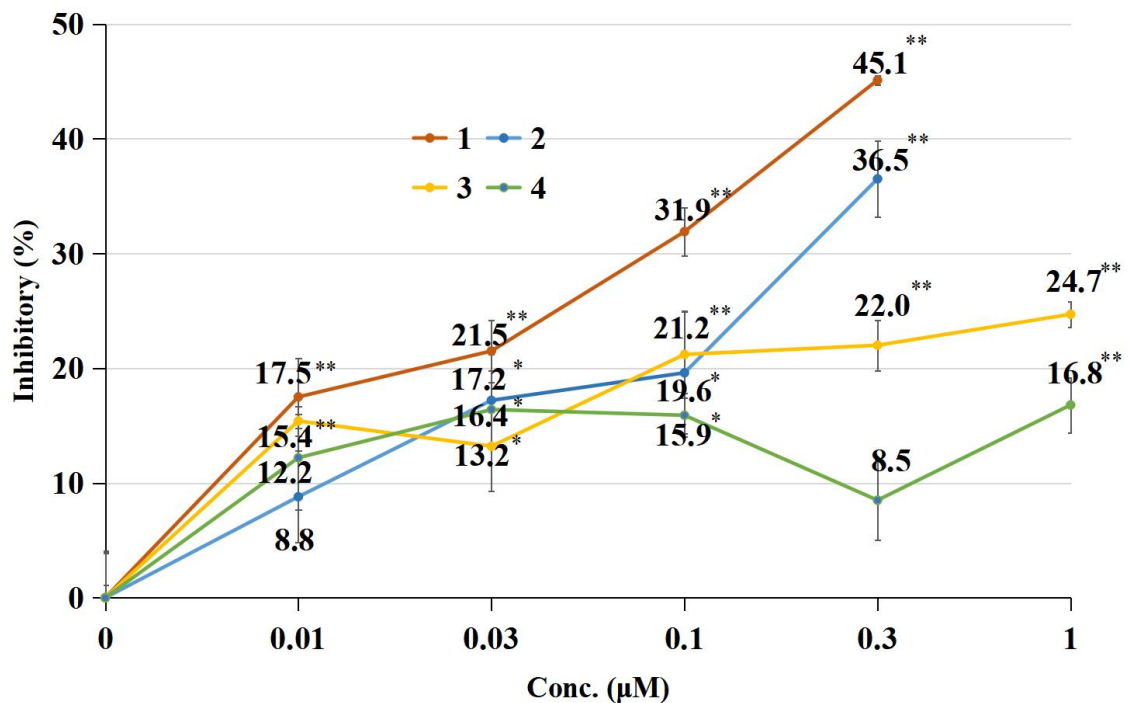
1) Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.

3) The cytotoxic effects was observed.



**Figure 18** Inhibitory effects of 1–4 on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells (Conc. 0.01 ~ 1 µM). Each value represents the mean±S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .



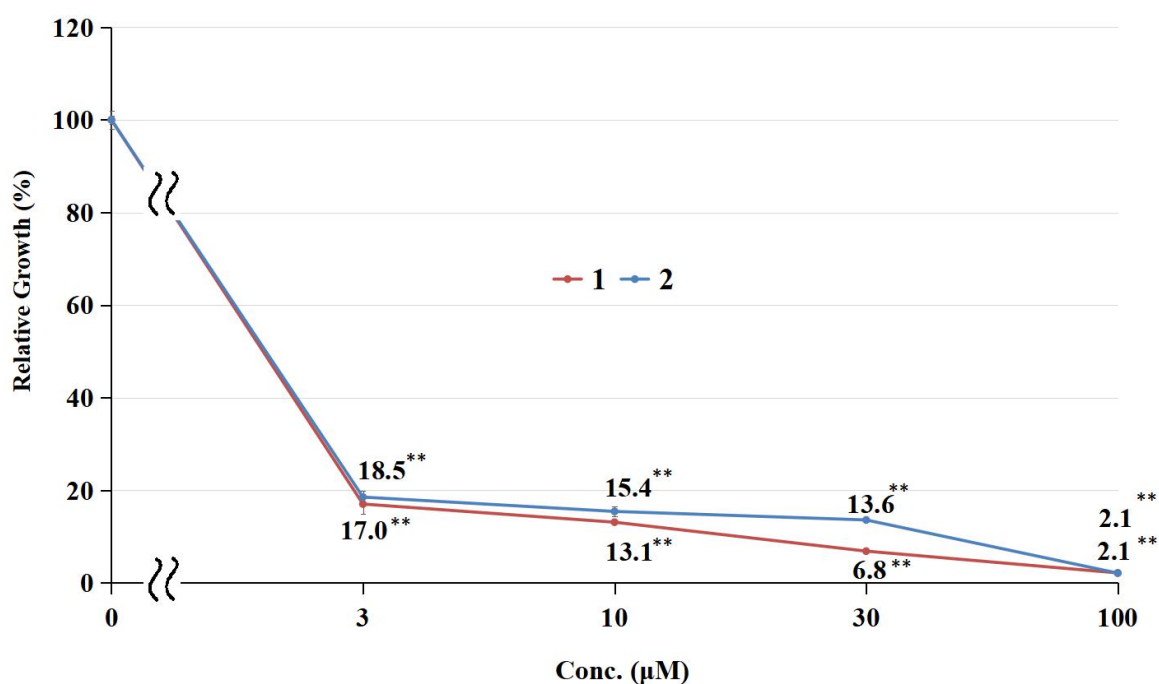
**Figure 19** Melanin inhibitory effects of 1–4 in B16 melanoma 4A5 cells (Conc. 0.01 ~ 1 µM). Each value represents the mean±S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

さらに、単離精製物 **1** および **2** について 1  $\mu\text{M}$  以上で細胞増殖抑制作用を検討した。結果として、**1** および **2** は 3~100  $\mu\text{M}$  の濃度域で同等の細胞増殖抑制作用が増加した (Table 8, Figure 20).

**Table 8** Inhibitory effects of **1** and **2** on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells (Conc. 3~100  $\mu\text{M}$ ).

Sample	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)				
		0	3	10	30	100
<b>1</b>		100.0 $\pm$ 2.0	17.0 $\pm$ 0.4**	13.1 $\pm$ 0.1**	6.8 $\pm$ 0.1**	2.1 $\pm$ 0.1**
<b>2</b>		100.0 $\pm$ 0.9	18.5 $\pm$ 1.0**	15.4 $\pm$ 0.3**	13.6 $\pm$ 0.4**	2.1 $\pm$ 0.2**

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .



**Figure 20** Inhibitory effects of **1** and **2** on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells (Conc. 3~100  $\mu\text{M}$ ).

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

### 第三項 TYR に対する阻害作用

メラニン生成抑制作用の作用機序を検討するため、主要なメラニン合成酵素である TYR に対する阻害作用 (Figure 21) について、L-DOPA を基質として、メラノーマ由来の TYR を用いて、0.01~1  $\mu\text{M}$  の濃度域で検討したが、有意な抑制作用は認められなかった。これらの結果から TYR 阻害作用は単離精製物 1-4 のメラニン生成抑制作用の主なメカニズムではないことが推察された (Table 9)。

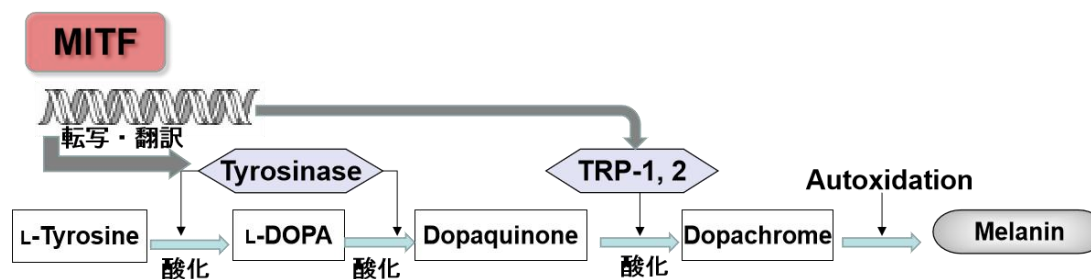


Figure 21 Biosynthesis scheme of melanin.

Table 9 Effects of 1-4 on melanoma tyrosinase enzyme activity.

Sample	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Inhibition (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
		0	0.01	0.03	0.1	0.3	1	
1		0.0 $\pm$ 0.4	-0.6 $\pm$ 0.6	-2.7 $\pm$ 1.3	-2.8 $\pm$ 1.0	-0.1 $\pm$ 1.1	-0.8 $\pm$ 1.3	— <sup>2)</sup>
2		0.0 $\pm$ 1.8	-0.9 $\pm$ 0.8	-0.3 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.5	-2.2 $\pm$ 1.0	-5.6 $\pm$ 0.6	— <sup>2)</sup>
3		0.0 $\pm$ 1.4	-5.4 $\pm$ 1.2	-8.1 $\pm$ 3.5	-10.3 $\pm$ 0.6	-9.5 $\pm$ 0.6	-9.8 $\pm$ 0.8	— <sup>2)</sup>
4		0.0 $\pm$ 0.9	-1.9 $\pm$ 1.7	-1.3 $\pm$ 0.3	-5.0 $\pm$ 0.7	-2.5 $\pm$ 1.5	-6.4 $\pm$ 2.4	— <sup>2)</sup>

1) Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group.

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.

#### 第四項 自動酸化抑制作用

続いて、dopachrome 以降の自動酸化抑制作用 (Figure 21) について検討するため、L-DOPA を基質として、TYR により、dopachrome を合成した後<sup>8</sup>、単離精製物 **1-4** (0.01~100  $\mu\text{M}$ ) を添加し、メラニンの吸光度を測定することで、自動酸化抑制率を算出した。その結果、これらの化合物は有意な抑制作用をほとんど示さなかった。また、**1** および **2** の高濃度側で値がマイナスとなった理由として、**1** および **2** が 10  $\mu\text{M}$  の濃度以上では赤色を呈し、メラニンに吸着し、生成したメラニンと吸光度域が近いことから、測定に影響を与えたためと考えられた (Table 10)。

**Table 10** Effects of **1-4** on autoxidation of dopachrome.

Sample	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Inhibition (%)					IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	
		0	0.01	0.1	1	10		100
<b>1</b>		0.0 $\pm$ 5.8	-3.1 $\pm$ 6.7	-10.6 $\pm$ 6.6	6.9 $\pm$ 6.1	3.1 $\pm$ 5.8	-36.8 $\pm$ 6.2**	— <sup>2)</sup>
<b>2</b>		0.0 $\pm$ 4.3	-8.8 $\pm$ 6.2	-13.7 $\pm$ 3.8	-5.5 $\pm$ 7.2	-24.5 $\pm$ 11.3	-68.3 $\pm$ 3.9**	— <sup>2)</sup>
<b>3</b>		0.0 $\pm$ 10.6	-3.7 $\pm$ 9.4	-10.7 $\pm$ 11.2	-13.3 $\pm$ 10.9	-6.8 $\pm$ 9.0	-10.4 $\pm$ 5.9	— <sup>2)</sup>
<b>4</b>		0.0 $\pm$ 11.2	3.5 $\pm$ 8.1	-7.2 $\pm$ 11.7	-22.1 $\pm$ 5.5	-6.2 $\pm$ 5.3	-17.2 $\pm$ 3.0	— <sup>2)</sup>

1) Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .

2) The IC<sub>50</sub> value could not be calculated.



## 第五項 Auriculataoside A (1) および B (2) の TYR, TRP-1, TRP-2 および転写因子 MITF タンパク質発現量への影響

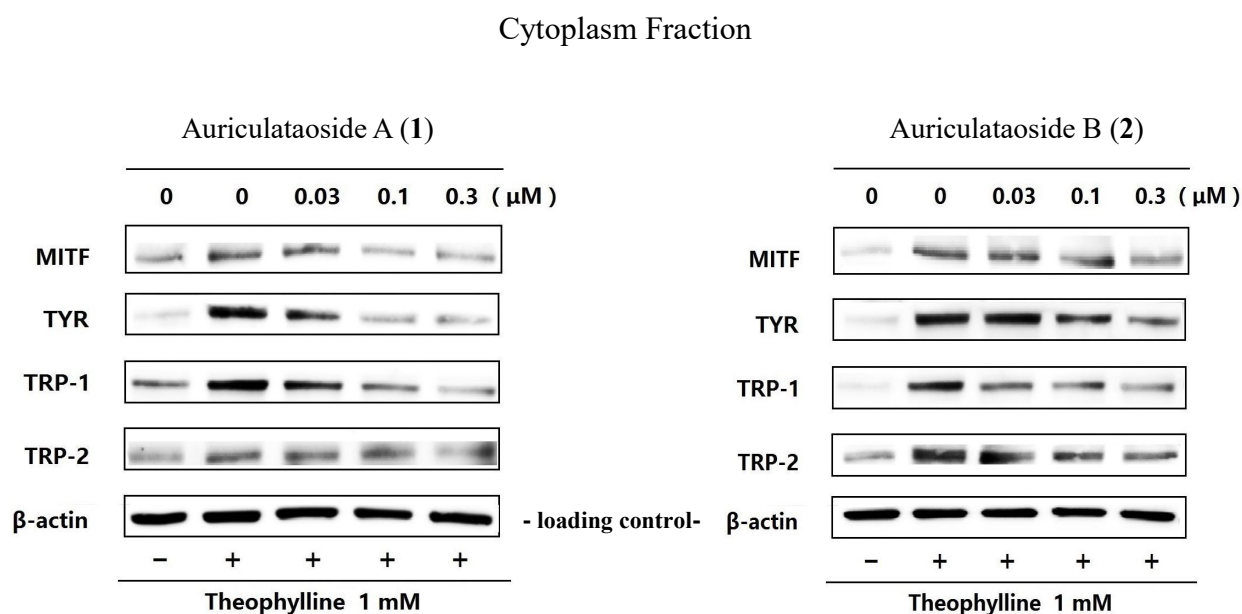
第三および第四項の結果から、単離精製物 **1** および **2** の TYR に対する酵素阻害作用、および自動酸化阻害作用はメラニン生成抑制作用の主なメカニズムではないことが推察された。

そこで次に、メラニン生成に重要なタンパク質である TYR, TRP-1, TRP-2 およびその産生に必要な転写因子である MITF の細胞内でのタンパク質発現量に及ぼす **1** および **2** の影響について theophylline 刺激条件下で検討した。なお、ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin を用いた。

結果として、**1** および **2** を 0.03~0.3  $\mu$ M で処理すると、0.1  $\mu$ M から、TYR, TRP-1, TRP-2 および MITF の発現量が減少した (Figure 22-24)。

一方、theophylline の刺激がない状態でも TYR, TRP-1, TRP-2 および MITF の発現がいずれも観察された。Theophylline の刺激により、TYR, TRP-1, TRP-2 および MITF の発現量がいずれも増加したが、TYR および TRP-1 は刺激がない状態での発現量が低く、増加率が顕著であった。また、theophylline の刺激による TRP-2 の増加率は低い傾向にあった (Figure 22-24)。その原因は各タンパク質の細胞内の含量が異なるためと考えられた。

これらのことから、単離精製物 **1** および **2** メラニン生成抑制作用の作用機序として MITF の発現抑制作用が示唆された。また、**1** および **2** の細胞生存率の低下には MITF の発現抑制の関与が推察された。

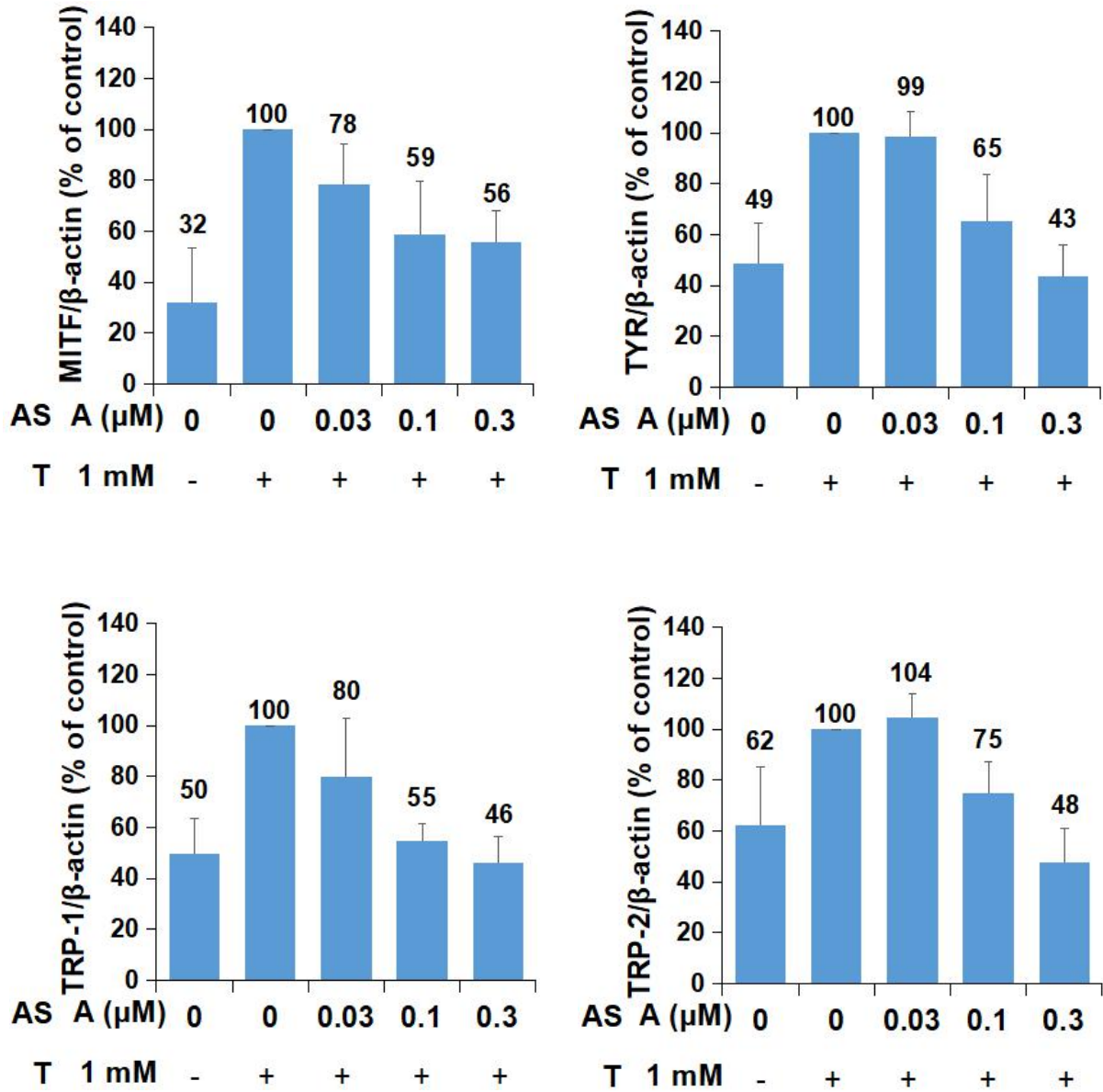


**Figure 22** Effects of **1** and **2** on MITF, TYR, TRP-1, and TRP-2 protein levels. ( $\beta$ -Actin was used as loading control.)

Cytoplasm Fraction

AS: auriculataoside

T: theophylline



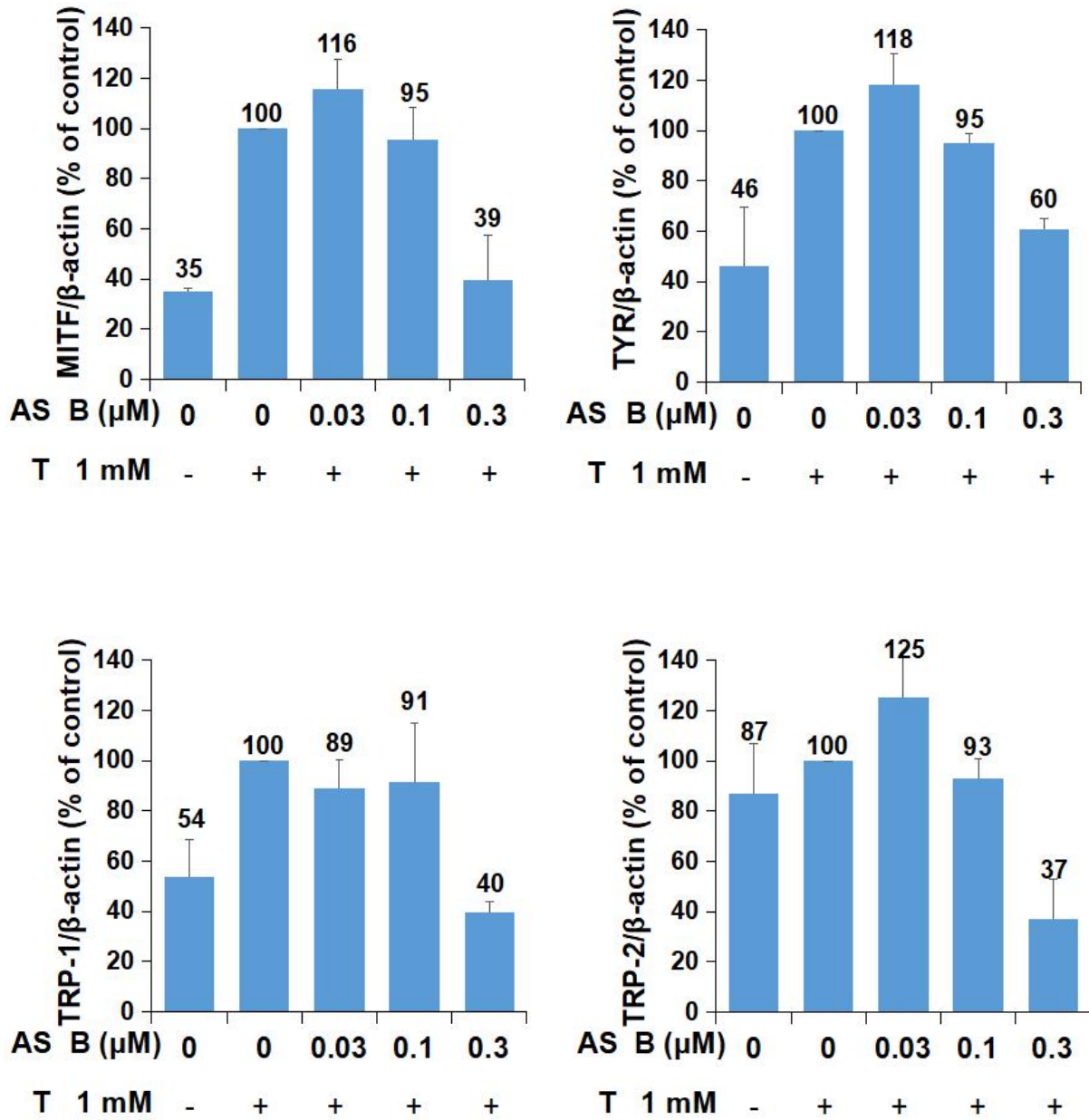
**Figure 23** Effects of auriculataosides A (1) on MITF, TYR, TRP-1 and TRP-2 protein levels.

The target/β-actin in control group [theophylline (+), test sample (-)] was calculated to be 100%, and those in the test sample-treated group were expressed as % of control. Each bar represents the mean with S.E.M. (N=3).

Cytoplasm Fraction

AS: auriculataoside

T: theophylline



**Figure 24** Effects of auriculataosides B (2) on MITF, TYR, TRP-1 and TRP-2 protein levels.

The target/β-actin in control group [theophylline (+), test sample (-)] was calculated to be 100%, and those in the test sample-treated group were expressed as % of control. Each bar represents the mean with S.E.M. (N=3).

## 第二節 Auriculataoside A (1) のメラノーマ細胞に対する増殖抑制作用の検討

前節の結果より，auriculataoside A (1) が MITF の発現を抑制することから，メラノーマ細胞に対してより効果的な増殖抑制作用があると考えられた．そこで，メラノーマ細胞に対する増殖抑制作用および正常細胞に及ぼす影響について，B16 melanoma 4A5 細胞およびヒト皮膚線維芽細胞 (Human dermal fibroblasts, HDF) を用いて検討を行った．

HDF はヒト由来の皮膚線維芽細胞であり，メラノサイトあるいはメラノーマ細胞が存在する基底層の下にある皮膚の真皮に存在する．HDF は結合組織を構成し，コラーゲン，エラスチンおよびヒアルロン酸などを分泌する役割を担っている (Figure 25)<sup>59</sup>．

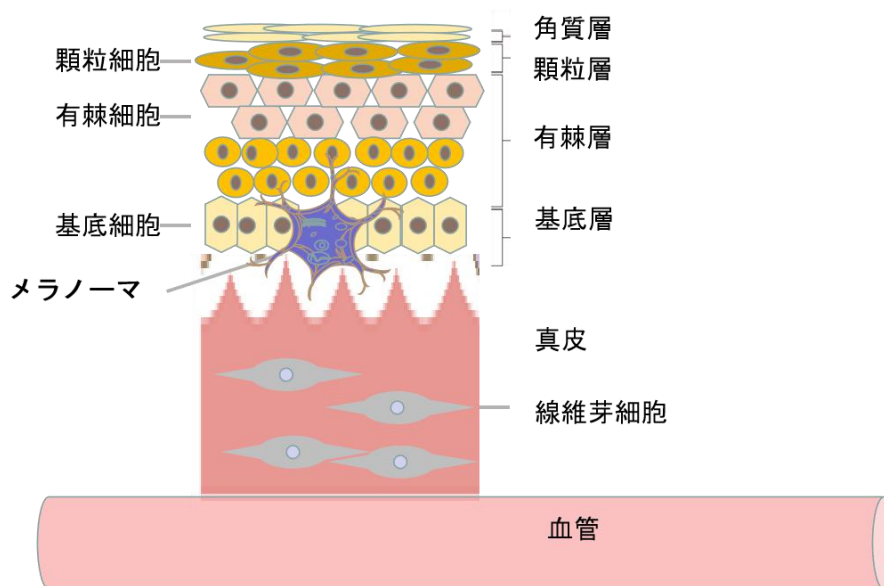


Figure 25 Human dermal fibroblasts.

### 第一項 Auriculataoside A (1) の B16 melanoma 4A5 細胞および HDF 細胞に対する増殖抑制作用の検討

前節の結果において，単離精製物 **1** および **2** は 0.3  $\mu\text{M}$  から 1  $\mu\text{M}$  で B16 melanoma 4A5 細胞の増殖を強く抑制した，より作用強かった **1** のメラノーマ細胞増殖に対する抑制作用の時間依存性について 0.3, 0.7, 1  $\mu\text{M}$  の濃度域で検討した．

マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞を用い，24 時間前培養後，**1** を 0.3, 0.7, 1  $\mu\text{M}$  で処理し，24, 48, 72 時間培養後の細胞生存率を測定した．

その結果，**1** を処理することによって 24 時間では 84.1%の生存率であり，増殖への影響はわずかであったが，48 および 72 時間では 1  $\mu\text{M}$  で顕著な増殖抑制作用が観察され，時間および濃度依存性が認められた (Table 11, Figure 26)．

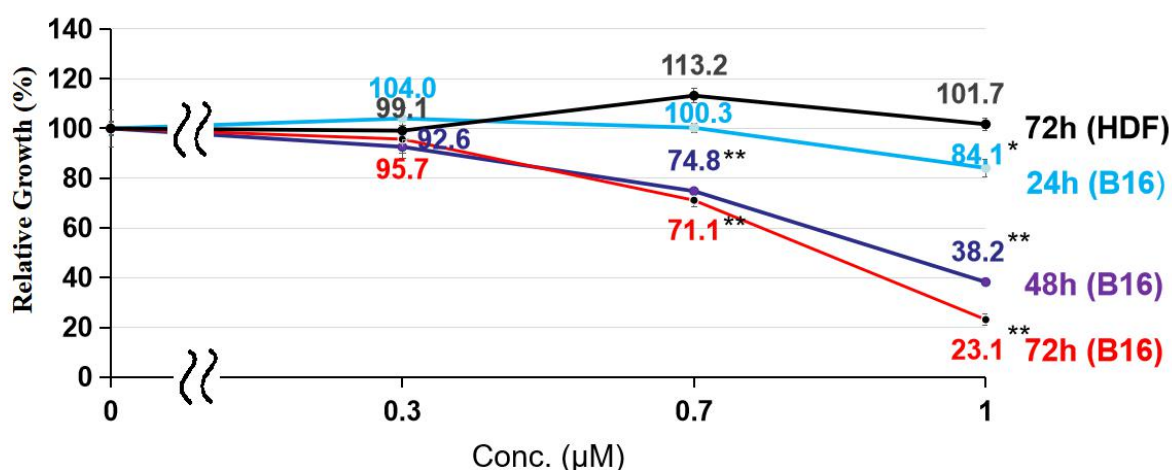
前章の結果から，**1** の B16 melanoma 4A5 細胞に対する生存率の低下には MITF の発現抑制の関与が推察されたため，MITF の関与が低いと考えられる HDF 細胞の増殖への影響について検討した．

単離精製物 **1** は 0.3, 0.7, 1  $\mu\text{M}$  で 72 時間処理しても, 増殖抑制作用を示さなかった。また, **1** の HDF 細胞に対する生存率について 1  $\mu\text{M}$  以上の濃度で検討した。細胞が **1** によって染色されたため, 正確な測定できなかったが, 細胞の接着性が保持されていたことから, HDF 細胞の生存率への影響は少ないと考えられた。

**Table 11** Inhibitory effects of auriculataoside A (**1**), dacarbazine and paclitaxel on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells and/or HDF cells.

Cell line and treatment time	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)				IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
		0	0.3	0.7	1	
24-h treatment of B16 cells		100.0 $\pm$ 2.7	104.0 $\pm$ 4.1	100.3 $\pm$ 1.9	84.1 $\pm$ 3.4*	>1
48-h treatment of B16 cells		100.0 $\pm$ 0.3	92.6 $\pm$ 4.5	74.8 $\pm$ 0.8**	38.2 $\pm$ 1.4**	0.90
72-h treatment of B16 cells		100.0 $\pm$ 7.6	95.7 $\pm$ 5.5	71.1 $\pm$ 2.8**	23.1 $\pm$ 2.3**	0.82
72-h treatment of HDF cells		100.0 $\pm$ 2.4	99.1 $\pm$ 3.9	113.2 $\pm$ 3.0	101.7 $\pm$ 2.4	>1

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

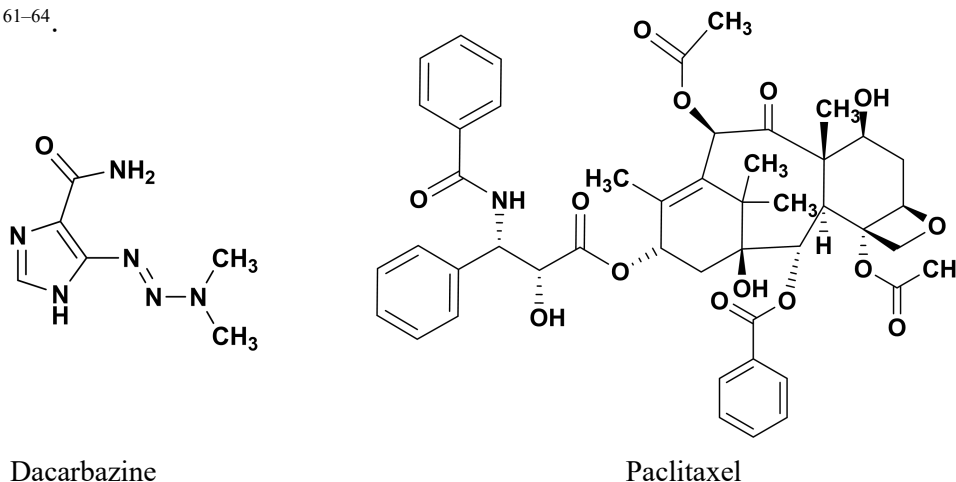


**Figure 26** Inhibitory effects of auriculataoside A (**1**) on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells and/or HDF cells.

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

ダカルバジン (Figure 27) は 1975 年よりメラノーマの治療に Food and Drug Administration (FDA) より承認され、臨床では単独投与で奏効率が 24.2%と報告されている。作用機序については、ダカルバジンは肝臓で脱メチル化され、ジアゾメタンを介し、メラノーマ細胞の核酸をアルキル化することで抗腫瘍効果を示すと考えられている。さらに、細胞周期への影響については低濃度域 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では G1 期を停止させ、高濃度域 (233  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) では G2 期も停止させることが報告されている。しかしながら、B16 melanoma F10 に対する *in vivo* 実験では延命効果を示すが、B16 メラノーマ細胞に対する増殖抑制作用は、72 時間での  $\text{IC}_{50}$  が 10 mM 以上となることが報告されている<sup>60</sup>。

パクリタキセル (Figure 27) はタイヘイヨウイチイ (*Taxus brevifolia*) の樹皮から単離され、肺がん、卵巣がん、メラノーマなどに化学療法薬として用いられている。作用機序については、微小管を安定化させることにより微小管のダイナミクスを抑制し、細胞の有糸分裂を妨げる。また、B16 melanoma F10 細胞に対する増殖抑制作用は、24 時間での  $\text{IC}_{50}$  が 6.7  $\mu\text{M}$  と報告されている<sup>61-64</sup>。



**Figure 27** Chemical structures of dacarbazine and paclitaxel.

次に、メラノーマの化学療法薬として用いられているダカルバジン<sup>18</sup>およびパクリタキセル<sup>62,63</sup>を用い、B16 melanoma 4A5 細胞増殖に対する抑制作用を検討した。

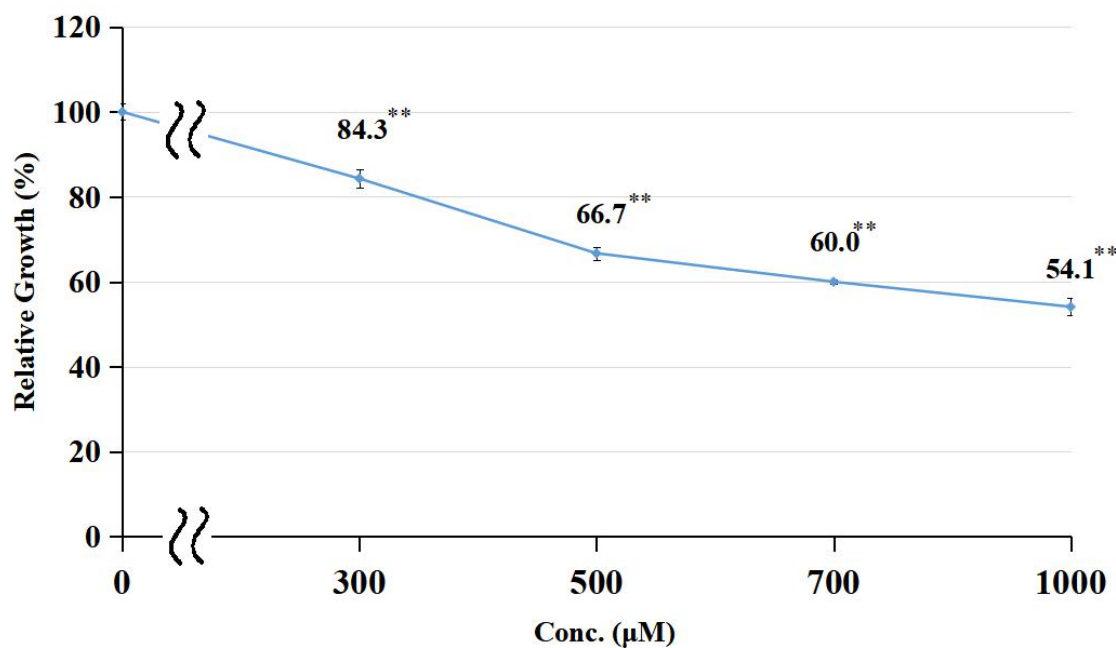
その結果、ダカルバジン処理では 72 時間、1,000  $\mu\text{M}$  で 50%以上の生存率を示し、弱い効果しか認められなかった (Table 12, Figure 28)。パクリタキセルは 72 時間、10  $\mu\text{M}$  で生存率 46.9%であり、 $\text{IC}_{50}$  は 8.6  $\mu\text{M}$  であった (Table 13, Figure 29)。同一条件下で単離精製物 **1** の  $\text{IC}_{50}$  は 0.82  $\mu\text{M}$  であり、より強い抑制作用を示した。その原因について、ダカルバジンは肝臓で脱メチル化された後活性化されるためと考えられている<sup>18,60</sup>。また、過去の研究において、パクリタキセルはヒト線維肉腫細胞 (human fibroblasts fibrosarcoma cell, HT1080) および B16 melanoma F10 細胞に対する増殖抑制作用は 24 時間で  $\text{IC}_{50}$  は 0.1  $\mu\text{M}$  以上であることから、細胞種により抑制効果が異なることが考えられている。

これらの結果から単離精製物 **1** は B16 melanoma 4A5 細胞に対して MITF を介して細胞選択的な増殖抑制作用を示した可能性が考えられた。

**Table 12** Inhibitory effects of dacarbazine on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Dacarbazine	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)					$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
		0	300	500	700	1000	
72-h treatment of B16 cells		$100.0 \pm 1.9$	$84.3 \pm 2.2^{**}$	$66.7 \pm 1.5^{**}$	$60.0 \pm 0.5^{**}$	$54.1 \pm 2.0^{**}$	>1000

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group,  $^{**}p<0.01$ .



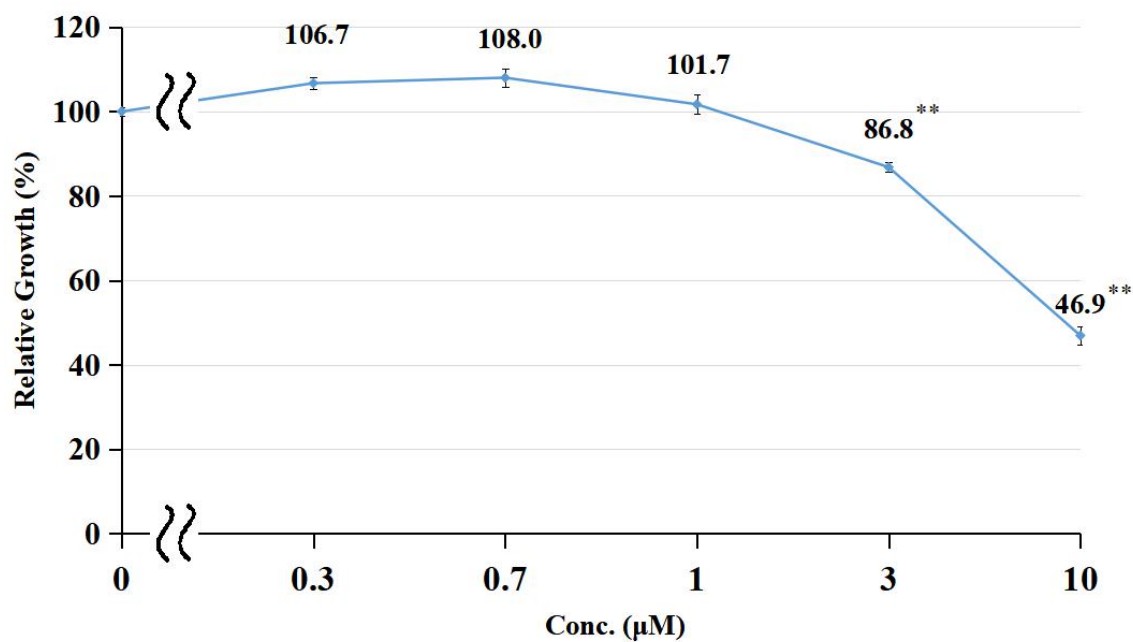
**Figure 28** Inhibitory effects of dacarbazine on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group,  $^{**}p<0.01$ .

**Table 13** Inhibitory effects of paclitaxel on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Paclitaxel	Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Relative Growth (%)						IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
		0	0.3	0.7	1	3	10	
72-h treatment of B16 cells		100.0 $\pm$ 1.0	106.7 $\pm$ 1.3	108.0 $\pm$ 2.2	101.7 $\pm$ 2.3	86.8 $\pm$ 1.1**	46.9 $\pm$ 2.1**	8.6

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .



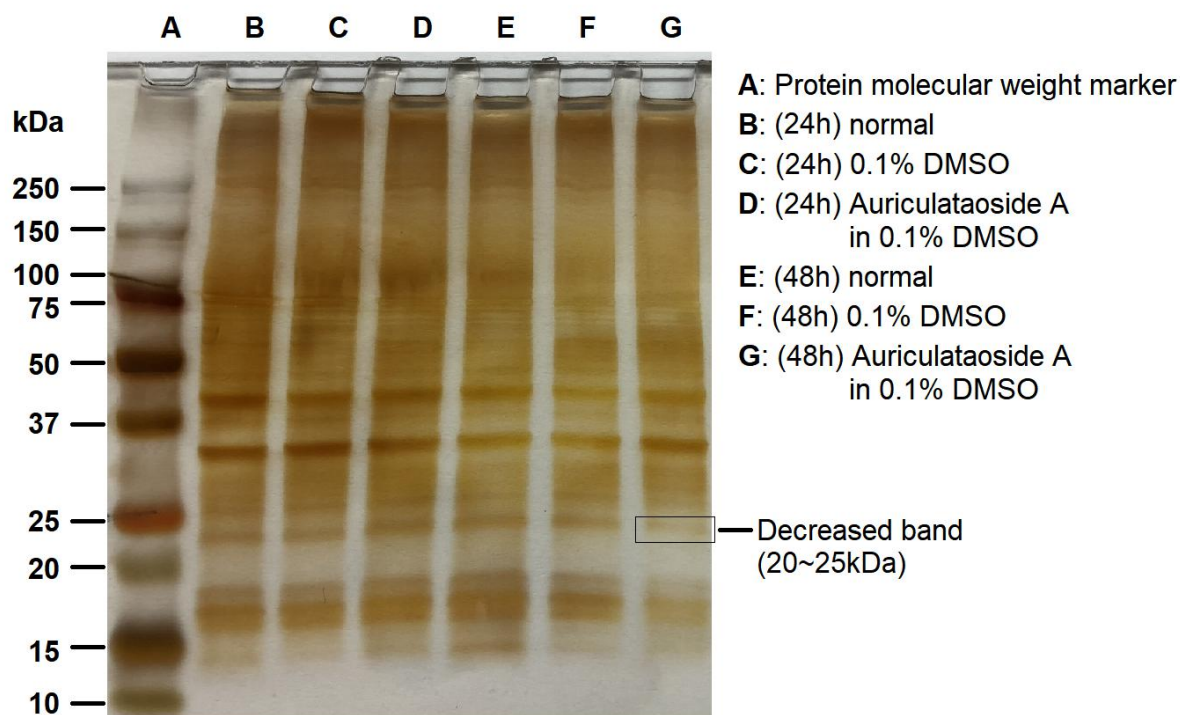
**Figure 29** Inhibitory effects of dacarbazine on relative growth in B16 melanoma 4A5 cells.

Each value represents the mean $\pm$ S.E.M. ( $N=4$ ). Significantly different from the control group, \*\* $p<0.01$ .



## 第二項 B16 melanoma 4A5 細胞の発現量変化タンパク質の解析

細胞増殖抑制作用の作用様式を検討するため、単離精製物 **1** 処理による細胞内タンパク質発現量の相対的な変化を確認した。B16 melanoma 4A5 細胞に、**1** を  $1\ \mu\text{M}$  で 24, 48 時間処理した後、タンパク質を抽出した。Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分子量毎に展開したところ、 $1\ \mu\text{M}$  (レーン G) で 48 h 後以降に 20~25 kDa のタンパク質の減少が観察された (Figure 30)。G レーンで減少したバンドに相当する F レーン (0.1% Dimethyl sulfoxide, DMSO) のバンドを切り取り、ゲル内消化後に Liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) および MASCOT program を用いて解析した。得られたペプチドのアミノ酸序列 [Observed: 470.5651 and 705.3442, Mr (expt): 1408.6734 and 1408.6739, Mr (calc): 1408.6769, each, peptides: DGVREVFEMATR, each] は Rho GTPase ファミリーに 100% 類似度を有することから、減少したタンパク質は Rho GTPase ファミリーであると推定された。



**Figure 30** Assay for change of whole protein expression pattern.

A: Protein molecular weight marker. B: Normal for 24 h. C: Treatment with 0.1% DMSO for 24 h. D: Treatment with auriculataoside A (**1**) in 0.1% DMSO (final concentration:  $1\ \mu\text{M}$ ) for 24 h. E: Normal for 48 h. F: Treatment with 0.1% DMSO for 48 h. G: Treatment with auriculataoside A (**1**) in 0.1% DMSO (final concentration:  $1\ \mu\text{M}$ ) for 48 h.

### 第三項 Cdc42, Rac1 および RhoA のタンパク質発現への影響

Rho GTPase ファミリーは、低分子シグナル伝達グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質) であり、細胞骨格、細胞運動、細胞極性、細胞接着、細胞周期、細胞増殖、細胞質分裂など幅広い役割を担っている<sup>64-70</sup>。GTPase activating protein (GAP), guanine nucleotide exchange factor (GEF) および GDP dissociation inhibitor (GDI) によって、guanosine diphosphate (GDP) - guanosine triphosphate (GTP) の量的バランスを調整し、また GTP 水解反応により、GDP 結合型と活性体 GTP 結合型の間で変化することにより Rho GTPase ファミリーの活性化を制御することが報告されている (Figure 31)<sup>64</sup>。また、最近、Rho GTPase ファミリーの発現が microRNA (mir-133: RhoA および Cdc42 ; mir-124: RhoA および Cdc42) によって制御されることが報告されている<sup>71</sup>。Rho GTPase ファミリーのうち、Rac homolog gene family member A (Rho), Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) および cell division cyclin 42 (Cdc42) は、最も研究されており、cyclin D1 発現を制御することにより、細胞周期および細胞増殖を促すことが報告されている<sup>66</sup>。

一方、Rho, Rac1 および Cdc42 は、PAK, nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) および c-jun N-terminal kinase (JNK)などを活性化することにより、がんの増殖などを促進する<sup>72</sup>。また、cofilin 発現を制御することにより、がん細胞の浸潤を促進することが報告されている<sup>73</sup>。

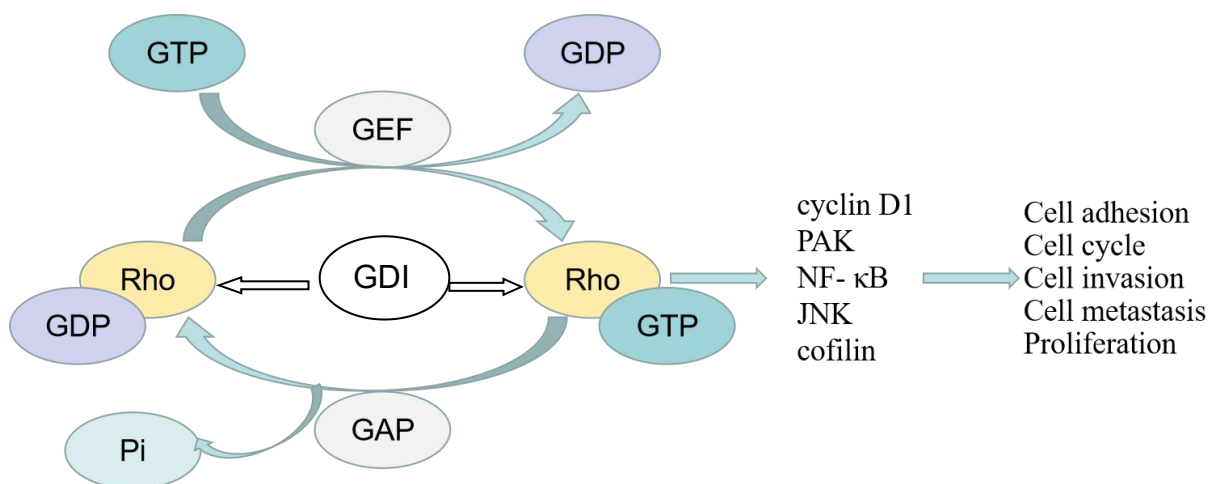
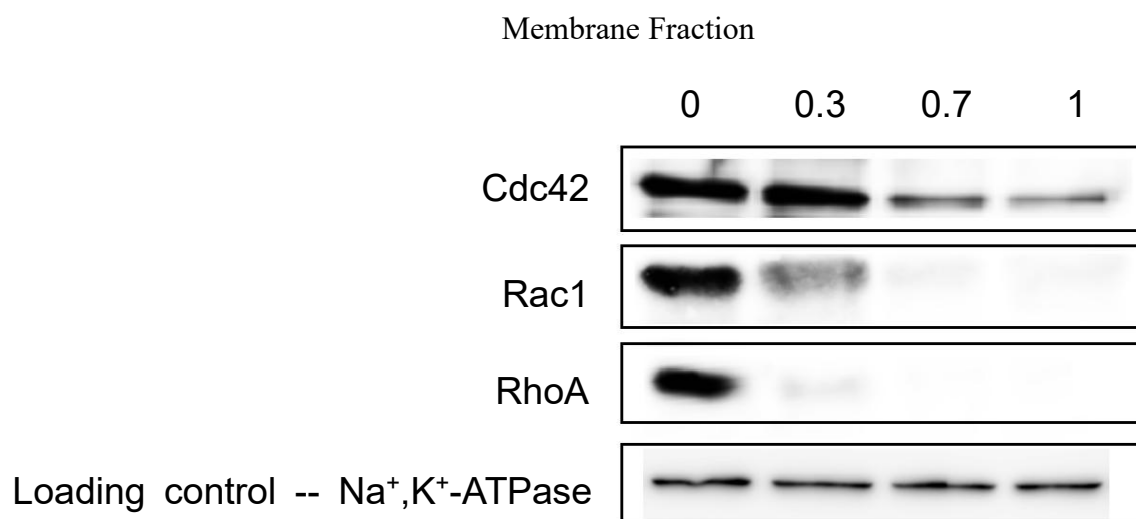
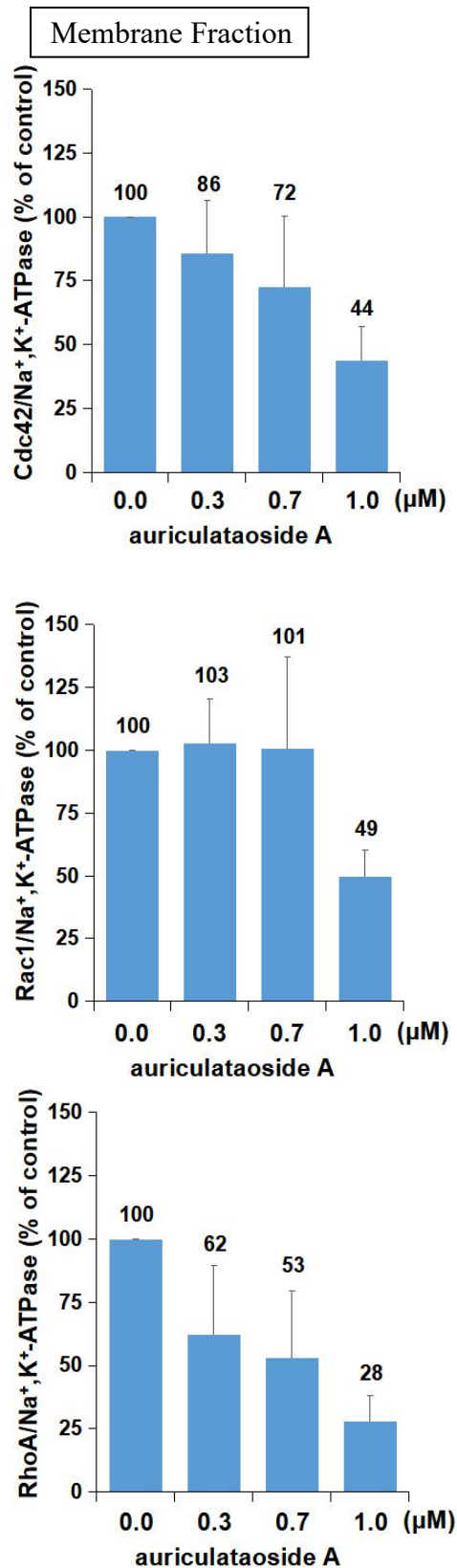


Figure 31 The Rho GTPase family signaling pathway.

次に、Cdc42, Rac1, RhoA 細胞膜での発現への影響を検討するため、B16 melanoma 4A5 細胞を用い、24 時間前培養後に単離精製物 **1** を 0.3, 0.7, 1  $\mu\text{M}$  で処理し、さらに 72 時間培養後、タンパク質を抽出した。 **1** 処理では、Cdc42 の発現量が 0.7  $\mu\text{M}$  以上の濃度で、濃度依存的な減少が観察された。 Rac1 についても同様の傾向が認められた。 また、RhoA の発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度から減少が観察された (Figure 32, 33)。 なお、ローディングコントロールには  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase を用いた。



**Figure 32** Effects of auriculataoside A (**1**) on Cdc42, Rac1 and RhoA protein expression.  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase was used as loading control.



**Figure 33** Effects of auriculatooside A (1) on Cdc42, Rac1 and RhoA protein levels.

Cdc42, Rac1, RhoA/Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in control group [test sample (0)] was calculated to be 100%, and those in the test sample-treated group were expressed as % of control. Each bar represents the mean with S.E.M. (N=3).

#### 第四項 細胞周期への影響

細胞周期は1つの細胞が2つの娘細胞を生み出す過程であり、間期と分裂期 (M 期, Mitotic phase) とに分けられる。また間期はさらに DNA 合成準備期 (G1 期, First gap), DNA 合成期 (S 期, Synthesis), 分裂準備期 (G2 期, Second gap) に分けられる。G1 期では細胞は大きくなり, RNA, リボソームおよび次の S 期で DNA を合成するために, 必要とされる種々の酵素が合成・蓄積される。S 期では DNA ヘリカーゼが2本鎖 DNA を開裂, 複製, 再結合させることで2組の2本鎖 DNA が生成される。DNA 合成の終了後, G2 期では, 再び盛んなタンパク質合成が行われ, 有糸分裂に必要な微小管が作られる<sup>74,75</sup>。

また, M 期はさらに有糸分裂と細胞質分裂に分けられる。G2 期から有糸分裂に入ると, 有糸分裂の前期 (Prophase) では染色体凝縮や核膜消失, 中期 (Metaphase) では染色体の整列, 後期 (Anaphase) では姉妹染色分体が分離して, 細胞の両極に分かれ, 終期 (Telophase) で2つの核が形成し, 続く細胞質分裂で細胞質が分割して2つの娘細胞が生み出される。一時的に停止した細胞は, 休止期 (G0 期) に入る。正常細胞では外部の損傷などの刺激により, 再度細胞周期に入ることが可能である (Figure 34)<sup>76</sup>。

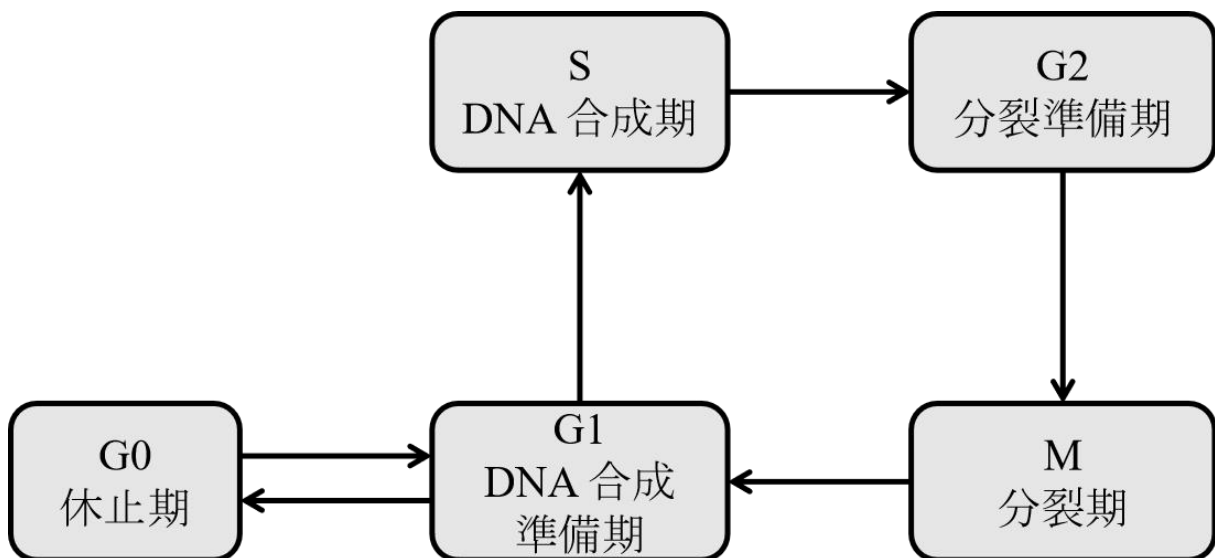
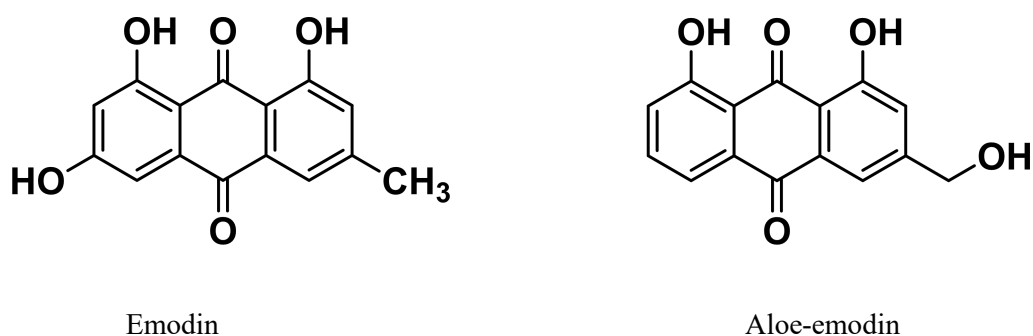


Figure 34 Cell cycle.

CDK は主要な細胞周期調節因子であり, その中の一種 CDK2 はメラノーマにおける MITF によって特異的に制御され<sup>30</sup>, cyclin D1 との結合によって, 細胞周期 G1 期から S 期への移行に重要な役割を担っている<sup>77-79</sup>。また, Rho GTPase ファミリーは cyclin D1 発現を制御することにより, 細胞周期 G1 期から S 期への移行を促していることが報告されている<sup>80</sup>。

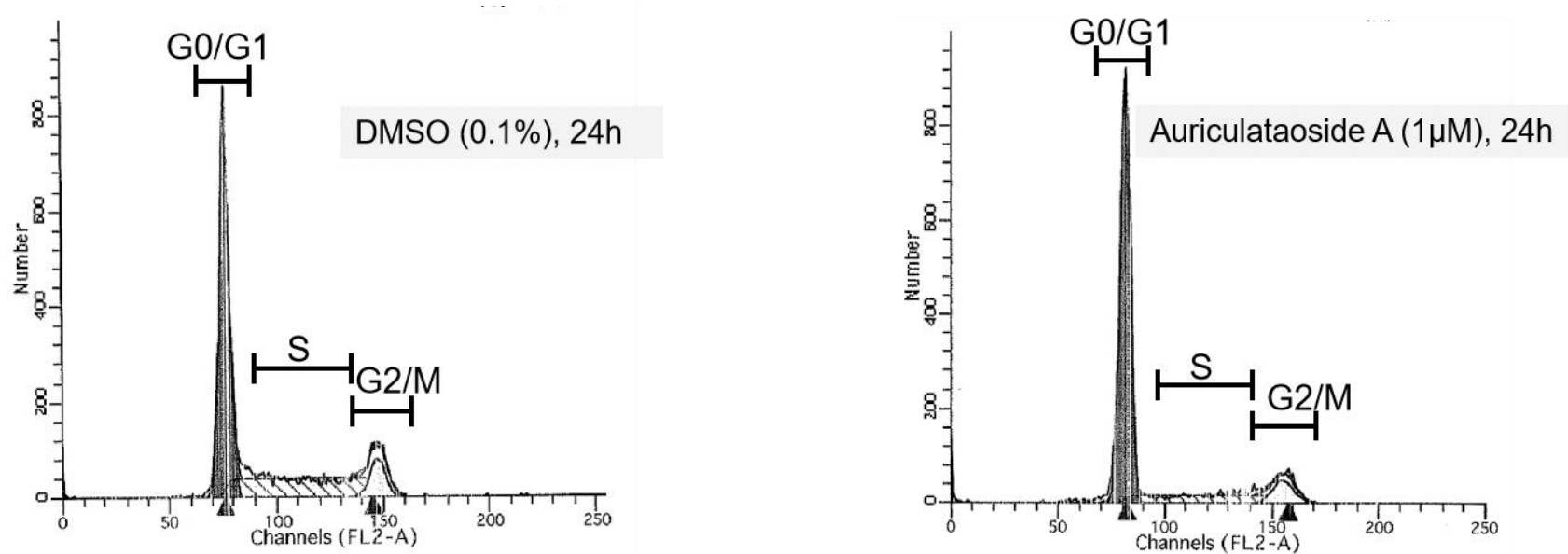
一方、アントラセノン類 emodin および aloe-emodin (Figure 35) は比較的高濃度 ( $IC_{50}$ : 40~100  $\mu$ M) で子宮頸癌細胞 (HeLa), T 細胞白血病細胞 (CEM) など, 数種のがん細胞に対して細胞増殖抑制作用を示すことが報告されている<sup>46-49</sup>. また, 細胞周期に及ぼす作用として, emodin はヒト腎臓近位尿細管上皮細胞 (Human kidney 2, HK-2) に対して G1 期に停止させること<sup>81</sup>, aloe-emodin はヒト前骨髄性白血病細胞 (Human leukemia, HL-60) に対して G2 期に停止させること<sup>82</sup>が報告されている. 一方, MITF の抑制により, cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) である p27 を介し, 細胞周期 G1 期に停止させることが報告されている<sup>83</sup>. これらの報告から細胞種または化学構造の違いによって細胞周期に及ぼす作用に違いがあると考え, B16 melanoma 4A5 細胞における, 細胞周期に及ぼす単離精製物 **1** の影響について検討した.



**Figure 35** Chemical structures of emodin and aloe-emodin.

結果として, 単離精製物 **1** を 1  $\mu$ M の濃度で 24 時間処理すると, 0.1% DMSO で処理した細胞と比較して, G2/M 期の割合の変化は認められなかったが, S 期の割合の減少と G0/G1 期の割合が増加が確認された (Table 14, Figure 36). この結果は Cdc42, Rac1, RhoA および MITF の細胞周期への影響に関する報告<sup>80, 83, 84</sup>と一致するものであった.

以上より, **1** の処理による G0/G1 期の割合の増加は, Cdc42, Rac1 および RhoA 発現量の減少や, MITF 発現量の減少によって, cyclin D1 発現あるいは CDK2 発現が減少したためと考えられた. また, CDK2 は多くの細胞種において発現するが, 結腸癌細胞や他のいくつかの癌細胞における CDK2 の阻害は増殖にほとんど影響を及ぼさないと報告されているため<sup>85</sup>, **1** が B16 melanoma 4A5 細胞に対して細胞選択的な増殖抑制作用を示す理由の一つと考えられた.



**Figure 36** Effect of auriculataoside A (**1**) on cell cycle B16 melanoma 4A5.

**Table 14** Rate of cell cycle after treatment with auriculataoside A (**1**) in B16 melanoma 4A5.

Treatment	Phase (%)		
	G0/G1	S	G2/M
DMSO (0.1%)	55.6	36.4	8.0
Auriculataoside A ( <b>1</b> ; 1 $\mu$ M))	73.0	19.0	8.0

第五項  $\beta$ -catenin, c-Myc および MITF のタンパク質発現への影響

Wnt シグナル伝達経路は、Wnt タンパク質と Wnt 受容体 (Frizzled ファミリー, Fz および Low-density lipoprotein receptor related protein, LRP) の結合によって、臓器の形成、組織の再生などの生理現象において重要な役割を担っている。Wnt シグナル伝達経路は、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路、また planar cell polarity (PCP) に分類される。Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は細胞の増殖、分化および細胞周期などを制御する<sup>86,87</sup>。Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路は phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ) を介し、protein kinase C (PKC) および  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) を制御することにより細胞間接着や細胞動態などを制御する<sup>88</sup>。PCP 経路では、Rho GTPase family/JNK を介し、細胞骨格形成、細胞の極性や運動などを制御する (Figure 37)<sup>88</sup>。一方、Wnt シグナル伝達経路の変異が骨や心血管系の石灰化、骨密度、がん細胞の増殖浸潤などの病気と関わっている<sup>89-91</sup>。

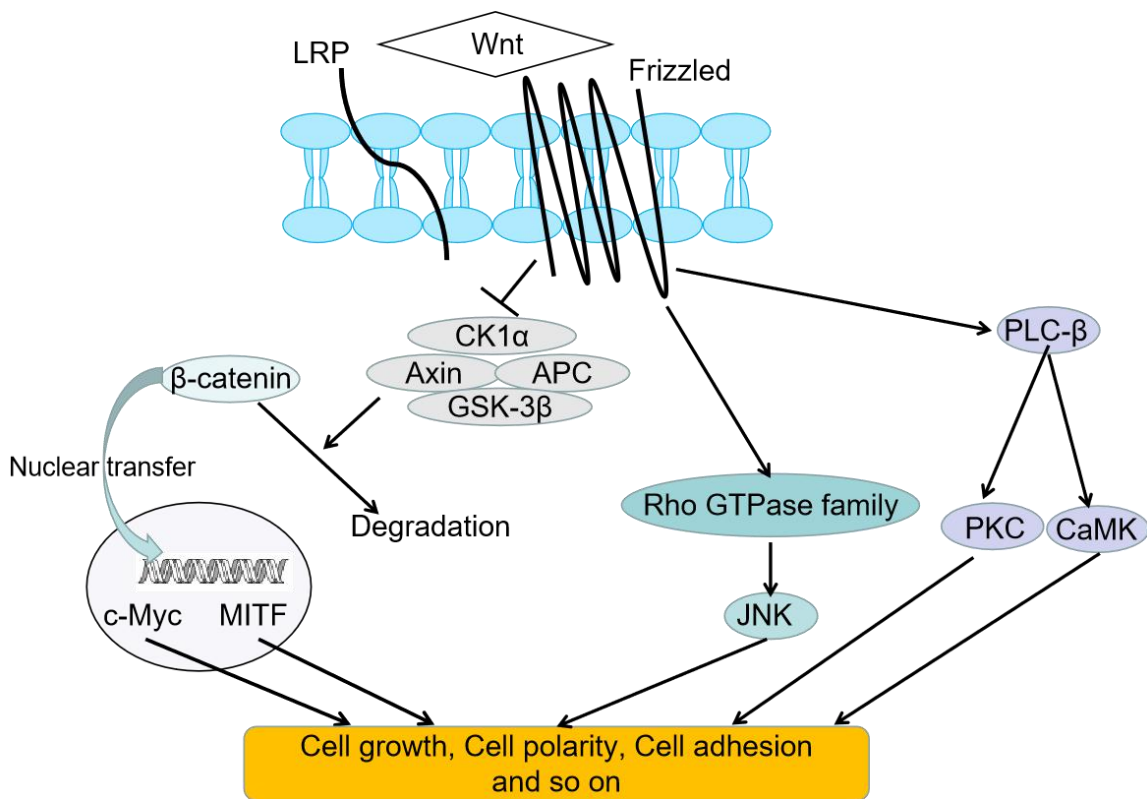


Figure 37 Wnt signaling pathway.

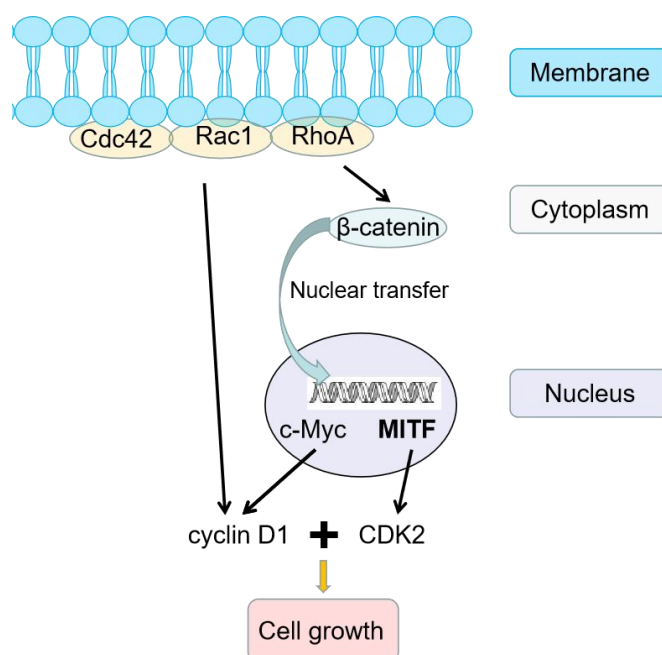
Wnt/ $\beta$ -catenin 経路では、産生した $\beta$ -catenin が Axin, adenomatous polyposis coli (APC), glycogen synthase kinase-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) および casein kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) により分解されるが、メラノーマ細胞では APC などが変異で活性を失うことによって、 $\beta$ -catenin が細胞質内に蓄積し、核移行を促すことで、下流にある MITF, cellular-myelocytomatosis viral oncogene (c-Myc) などの転写を促進する<sup>92</sup>。



c-Myc 転写因子は、cyclin D1 などの細胞増殖に関わる遺伝子の転写を促進して細胞増殖を促進する<sup>93</sup>.

また、Rho GTPase ファミリー中の Rac1 および RhoA はβ-catenin を安定させ、核移行を促進することが報告されている<sup>94,95</sup>.

すなわち、Rac1 および RhoA の活性化により、β-catenin の核内蓄積を促進し、転写因子である c-Myc および MITF の転写を促進すると考えられる。次に、生成した cyclin D1 および CDK2 の結合により、細胞周期 G1 期の進行、あるいは細胞増殖を促進すると考えられる (Figure 38). そこで、β-catenin の核移行、また MITF および c-Myc の発現に対する単離精製物 **1** の影響を検討した。

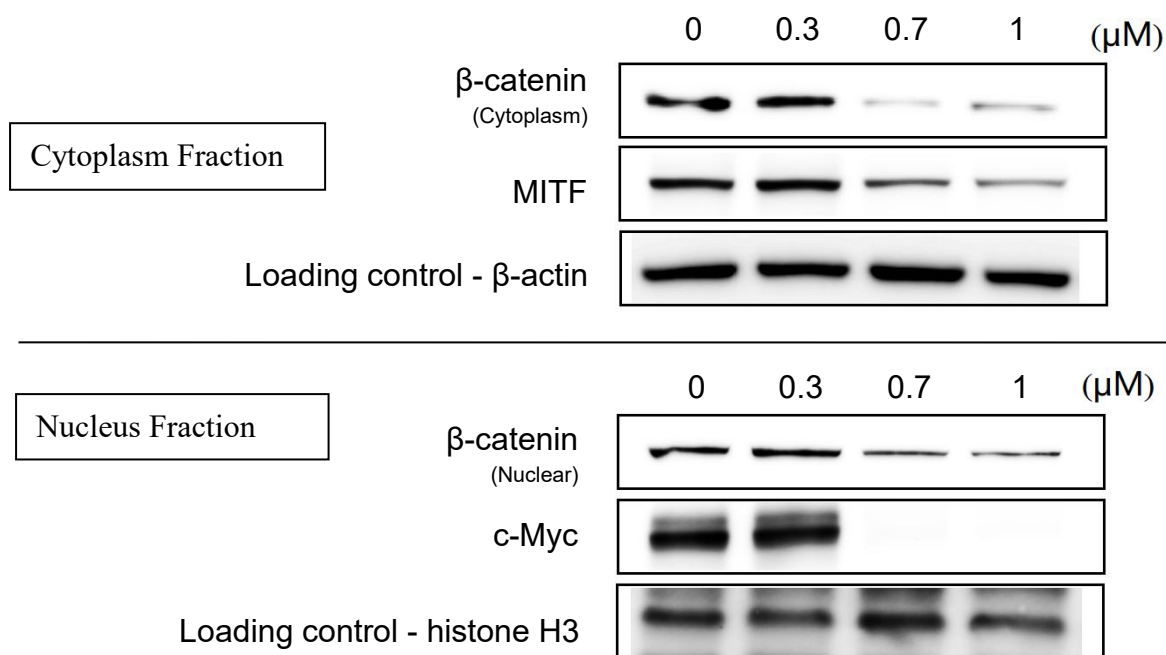


**Figure 38** Signals of melanoma cell proliferation.

B16 melanoma 4A5 細胞を用い、24 時間前培養後、**1** を 0.3, 0.7, 1  $\mu\text{M}$  で加え、さらに 72 時間培養後、タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法にてタンパク質発現量を解析した。その結果として、0.7  $\mu\text{M}$  以上の **1** 処理によって、細胞質内のβ-catenin の発現量が濃度依存的に減少していた。核内へ移動したβ-catenin の発現量も同様に 0.7  $\mu\text{M}$  以上の濃度で減少していた (Figure 39, 40). このことから、β-catenin 細胞質内の蓄積および核内の発現が **1** の処理によって、抑制されると考えられた。

一方、β-catenin の下流にある MITF (細胞質内) および c-Myc (細胞核内) の発現量について検討した。MITF および c-Myc は 0.7  $\mu\text{M}$  の以上の濃度で発現量が減少していた。なお、ローディングコントロールとしてβ-actin (細胞質内) および histone H3 (核内) を用いた (Figure 39, 40).

以上の結果より、単離精製物 **1** は Cdc42, Rac1, RhoA およびβ-catenin/c-Myc の発現量を減少させ、また MITF の発現量を減少させることによって、B16 melanoma 4A5 細胞に対して細胞選択的な増殖抑制作用を示すと考えられた。



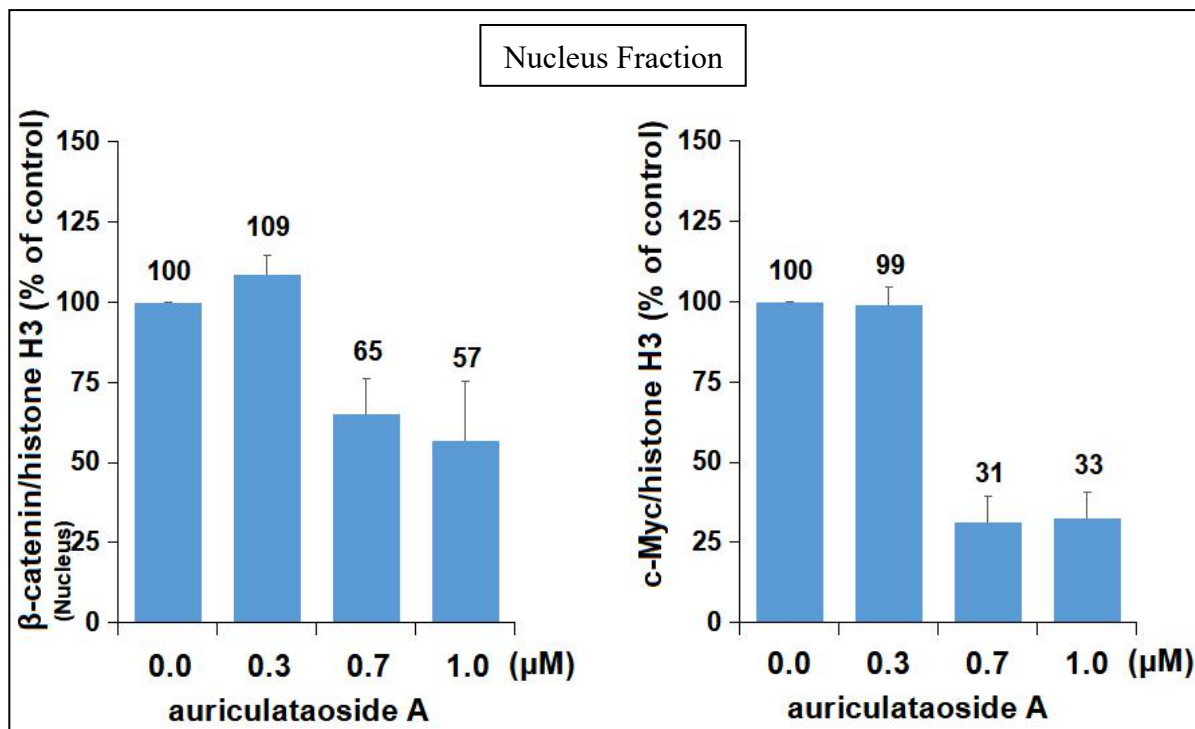
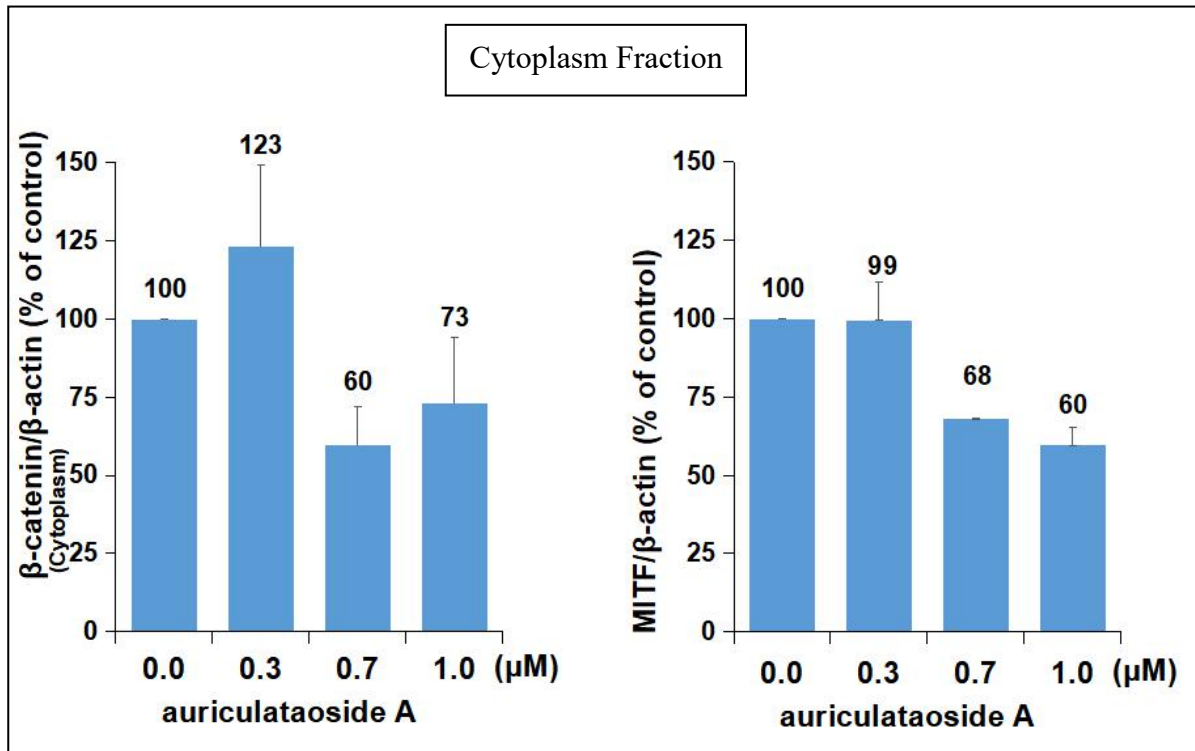
**Figure 39** Effects of auriculataoside A (**1**) on  $\beta$ -catenin (in both cytoplasm and nucleus), MITF and c-Myc protein expression.

$\beta$ -Actin and histone H3 were used as loading control.

最近、メラノーマに対する CTLA-4, PD-1 および programmed cell death ligand-1 (PD-L1) などを用いた免疫療法において Wnt/ $\beta$ -catenin 経路による T 細胞の活性化阻害がメラノーマ細胞の免疫回避に寄与していることが報告されている<sup>25</sup>.

一方、 $\beta$ -catenin による免疫回避はメラノーマ細胞においては MITF および c-Myc を介して促されていると考えられているが、 $\beta$ -catenin および c-Myc は多数のがん細胞に発現しており<sup>92</sup>, メラノーマ細胞以外の他のがん細胞においても免疫回避に寄与していると考えられる.

本研究において、 $\beta$ -catenin の発現量を抑制したことから、単離精製物 **1** は新しい標的を持つ治療薬および治療法の開発に貢献することが期待される.



**Figure 40** Effects of auriculataoside A (1) on β-catenin (cytoplasm & nucleus), MITF and c-Myc protein levels.

MITF and c-Myc/β-actin, β-catenin (cytoplasm)/β-actin, β-catenin (nucleus)/histone H3 in control group [test sample (0)] was calculated to be 100%, and those in the test sample-treated group were expressed as % of control. Each bar represents the mean with S.E.M. (N=3).

## 小括

第二章では、MeOH 溶出部に細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が認められたことから、メラノーマ細胞特異的ながん遺伝子である MITF に着目し、細胞増殖抑制作用とメラニン生成抑制作用を指標にメラノーマ細胞に対する選択的な増殖抑制物質の探索を目的として、単離精製物 **1-4** の細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用について検討した。

その結果、単離精製物 **1** および **2** に 1  $\mu\text{M}$  で B16 melanoma 4A5 細胞における増殖抑制作用 (抑制率: 73.0%および 71.0%, Table 6) および 0.3  $\mu\text{M}$  でメラニン生成抑制作用 (抑制率: 45.1%および 36.5%, Table 7) を見出した。また、B16 melanoma 4A5 に対して、**1** および **2** の細胞増殖抑制作用が濃度および時間依存的に増強することが認められた。細胞増殖抑制作用に関してはアントラセノン二量体 **1** および **2** の差がほとんど認められなかったことから、立体配置の影響は少ないと考えられた。単量体 **3** および **4** は細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用について、0.01~1  $\mu\text{M}$  で有意な抑制作用が認められなかった。

酵素活性阻害および自動酸化阻害作用について検討したが、単離精製物 **1-4** 処理では有意な阻害作用が認められなかった。

一方、単離精製物 **1** および **2** の影響により、MITF の発現量の減少が観察されたことから、**1** および **2** のメラニン生成抑制作用の作用機序として MITF の発現抑制作用が示唆された。また、**1** および **2** の細胞生存率の低下には MITF の発現抑制の関与が推察された。

また、ヒト皮膚線維芽細胞 HDF 細胞の増殖への影響について検討した結果、単離精製物 **1** は 1  $\mu\text{M}$  以下の濃度では増殖抑制作用を示さなかったことから、**1** の細胞増殖抑制作用には細胞選択性があることが示唆された。

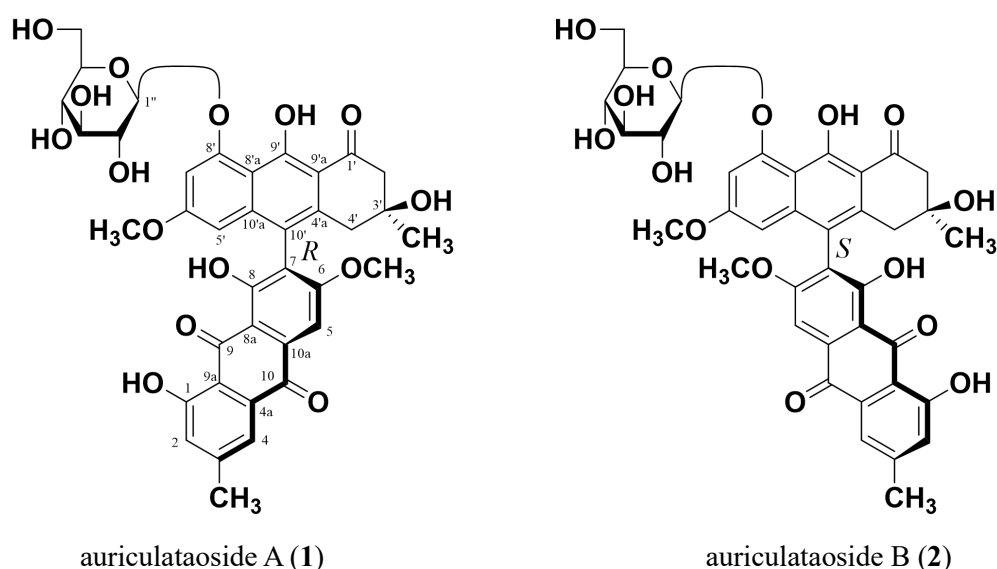
細胞増殖抑制作用の作用様式として、単離精製物 **1** は Cdc42, Rac1, RhoA および  $\beta$ -catenin/c-Myc の発現量を減少させ、また MITF の発現量を減少させることによって、B16 melanoma 4A5 細胞に対して細胞選択的な増殖抑制作用および G1 期から S 期への移行を阻害することが考えられた。

## 結論

マメ科植物 *Cassia auriculata* 種子について特にメラノーマ細胞に対して特異的な増殖抑制作用を示す物質を見出すことを目的として、MITF に着目し、細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用を指標に成分の探索を行った。

結果として、*Cassia auriculata* 種子から新規アントラセノン二量体 auriculataoside A (1) および B (2) を単離し、絶対立体配置を含めて、それらの化学構造決定を行った。

単離精製物 1 と 2 は、お互いにアトロプ異性体であり、1 の絶対配置は *R*、2 の絶対立体配置は *S* であると決定した。さらに、3'位における立体構造に関しては、*S* であると推定した。



次に、メラノーマ細胞に対する増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用について検討を行った。

その結果、*C. auriculata* 種子の MeOH 溶出部に細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が認められた。MeOH 溶出部に細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用が認められたことから、単離精製物 1 および 2 の細胞増殖抑制作用およびメラニン生成抑制作用について検討した。1 および 2 に 1  $\mu\text{M}$  で B16 melanoma 4A5 細胞における増殖抑制作用 (抑制率: 73.0%および 71.0%, Table 6) および 0.3  $\mu\text{M}$  でメラニン生成抑制作用 (抑制率: 45.1%および 36.5%, Table 6) を見出し、細胞増殖抑制作用が濃度および時間依存的に増強することが認められた。また、細胞増殖抑制作用に関してはアントラセノン二量体 1 および 2 の差がほとんど認められなかったことから、立体配置の影響は少ないと考えられた。

一方、ヒト皮膚線維芽細胞 HDF 細胞の増殖への影響について検討し、HDF 細胞において単離精製物 **1** は 1  $\mu$ M 以下の濃度では増殖抑制作用を示さなかったことから、**1** の細胞増殖抑制作用には細胞選択性があることが示唆された。

単離精製物 **1** の B16 melanoma 4A5 細胞に対する細胞増殖抑制作用の作用様式としては、Cdc42, Rac1 および RhoA の活性化を抑制することにより、 $\beta$ -catenin の核内への移行を阻害し、また、その下流にある転写因子として c-Myc および MITF の転写を抑制することにより、G1 期から S 期への移行を阻害することが考えられた。

細胞周期に関わるタンパク質 CDK2 は多くの細胞種において発現するが、結腸癌細胞や他のいくつかの癌細胞における CDK2 の阻害は増殖にほとんど影響を及ぼさないと報告されている。一方、メラノーマ細胞における CDK2 は MITF によって特異的に制御されている。すなわち、**1** の B16 melanoma 4A5 細胞に対する細胞選択的な増殖抑制作用の理由の一つとして、MITF の発現抑制によって、CDK2 の発現が抑制されるためであると考えられた。

一方、Rho シグナル伝達経路は成長因子に制御されている。成長因子受容体を抑制することにより、Rho シグナル伝達経路が阻害され、細胞周期 G1 期から S 期への移行を阻害することが報告されている<sup>96,97</sup>。単離精製物 **1** は成長因子受容体を抑制することにより、Rho シグナル伝達経路を阻害し、B16 melanoma 4A5 細胞の増殖を抑制する可能性があるが、詳細は不明である。

本研究において、メラノーマ細胞増殖に対する選択的な抑制作用および MITF の発現抑制作用を持つ物質としてアントラセノン二量体 **1** および **2** を見出すことができた。今回見出された化合物が、今後、新しい標的を持つ治療薬の開発に寄与することが期待される。

## 実験の部

### 第一章の実験

#### 使用機器, 物品および試薬

旋光度は, Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter ( $l = 0.5$ ) (株式会社 堀場製作所, Kyoto, Japan) を用いて測定した.

高分解能質量分析 (High resolution FAB-MS) および質量分析 (FAB-MS) は, JEOL JMS-SX102 および JMS-GCMATE 型質量分析装置 (日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

赤外吸収スペクトル (IR) は, Shimadzu FT-IR DR-8000 spectrometer (株式会社 島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて測定した.

紫外吸収スペクトル (UV) は, Shimadzu UV-visible spectrophotometer UV-1600 (株式会社 島津製作所) を用いて測定した.

CD スペクトルは, 日本分光円二色性分散計 JASCO J-1500 spectrometer (日本分光株式会社, Tokyo, Japan) を用いて測定した.

水素核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H-NMR}$ ) および炭素 13 核磁気共鳴スペクトル ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) は, JEOL EX-270 (270 MHz), JNM-LA500 (500 MHz) および JNM-ECA 600K (600 MHz) (日本電子株式会社, Tokyo, Japan) を用いて測定し, tetramethylsilane (TMS) を内部標準として用いた.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) については, ポンプは Shimadzu LC-6AD を, 示差屈折計検出器は, Shimadzu RID-10A を, 紫外可視分光光度計検出器は, Shimadzu SPD-10A (株式会社 島津製作所) を用いた.

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は, 順相系はシリカゲル Silica Gel 60 N (関東化学, Tokyo, Japan), 逆相系はクロマトレックス ODS DM 1020 T (富士シリシア, Kasugai, Japan) を用いた.

薄層クロマトグラフィー (Thin layer chromatography, TLC) には, Silica gel 60 F<sub>254</sub> (順相), RP-18 60 F<sub>254</sub> (順相), Silica gel 60 F<sub>254</sub> HPTLC (順相), RP-18 WF<sub>254</sub> HPTLC (逆相) (Merck KGaA, Darmstadt, HE, Germany) を使用し, スポットの検出は, UV (254 nm) および 1% Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液, 加熱時の呈色により行った.

酸加水分解については, 旋光度検出器 [Shodex OR-2 (Showa Denko Co., Ltd., Tokyo, Japan)] および HPLC [HPLC column, Kaseisorb LC NH<sub>2</sub>-60-5, 4.6 mm i.d. × 250 mm (Tokyo Kasei Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて解析した.

試薬は特に表記しないものは, 富士フイルム和光純薬社製試薬 (特級) (Osaka, Japan) を使用した.

## 第一節の実験

### *C. auriculata* 種子含有成分の抽出・単離

*C. auriculata* 種子 (3,929 g) を MeOH で熱時抽出 (80 °C, 3 h) 後, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を計 3 回行った. MeOH 抽出液を合わせ, 減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (430.6 g, 植物から収率 10.96%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキス (399.0 g) を *n*-hexane と H<sub>2</sub>O で分配抽出し *n*-hexane 移行部 (46.4 g, 1.27%) および H<sub>2</sub>O 移行部 (350.8 g, 9.63 %) を得た. 得られた H<sub>2</sub>O 移行部 (322.7 g) について, Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (H<sub>2</sub>O → MeOH) に付し, 各溶出部を減圧下で溶媒を留去することにより, MeOH 溶出部 (63.2 g, 1.89 %) および H<sub>2</sub>O 溶出部 (248.2 g, 7.41 %) を得た. 得られた MeOH 溶出部 (60.0 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [1.5 kg, CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>:MeOH (20:1, v/v) → CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:3:1 → 7:3:1 → 6:4:1, v/v/v) → MeOH] で分画することにより, Fr. 1 (0.2 g), Fr. 2 (3.0 g), Fr. 3 (2.7 g), Fr. 4 (0.6 g), Fr. 5 (10.4 g), Fr. 6 (5.7 g), Fr. 7 (16.7 g), Fr. 8 (16.3 g), Fr. 9 (0.9 g) を得た.

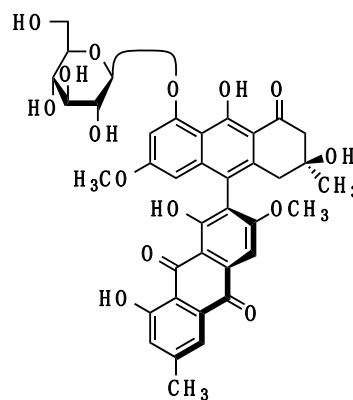
Fr. 5 (10.4 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー [300 g, MeOH:H<sub>2</sub>O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20, v/v) → MeOH] にて分画し, [Fr. 5-1-5-4, Fr. 5-5 (1991 mg), Fr. 5-6 (588 mg), Fr. 5-7, Fr. 5-8 (609 mg), Fr. 5-9 (269 mg), Fr. 5-10 (820 mg), Fr. 5-11-5-13] を得た. Fr. 5-5 (1,991 mg) を HPLC [MeOH:H<sub>2</sub>O (45:55 and 40:60, v/v) または CH<sub>3</sub>CN:MeOH:H<sub>2</sub>O (19:8:73, v/v/v)] を用いて分離精製し, rumejaposide E (**3**, 6.6 mg, 0.00021%) および rumejaposide F (**4**, 6.1 mg, 0.00019%) を単離した. さらに, Fr. 5-6 (588 mg) を HPLC [MeOH:H<sub>2</sub>O (45:55, v/v)] を用いて分離精製し, rumejaposide E (**3**, 17.7 mg, 0.00056%) および rumejaposide F (**4**, 18.1 mg, 0.00057%) を単離した. Fr. 5-8 (609 mg) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>:MeOH: (20:1, v/v) → CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:3:1, v/v/v)] および HPLC [MeOH:H<sub>2</sub>O (68:32, v/v)] を用いて分離精製し, auriculataoside A (**1**, 240.4 mg, 0.0076%) を得た. また, Fr. 5-9 (269 mg) を HPLC [MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v)] を用いて分離精製し, auriculataoside A (**1**, 25.6 mg, 0.00081%) および auriculataoside B (**2**, 57.9 mg, 0.0018%) を単離した. さらに, Fr. 5-10 (400 mg) を HPLC [MeOH:H<sub>2</sub>O (75:25, v/v)] を用いて分離精製し, auriculataoside B (**2**, 142.0 mg, 0.0092%) を単離した.



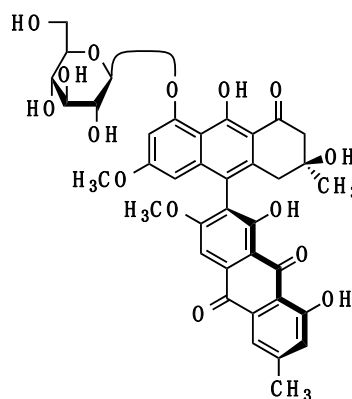
## 第二節の実験

### *C. auriculata* 種子含有新規成分の構造解析

Auriculataoside A (**1**): Red powder;  $[\alpha]_D^{24}$   $-129.5$  ( $c = 0.20$ , 1,4-dioxane); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 225 (4.58), 273 (4.71), 399 (4.09), 433 (4.02) nm; CD (MeOH) nm ( $\Delta\epsilon$ ) 217 (+49.0), 234 (-17.2), 242 (-6.7), 270 (-38.0), 284 (+25.5); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3,450, 2,948, 1,655, 1,070  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) 1.15, 2.24 (3H each, both s,  $\text{CH}_3$ -3'), 2.61 (2H, br s,  $\text{H}_2$ -4'), 2.74, 2.88 (1H each, both d,  $J = 16.8$  Hz,  $\text{H}_2$ -2'), 3.21 (1H, m,  $\text{H}$ -4''), 3.35 (1H, m,  $\text{H}$ -3''), 3.43 (1H, m,  $\text{H}$ -5''), 3.47 (1H, m,  $\text{H}$ -2''), 3.48 (1H, m,  $\text{H}$ -6''a), 3.65, 3.89 (3H each, both s,  $\text{OCH}_3$ -6', 6), 3.74 (1H, dd,  $J = 11.2, 5.5$  Hz,  $\text{H}$ -6''b), 4.79 (1H, br s,  $\text{OH}$ -3'), 5.04 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{H}$ -1''), 6.20, 6.88 (1H each, both d,  $J = 2.1$  Hz,  $\text{H}$ -5', 7'), 7.22, 7.59 (1H each, both br s,  $\text{H}$ -2, 4), 7.55 (1H, s,  $\text{H}$ -5), 11.88 (1H, br s,  $\text{OH}$ -1), 12.19 (1H, br s,  $\text{OH}$ -8), 19.20 (1H, br s,  $\text{OH}$ -9');  $^{13}\text{C-NMR}$  data, see Table 2; positive-ion FAB-MS  $m/z$  755  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRFAB-MS:  $m/z$  755.1958 (calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 755.1952).



Auriculataoside B (**2**): Red powder;  $[\alpha]_D^{24}$   $-41.3$  ( $c = 0.28$ , 1,4-dioxane); UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) 225 (4.62), 273 (4.74), 399 (3.72), 433 (4.05) nm; CD (MeOH) nm ( $\Delta\epsilon$ ) 217 (-42.8), 233 (+20.5), 268 (+23.8), 282 (-33.9); IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3,450, 2,948, 1,655, 1,070  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz) 1.18, 2.24 (3H each, both s,  $\text{CH}_3$ -3'), 2.57, 2.75 (1H each, both d,  $J = 16.2$  Hz,  $\text{H}_2$ -4'), 2.72, 2.90 (1H each, both d,  $J = 16.8$  Hz,  $\text{H}_2$ -2'), 3.22 (1H, m,  $\text{H}_2$ -4''), 3.35 (1H, m,  $\text{H}$ -3''), 3.44 (1H, m,  $\text{H}$ -5''), 3.47 (1H, m,  $\text{H}$ -2''), 3.50 (1H, m,  $\text{H}$ -6''a), 3.66, 3.85 (3H each, both s,  $\text{OCH}_3$ -6', 6), 3.75 (1H, dd,  $J = 11.6, 5.5$  Hz,  $\text{H}$ -6''b), 4.78 (1H, br s,  $\text{OH}$ -3'), 5.02 (1H, d,  $J = 7.7$  Hz,  $\text{H}$ -1''), 6.20, 6.89 (1H each, br s,  $\text{H}$ -5', 7'), 7.18, 7.53 (1H each, both br s,  $\text{H}$ -2, 4), 7.52 (1H, s,  $\text{H}$ -5); 11.90 (1H, br s,  $\text{OH}$ -1), 12.27 (1H, br s,  $\text{OH}$ -8), 19.20 (1H, br s,  $\text{OH}$ -9');  $^{13}\text{C-NMR}$  data see Table 2; positive-ion FAB-MS  $m/z$  755  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRFAB-MS:  $m/z$  755.1952 (calcd for  $\text{C}_{38}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 755.1952).



### Auriculataoside A (1) および auriculataoside B (2) の酸加水分解

1 および 2 (1 mg each) に 1.0 M HCl (1.0 mL) を加え、80 °C加熱還流下 3 時間攪拌した。反応液を氷水中にあけ陰イオン交換樹脂 Amberlite IRA-400 (OH<sup>-</sup> form) で中和し樹脂を濾別後、EtOAc で抽出を行い、水層分画を旋光度検出器 [Shodex OR-2] を接続した HPLC [HPLC column, Kaseisorb LC NH<sub>2</sub>-60-5, 4.6 mm i.d. × 250 mm; detection, optical mobile phase, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (85:15, v/v); flow rate 0.80 mL/min; column temperature, room temperature] を用いて市販 D-glucose との保持時間の比較を行った。標品の保持時間,  $t_R$ : 11.5 min (D-glucose, positive optical rotation).

## 第二章の実験

### 使用機器

細胞培養は MCO-18AIC CO<sub>2</sub> インキュベーター (パナソニック株式会社, Osaka, Japan) を使用し, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> で行った.

吸光度は, マイクロプレートリーダー (SH-1000, CORONA ELECTRIC, Hitachinaka, Japan) にて測定した.

遠心分離は, 遠心分離機 Allegra X-22R Centrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いた.

タンパク質抽出にの細胞破壊については, Ultrasonic Cell Disruptor MISONIX Microson XL 2000 (Misonix, inc. Farmingdale, NY, USA) を用いた.

タンパク質発現量の解析は, ルミノ・イメージアナライザー (LAS-4000 mini, FUJIFILM, Tokyo, Japan) および画像処理ソフトウェア Multi Gauge V3.0 (FUJIFILM) を用いて検出した.

細胞周期については, FACSCalibur フローサイトメーター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて, DNA 含有量 (20,000 cells/sample) の測定 (CellQuest, Becton Dickinson) を行った. 細胞周期の解析についてはソフトウェア ModFit LT V3.0 (Verity Software House, Topsham, ME, USA) を用いた.

### 使用試薬および物品

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 4,500 mg/L glucose および 1,000 mg/L glucose) 培地は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より, 牛胎児血清 (FBS), ペニシリンおよびストレプトマイシンは Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より, DMSO は Tokyo Kasei Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より, Chemi-lumi One および Blocking One はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) より, 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-*H*-tetrazolium bromide (MTT) は同仁化学研究所 (kamimashiki-gun, Japan) より, Soluene-350 は PerkinElmer (St. Waltham, MA, USA) より購入した.

6-, 24-, 96-ウェルマルチおよびマイクロプレートは Greiner Bio-One (Kremsmuenster, Austria) より, セルスクレーパーは Sarstedt, Inc. (Newton, NC, USA) より, Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction kit および Membrane Protein Extraction kit は 101 Bio, LLC. (Mountain View, CA, USA) より購入した.

試薬は特に表記しないものは, 富士フイルム和光純薬社製試薬 (特級) (Osaka, Japan) を使用した.

## 抗体

### 第一節

一次抗体 anti-tyrosinase (goat), anti-TRP-1 (rabbit) および anti-TRP-2 (rabbit) は, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) 製のもの, anti-MITF (rabbit) および anti- $\beta$ -actin (rabbit) は, Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) 製のもの, anti-CREB (phospho S133) (rabbit) は, Abcam (Cambridge, UK) 製のものをを用いた.

二次抗体 anti-rabbit immunoglobulin G antibody は, Cell Signaling Technology 製のもの, rabbit anti-goat は, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) 製のものをを用いた.

### 第二節

一次抗体 anti-Cdc42 (rabbit), anti-Rac1 (mouse), anti-RhoA (rabbit), anti- $\beta$ -catenin (rabbit), anti-c-Myc (rabbit) および anti-MITF (rabbit) は Abcam 製のものをを用いた. Anti- $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (rabbit), anti-histone H3 (rabbit) および anti- $\beta$ -actin (rabbit) は Cell Signaling Technology 製のものをを用いた.

二次抗体 anti-rabbit immunoglobulin G antibody は, Cell Signaling Technology 製のもの, goat anti-mouse IgG H&L (HRP) は Abcam 製のものをを用いた.

## 細胞培養

細胞培養は理化学研究所 (Tsukuba, Japan) より入手したマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557) を 10%牛胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS), 100 units/mL ペニシリン, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン含有 DMEM (4500 mg/L glucose) 培地で培養 (5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ ) した.

東洋紡ライフサイエンス (Tokyo, Japan) より購入したヒト皮膚線維芽細胞 (HDF cells) (Code No. CA10605n) を 10%牛胎児血清 (FBS), 100 units/mL ペニシリン, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ストレプトマイシン含有 DMEM (1000 mg/L glucose) 培地で培養 (5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^\circ\text{C}$ ) した.

## 統計処理

実験で得られた数値は平均値  $\pm$  標準誤差で表記し, 対照群との平均値の有意差の検定には Dunnett の方法 (Super ANOVA; Abacus Concepts, Inc., Piscataway, NJ, USA) を使用し,  $p$  値が 0.01 および 0.05 以下のものを有意とみなした.

## 第一節の実験

### CREB (phospho S133), MITF および TYR 発現量の解析<sup>98,99</sup>

6 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well) を播種し, 24 時間前培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, theophylline を添加した. 72 時間培養後, PBS で洗浄した後, lysis buffer 140 μL を添加し, セルスグレーパーにて剥離した後に, Ultrasonic Cell Disruptor を用いて氷冷しながら細胞を破壊し, タンパク質を抽出した.  $11,000 \times g$  で 10 分間遠心分離させ, bicinchoninic acid (BCA) 法により上清のタンパク量を定量し, 100 °C で 5 分間変性させた.

10% SDS-PAGE に抽出したタンパク質 20 μg/lane を注入し, 200 V, 0.02 A, 1 時間展開した. 次に, T-TBS で洗浄し, 転写装置により, メンブレン (Polyvinylidene fluoride, PVDF) に転写した. 転写したメンブレンを tween-Tris buffered saline (T-TBS) で洗浄し, 1 時間 Blocking One (ナカライテスク株式会社) を用いてブロッキングした後, 被験タンパク質に対する 1 次抗体の 5% Blocking One/T-TBS 希釈液 (0.2 μg/mL) を用いて 1 時間反応させた. 次に, T-TBS で洗浄し, 2 次抗体の 5% Blocking One/T-TBS 希釈液 (0.3 μg/mL) を用いて 1 時間反応させた. その後, T-TBS で洗浄し, 化学発光キット Chemi-lumi One により, ルミノ・イメージアナライザーおよび画像処理ソフトウェア Multi Gauge V3.0 を用いて検出した.

一次抗体 anti-CREB (phospho S133) (rabbit), anti-MITF (rabbit), anti-tyrosinase (goat) および anti-β-actin (rabbit) は 1,000 倍希釈した.

二次抗体 anti-rabbit immunoglobulin G antibody および rabbit anti-goat は 4,000 倍希釈した.

### マウスメラノーマ細胞における MTT アッセイ法による theophylline の細胞増殖への影響<sup>100</sup>

96 ウェルマイクロプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $5.0 \times 10^3$  cells/100 μL/well) を播種し, 24 時間前培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) した後, theophylline を添加した. 71 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, MTT (0.5%) を 10 μL ずつ添加した. 1 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 上清を除去し, phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した. 生成した MTT ホルマザンを 0.04 M HCl 含有 2-propanol で溶解した後に, 吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (測定波長: 570 nm, 参照波長: 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

相対増殖率は以下の式にて算出した.

$$\text{Relative growth (\%)} = 1 - [(A - B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B: 被験試料添加の吸光度]

## マウスメラノーマ細胞における MTT アッセイ法による細胞増殖抑制・細胞毒性の判定

96 ウェルマイクロプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $5.0 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L/well) を播種し, 24 時間前培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) した後, 被験物質および theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 71 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, MTT (0.5%) を 10  $\mu$ L ずつ添加した. 1 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 上清を除去し, phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した. 生成した MTT ホルマザンを 0.04 M HCl 含有 2-propanol で溶解した後に, 吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (測定波長: 570 nm, 参照波長: 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

相対増殖率は以下の式にて算出した.

$$\text{Relative growth (\%)} = 1 - [(A - B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B: 被験試料添加の吸光度]

## マウスメラノーマ細胞におけるメラニン生成抑制作用の判定<sup>54</sup>

24 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $2.0 \times 10^4$  cells/400  $\mu$ L/well) を播種し, 24 時間前培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) した後, 被験物質および theophylline (メラニン生成刺激剤; 終濃度 1 mM) を添加した. 72 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, トリプシン処理により細胞を剥離, 回収後, PBS で洗浄し, 1 M NaOH aq.にて溶解 (120  $\mu$ L/well, 80 °C, 15 min) した. 96 ウェルマイクロプレートに細胞溶解液を分取 (100  $\mu$ L/well) し, 生成したメラニンの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (測定波長: 405 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

抑制率は以下の式にて算出した.

$$\text{Inhibition (\%)} = \{[A - B / (C / 100)] / A\} \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B: 被験試料添加の吸光度, C: 被験試料添加の細胞生存率 (%)]

#### メラノーマ由来 TYR に対する酵素阻害試験 <sup>101-103</sup>

マウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞を 72 時間培養した後、トリプシン処理により細胞を剥離、回収後、PBS で洗浄した後、0.1% Triton X-100 リン酸緩衝溶液 (pH 6.5) 1 mL を添加し、Ultrasonic Cell Disruptor を用いて氷冷しながら細胞を破壊し、11,000 × g で 10 分間遠心分離させ、上清を粗酵素とした。上清の酵素反応により酵素量を定量した。96 ウェルマイクロプレートに 2.5 mM L-DOPA リン酸緩衝溶液 (pH 6.5) 80 μL/well を分注し、被験物質 (DMSO 溶液) 10 μL を添加した。次に、コントロール群の吸光度が 0.45~0.85 になるように粗酵素をリン酸緩衝液 (pH 6.5) で希釈した。希釈した粗酵素 10 μL/well を加えて 24 時間酵素反応 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) させ、マイクロプレートリーダーを用いて生成されたメラニンの吸光度を測定した (測定波長 : 405 nm)。

酵素活性阻害効果は以下の式にて算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

[A : 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験試料添加の吸光度]

#### 自動酸化抑制試験 <sup>104, 105</sup>

マッシュルーム由来 TYR のリン酸緩衝溶液 (150 unit/mL, pH 6.5) 125 μL を 25 °C で 10 分間インキュベートし、0.03% L-DOPA リン酸緩衝溶液 125 μL を添加し、10 分間インキュベートした。次に、被験物質 (DMSO 溶液) 125 μL を添加し、60 分間反応 (25 °C) させた。続いて 1 M HCl 溶液 50 μL を添加し、反応を止め、10,000 × g で 15 分間遠心分離した。沈渣をエタノールで洗浄した後、Solucene-350 1 mL に溶解 (60 °C) し、マイクロプレートリーダーを用いて生成したメラニンの吸光度を測定した (測定波長 : 405 nm)。

自動酸化抑制効果は以下の式にて算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A - B) / A] \times 100$$

[A : 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験試料添加の吸光度]

## TYR, TRP-1, TRP-2 および MITF 発現量の解析

6 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well) を播種し, 24 時間前培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 被験物質および theophylline (終濃度 1 mM) を添加した. 72 時間培養後, PBS で洗浄した後, lysis buffer 140 μL を添加し, セルスクレーパーにて剥離した後に, Ultrasonic Cell Disruptor を用いて氷冷しながら細胞を破壊し, タンパク質を抽出した.  $11,000 \times g$  で 10 分間遠心分離させ, bicinchoninic acid (BCA) 法により上清のタンパク量を定量し, 100 °C で 5 分間変性させた.

検出は前述と同様の方法で行った.

一次抗体 anti-tyrosinase (goat), anti-TRP-1 (rabbit), anti-TRP-2 (rabbit), anti-MITF (rabbit) および anti-β-actin (rabbit) は 1,000 倍希釈した.

二次抗体 anti-rabbit immunoglobulin G antibody および rabbit anti-goat は 4,000 倍希釈した.



## 第二節の実験

### B16 melanoma 4A5 細胞および HDF における MTT アッセイ法による細胞増殖抑制・細胞毒性の判定

96 ウェルマイクロプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞およびヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) ( $5.0 \times 10^3$  cells/100  $\mu$ L/well) を播種し, 24 時間前培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) した後, 被験物質を添加した. B16 melanoma 4A5 細胞は 23, 47, 71 時間, HDF 細胞は 71 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, MTT (0.5%) を 10  $\mu$ L ずつ添加した. 1 時間培養 (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 生成した MTT ホルマザンを 0.04 M HCl 含有 2-propanol で溶解した後に, 吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した (測定波長: 570 nm, 参照波長: 655 nm). なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地に添加した (DMSO 終濃度 0.1%).

相対増殖率は以下の式にて算出した.

$$\text{Relative growth (\%)} = 1 - [(A - B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B: 被験試料添加の吸光度]

### B16 melanoma 4A5 細胞の発現量変化タンパク質の解析<sup>106</sup>

6 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well) を播種し, 24 時間前培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 被験物質を添加した. 24, 48 時間培養後, PBS で洗浄した後, lysis buffer 140  $\mu$ L を添加し, セルスクレーパーにて剥離した後に, Ultrasonic Cell Disruptor を用いて氷冷しながら細胞を破碎し, タンパク質を抽出した.  $11,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し, BCA 法により上清のタンパク量を定量し, 100 °C で 5 分間変性させた.

銀染色 MS kit (code No. 299-58901) を用いて染色した.

銀染色試薬の調製方法:

Enhancing Stock Solution (増感原液), Staining Stock Solution (染色原液), Developing Stock Solution (現像原液), Developing Powder (現像粉末), Stopper (停止液).

固定液 1: メタノール 50 mL, 酢酸 5 mL, 脱イオン水 45 mL を混和して調製した.

固定液 2: メタノール 50 mL, 脱イオン水 50 mL を混和して調製した.

増感液: 増感原液 10 mL を脱イオン水 90 mL で希釈して調製した.

染色液: 染色原液 10 mL を脱イオン水 90 mL で希釈して調製した.

現像液: 現像粉末 1 g を脱イオン水 95 mL に溶解し, 現像原液 5 mL を加えて調製した.

10% SDS-PAGE に抽出したタンパク質 20  $\mu\text{g}/\text{lane}$  を注入し, 200 V, 0.02 A, 1 時間展開した. 電気泳動後にゲルを T-TBS で洗浄し, 100 mL の固定液 1 に浸して, 20 分間振とうした. 次に, ゲルを 100 mL の固定液 2 に浸し, 10 分間振とうした後, ゲルを 100 mL の脱イオン水で 10 分間洗浄した. その後, ゲルを 100 mL の増感液に浸し, 1 分間振とうした後, ゲルを 100 mL の脱イオン水で 1 分間の振とう洗浄を 2 回繰り返した. 続いて, ゲルを 100 mL の染色液に浸し, 20 分間振とうした. 染色したゲルを 100 mL の脱イオン水での 1 分間の振とう洗浄を 2 回繰り返した後, ゲルを 100 mL の現像液中に浸した. 適当な染色像が得られたら, 10 mL の停止液を加え, 約 1 分間振とうした後, ゲルを 100 mL の脱イオン水での 1 分間の振とう洗浄を 3 回繰り返した.

#### ゲル内タンパク質消化

被験物質処理群のレーンで消失したバンドに対応する 0.1% DMSO のレーンのタンパク質バンドを切り出し, 150  $\mu\text{L}$  のアセトニトリル/25 mM 重炭酸アンモニウム (1:1, pH 7.8) で 4~5 回 (ゲルが透明になるまで) 洗浄した. 次にゲルを Speedvac コンセントレーターで乾燥し, 30  $\mu\text{L}$  の 25 mM 重炭酸アンモニウム (20 ng トリプシン含有, pH7.8; Promega, Madison, WI, USA) 中で再水和した. 20 時間 37  $^{\circ}\text{C}$  でインキュベートした後, 液体を新しいチューブに移した. ゲルマトリックス中に残っているトリプシン処理ペプチドを, 20  $\mu\text{L}$  の 50% (v/v) アセトニトリル水溶液 [0.1% (v/v) 蟻酸含有] を用いて 30  $^{\circ}\text{C}$  で 40 分間抽出した.

#### LC-MS/MS によるタンパク質の同定

得られたトリプシン処理ペプチドを分離し, 逆相キャピラリー HPLC および Finnigan LCQ イオントラップ質量分析計 [液体クロマトグラフィー (LC)-MS/MS] (Genomine Inc., Providence, RI, USA) によって分析した. 0.1  $\times$  20 mm トラッピングおよび Vydac 218 MS low trifluoroacetic C18 beads (5  $\mu\text{m}$  in size, 300  $\text{\AA}$  in pore size; Vydac, Hesperia, CA, USA), を充填した 0.075  $\times$  130 mm resolving column をインライン配置した. その後, ペプチドを 5% (v/v) アセトニトリル水溶液 [0.1% (v/v) 蟻酸含有] で 10 分間トラッピングカラムを通過させた. 次に, 通過したペプチドを 5~80% (v/v) アセトニトリル水溶液 [0.1% (v/v) 蟻酸含有] を用いて溶出した (50 min, flow rate: 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). タンデム質量分析については, 全質量走査範囲モードは,  $m/z = 450-2,000$  Da. ズームスキャンでイオンの荷電状態を決定した後, MS/MS (55% relative collision energy) でプロダクトイオンスペクトルを得た.

各 MS/MS スペクトルは, TurboSEQUENT ソフトウェア (Thermo Quest, San Jose, CA, USA) を用いて処理した. 生成されたピークリストファイルは, MASCOT プログラム (<http://www.matrixscience.com>) を用いて MSDB データベースまたは NCBI データを用いて検索・推定した. メチオニンおよびシステインの修飾については, ペプチド質量許容度 2 Da, MS/MS イオン質量許容度 0.8 Da, 切断失敗許容度 2, および荷電状態 (+1, +2 and +3) を考慮した. MASCOT 確率分析によって判定された有意なヒットのみを優先的に考慮した.

## Cdc42, Rac1, RhoA, $\beta$ -catenin, c-Myc および MITF 発現量の解析

6 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well) を播種し, 24 時間前培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 被験物質を添加した. 72 時間培養後, PBS で洗浄した後, Cdc42, Rac1 および RhoA は Membrane Protein Extraction kit,  $\beta$ -catenin, c-Myc および MITF は Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction kit を用いて抽出した. BCA 法によりタンパク量を定量し, 100 °C で 5 分間変性させた.

一次抗体 anti-Cdc42 (rabbit), anti-Rac1 (mouse), anti-RhoA (rabbit), および anti- $\beta$ -catenin (rabbit) は 5,000 倍希釈, anti-MITF (rabbit) および anti-c-Myc (rabbit) は 1,000 倍希釈した; Anti-Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (rabbit), anti-histone H3 (rabbit) および anti- $\beta$ -actin (rabbit) は 1,000 倍希釈した.

検出は第二章 第一節の実験と同様の方法で行った.

二次抗体 anti-rabbit immunoglobulin G antibody および goat anti-mouse IgG H&L (HRP) は 5,000 倍希釈した.

## 細胞周期測定<sup>107</sup>

6 ウェルマルチプレートにマウスメラノーマ由来 B16 melanoma 4A5 細胞 ( $1.0 \times 10^5$  cells/2 mL/well) を播種し, 24 時間前培養した (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) 後, 被験物質を添加し, 24 時間培養した. その後, 遠心操作にて細胞を回収した後, PBS で洗浄し, 70%エタノールで 4 °C, 16 時間固定し, 細胞懸濁液を 1,500 rpm で 5 分間遠心分離した. 回収した細胞を PBS で洗浄し, 500  $\mu$ L の DNase-free RNase (0.25 mg/mL) を含む PBS に再懸濁した. 37 °C で 30 分間暗所でインキュベートした後, propidium iodide (終濃度 50  $\mu$ g/mL) を加え, 1 時間遮光染色した. 染色終了後, FACSCalibur フローサイトメーターを用いて, DNA 含有量 (20,000 cells/sample) の測定 (CellQuest) を行った. 細胞周期の解析についてはソフトウェア ModFit LT V3.0 を用いて解析した.

## 引用文献

1. Goding, C. R. Melanocytes: the new Black. *Internat J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 275–279.
2. Sulaimon, S. S.; Kitchell, B. E. The biology of melanocytes. *Vet. Dermat.* **2003**, *14*, 57–65.
3. Raposo, G.; Marks, M. S. Melanosomes-dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 786–797.
4. Friedmann, P. S.; Gilchrest, B. A. Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell Physiol.* **1987**, *133*, 88–94.
5. Hunt, G.; Todd, C.; Cresswell, J. E.; Thody, A. J.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7  $\alpha$ -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 205–211.
6. Buscá, R.; Ballotti, R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res.* **2000**, *13*, 60–69.
7. Steinberg, M. L.; Whittaker, J. R. Stimulation of melatonin expression in a melanoma cell line by theophylline. *J. Cell Physiol.* **1976**, *87*, 265–275.
8. Puiu, M.; Babaligea, I.; Olmazu, C.; Răucan, A.; Oancea, D. Peroxidase-mediated oxidation of L-dopa: A kinetic approach. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *52*, 248–254.
9. Ito, S.; Wakamatsu, K. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84*, 582–592.
10. Jimbow, M.; Kanoh, H.; Jimbow, K. Characterization of biochemical properties of melanosomes for structural and functional differentiation: Analysis of the compositions of lipids and proteins in melanosomes and their subfractions. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *72*, 97–102.
11. Sealy, R. C.; Felix, C. C.; Hyde, J. S.; Swartz, H. M. Structure and reactivity of melanins: Influence of free radicals and metal ions. *Free Radic. Biol.* **1980**, *4*, 209–259.
12. Debing, I.; Ijzerman, A. P.; Vauquelin, G. Melanosome binding and oxidation-reduction properties of synthetic L-DOPA-melanin as in vitro tests for drug toxicity. *Mol. Pharmacol.* **1988**, *33*, 470–476.
13. Testorf, M.; Kronstrand, R.; Svensson, S. P. S.; Lundström, I.; Ahlner, J. Characterization of [<sup>3</sup>H] flunitrazepam binding to melanin. *Anal. Biochem.* **2001**, *298*, 259–264.
14. 人口動態統計年報 主要統計表 (最新データ) 死因順位. 厚生労働省.  
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suii09/deth8.html> (accessed Feb 8, 2019).
15. "Melanoma Treatment (PDQ®)-health professionals version". National Cancer Institute.  
<https://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq> (accessed Feb 8, 2019).
16. Abbasi, N. R.; Shaw, H. M.; Rigel, D. S.; Friedman, R. J.; McCarthy W. H.; Osman, I.; Kopf, A. W.; Polsky, D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA.* **2004**, *292*, 2771–2776.

17. 悪性黒色腫 基礎知識. 国立がん研究センター  
<https://ganjoho.jp/public/cancer/melanoma/index.html> (accessed Feb 8, 2019).
18. Jin, J.; Gong, J.; Yin, T.; Lu, Y.; Xia, J.; Xie, Y.; Di, Y.; He, L.; Guo J.; Sun, J.; Noteborn MHM, Qu S. PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *654*, 17–25.
19. Kaufman, H. L.; Kirkwood, J. M.; Hodi, F. S.; Agarwala, S.; Amatruda, T.; Bines, S. D.; Clark, J. I.; Curti, B.; Ernstoff, M. S.; Gajewski, T.; Gonzalez, R.; Hyde, L. J.; Lawson, D.; Lotze, M.; Lutzky, J.; Margolin, K.; McDermott, D. F.; Morton, D.; Pavlick, A.; Richards, J. M.; Sharfman, W.; Sondak, V. K.; Sosman, J.; Steel, S.; Tarhini, A.; Thompson, J. A.; Titze, J.; Urba, W.; White, R.; Atkins, M. B. The society for immunotherapy of cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 588–598.
20. Wolchok, J. D.; Kluger, H.; Callahan, M. K.; Postow, M. A.; Rizvi, N. A.; Lesokhin, A. M.; Segal, N. H.; Ariyan, C. E.; Gordon, Ruth-A.; Reed, K.; Burke, M. M.; Caldwell, A.; Kronenberg, S. A.; Agunwamba, B. U.; Zhang, X.; Lowy, I.; Inzunza, H. D.; Feely, W.; Horak, C. E.; Hong, Q.; Korman, A.; Wigginton, J. M.; Gupta, A.; Sznol, M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *369*, 122–133.
21. Topalian, S. L.; Sznol, M.; McDermott, D. F.; Kluger, H. M.; Carvajal, R. D.; Sharfman, W. H.; Brahmer, J. R.; Lawrence, D. P.; Atkins, M. B.; Powderly, J. D.; Leming, P. D.; Lipson, E. J.; Puzanov, I.; Smith, D. C.; Taube, J. M.; Wigginton, J. M.; Kollia, G. D.; Gupta, A.; Pardoll, D. M.; Sosman, J. A.; Hodi, F. S. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1020–1030.
22. Hodi, F. S.; O'day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A. J.M.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J. M.; Linette, G. P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C. H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J. I.; Wolchok, J. D.; Weber, J. S.; Tian, J.; Yellin, M. J.; Nichol, G. M.; Hoos, A.; Urba, W. J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723.
23. Harlin, H.; Meng, Y.; Peterson, A. C.; Zha, Y.; Tretiakova, M.; Slingluff, C.; McKee, M.; Gajewski, T. F. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 3077–3085.
24. Ji, R. R.; Chasalow, S. D.; Wang, L.; Hamid, O.; Schmidt, H.; Cogswell, J.; Alaparthi, S.; Berman, D.; Jure-Kunkel, M.; Siemers, N. O.; Jackson, J. R.; Shahabi, V. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol. Immunother.* **2012**, *61*, 1019–1031.
25. Spranger, S.; Bao, R.; Gajewski, T. F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **2015**, *523*, 231–235.

26. Lacouture, M. E.; Duvic, M.; Hauschild, A.; Prieto, V. G.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Kim, C. C.; McCormack, C. J.; Myskowski, P. L.; Spleiss, O.; Trunzer, K.; Su, F.; Nelson, B.; Nolop, K. B.; Grippo, J. F.; Lee, R. J.; Klimek, M. J.; Troy, J. L.; Joe, A. K. Analysis of dermatologic events in vemurafenib-treated patients with melanoma. *The oncologist* **2013**, *18*, 314–322.
27. Strub, T.; Giuliano, S.; Ye, T.; Bonet, C.; Keime, C.; Kobi, D.; Gras, S. L.; Cormont, M.; Ballotti, R.; Bertolotto, C.; Davidson, I. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene* **2011**, *30*, 2319–2332.
28. Garraway, L. A.; Widlund, H. R.; Rubin, M. A.; Getz, G.; Berger, A. J.; Ramaswamy, S.; Beroukhi, R.; Milner, D. A.; Granter, S. R.; Du, J.; Lee, C.; Wagner, S. N.; Li, C.; Golub, T. R.; Rimm, D. L.; Meyerson, M. L.; Fisher, D. E.; Sellers, W. R. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **2005**, *436*, 117–122.
29. McGill, G. G.; Horstmann, M.; Widlund, H. R.; Du, J.; Motyckova, G.; Nishimura, E. K.; Lin, Y. L.; Ramaswamy, S.; Avery, W.; Ding, H. F.; Jordan, S. A.; Jackson, I. J.; Korsmeyer, S. J.; Golub, T. R.; Fisher, D. E. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* **2002**, *109*, 707–718.
30. Du, J.; Widlund, H. R.; Horstmann, M. A.; Ramaswamy, S.; Ross, K.; Huber, W. E.; Nishimura, E. K.; Golub, T. R.; Fisher, D. E. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **2004**, *6*, 565–576.
31. Levy, C.; Khaled, M.; Iliopoulos, D.; Janas, M. M.; Schubert, S.; Pinner, S.; Chen, P. H.; Li, S.; Fletcher, A. L.; Yokoyama, S.; Scott, K. L.; Garraway, L. A.; Song, J. S.; Granter, S. R.; Turley, S. J.; Fisher, D. E.; Novina, C. D. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 841–849.
32. Dror, S.; Sander, L.; Schwartz, H.; Sheinboim, D.; Barzilai, A.; Dishon, Y.; Apcher, S.; Golan, T.; Greenberger, S.; Barshack, I.; Malcov, H.; Zilberberg, A.; Levin, L.; Nessling, M.; Friedmann, Y.; Igras, V.; Barzilay, O.; Vaknine, H.; Brenner, R.; Zinger, A.; Schroeder, A.; Gonen, P.; Khaled, M.; Erez, N.; Hoheisel, J. D.; Levy, C. Melanoma miRNA trafficking controls tumour primary niche formation. *Nat. Cell Biol.* **2016**, *18*, 1006–1017.
33. Golan, T.; Messer, A. R.; Amitai-Lange, A.; Melamed, Z. E.; Ohana, R.; Bell, R. E.; OxanaKapitansky, O.; Lerman, G.; Greenberger, S.; Khaled, M.; Amar, N.; Albregues, J.; Gaggioli, C.; Gonen P.; Tabach, Y.; Sprinzak, D.; Shalom-Feuerstein, R.; Levy C. Interactions of melanoma cells with distal keratinocytes trigger metastasis via notch signaling inhibition of MITF. *Mol. cell* **2015**, *59*, 664–676.
34. Carreira, S.; Goodall, J.; Denat, L.; Rodriguez, M.; Nuciforo, P.; Hoek, K. S.; Testori, A.; Larue, L.; Goding, C. R. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 3426–3439.

35. Bhowmick, N. A.; Neilson, E. G.; Moses, H. L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **2004**, *432*, 332–337.
36. Erez, N.; Truitt, M.; Olson, P.; Arron, S. T.; Hanahan, D. Cancer-associated fibroblasts are activated in incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF- $\kappa$ B-dependent manner. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 135–147.
37. Quante, M.; Tu, S. P.; Tomita, H.; Gonda, T.; Wang, S. S.; Takashi, S.; Baik, G. H.; Shibata, W.; DiPrete, B.; Betz, K. S.; Friedman, R. Varro, A.; Tycko, B.; Wang, T. C. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer cell* **2011**, *19*, 257–272.
38. Sharon, Y.; Raz, Y.; Cohen, N.; Ben-Shmuel, A.; Schwartz, H.; Geiger, T.; Erez, N. Tumor-derived osteopontin reprograms normal mammary fibroblasts to promote inflammation and tumor growth in breast cancer. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 963–973.
39. Serini, G.; Gabbiani, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* **1999**, *250*, 273–283.
40. Orimo, A.; Gupta, P. B.; Sgroi, D. C.; Arenzana-Seisdedos, F.; Delaunay, T.; Naeem, R.; Carey, V. J.; Richardson, A. L.; Weinberg, R. A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **2005**, *121*, 335–348.
41. Tlsty, T. D.; Hein, P. W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *11*, 54–59.
42. Cornil, I.; Theodorescu, D.; Man, S.; Herlyn, M.; Jambrosic, J.; Kerbel, R. S. Fibroblast cell interactions with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *PNAS.* **1991**, *88*, 6028–6032.
43. Flach, E. H.; Rebecca, V. W.; Herlyn, M.; Smalley, K. S.; Anderson, A. R. Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2039–2049.
44. Ruiter, D.; Bogenrieder, T.; Elder, D.; Herlyn, M. Melanoma–stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol.* **2002**, *3*, 35–43.
45. Haass, N. K.; Smalley, K. S.; Li, L.; Herlyn, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* **2005**, *18*, 150–159.
46. Araya-Maturana, R.; Cardona, W.; Cassels, B. K.; Delgado-Castro, T.; Ferreira, J.; Miranda, D.; Pavani, M.; Pessoa-Mahana, H.; Soto-Delgado, J.; Weiss-López, B. Effects of 9,10-dihydroxy-4,4-dimethyl-5,8-dihydro-1(4H)-anthracenone derivatives on tumor cell respiration. *Bioorg. medicinal chem.* **2006**, *14*, 4664–4669.
47. Phifer, S. S.; Lee, D.; Seo, E. K.; Kim, N. Cheol.; Graf, T. N.; Kroll, D. J.; Navarro, H. A.; Izydore, R. A.; Jime'nez, F.; Garcia, R.; Rose, W. C.; Fairchild, C. R.; Wild, R.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Oberlies, N. H.; Wall, M. E.; Wani, M. C. Alvaradoins E-N,

- antitumor and cytotoxic anthracenone C-glycosides from the Leaves of *Alvaradoa haitiensis*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 954–961.
48. Pan, Q.; Pan, H.; Lou, H.; Xu, Y.; Tian, L. Inhibition of the angiogenesis and growth of Aloin in human colorectal cancer in vitro and in vivo. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 69–77.
49. Pecere, T.; Gazzola, M. V.; Mucignat, C.; Parolin, C.; Vecchia, F. D.; Cavaggioni, A.; Basso, G.; Diaspro, A.; Salvato, B.; Carli, M.; Palu, G. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2800–2804.
50. Kim, M. O.; Park, Y. S.; Nho, Y. H.; Yun, S. K.; Kim, Y.; Jung, E.; Paik, J. K.; Kim, M.; Cho, Il-H.; Lee, J. Emodin isolated from Polygoni Multiflori Ramulus inhibits melanogenesis through the liver X receptor-mediated pathway. *Chem.-Biol. Interact.* **2016**, *250*, 78–84.
51. Kumar Rajagopal, S.; Manickam, P.; Periyasamy, V.; Namasivayam, N. Activity of *Cassia auriculata* leaf extract in rats with alcoholic liver injury. *J. Nutr. Biochem.* **2003**, *14*, 452–458.
52. Nakamura, S.; Xu, F.; Ninomiya, K.; Nakashima, S.; Oda, Y.; Morikawa, T.; Muraoka, O.; Yoshikawa, M.; Matsuda, H. Chemical structures and hepatoprotective effects of constituents from *Cassia auriculata* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 1026–1031.
53. Jaydeokar, A. V., Bandawane D. D.; Bibave, K. H.; Patil, T. V. Hepatoprotective potential of *Cassia auriculata* roots on ethanol and antitubercular drug-induced hepatotoxicity in experimental models. *Pharm. Biol.* **2014**, *52*, 344–355.
54. Zhu, J. J.; Zhang, C. F.; Zhang, M.; Bligh, S.W.; Yang, L.; Wang, Z. M.; Wang, Z. T. Separation and identification of three epimeric pairs of new C-glucosyl anthrones from *Rumex dentatus* by on-line high performance liquid chromatography-circular dichroism analysis. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5384–5388.
55. Elsworth, C.; Gill, M.; Giménez, A.; Milanovic, N. M.; Raudies, E. Pigments of fungi. Part 50. Structure, biosynthesis and stereochemistry of new dimeric dihydroanthracenones of the phlegmacin type from *Cortinarius sinapicolor* Cleland. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1999**, *1*, 119–125.
56. Prelog, V.; Helmchen, G. Basic principles of the CIP-system and proposals for a revision. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 567–583.
57. Essayan, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *108*, 671–680.
58. Seamon, K. B.; Padgett, W.; Daly, J. W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *PNAS.* **1981**, *78*, 3363–3367.
59. Sorrell, J. M.; Caplan, A. I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 667–675.
60. ダカルバジン注用 100. 医薬品インタビューフォーム 2017 年 9 月改訂 (第 12 版).  
<http://image.packageinsert.jp/pdf.php?mode=1&yjcode=4219401D1031>  
(accessed Feb 8, 2019).



61. Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *JACS*. **1971**, *93*, 2325–2327.
62. Li, J.; Yang, K.; Ke, X.; Du, R.; Zhang, X.; Zhang, Q. In vitro and in vivo antitumor efficacy of CLA-PTX on B16-F10 melanoma cells. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2014**, *23*, 46–53.
63. Shenoy, V. S.; Gude, R. P.; Nikam, Y.; Murthy, R. S. R. In vitro cytotoxic potential of paclitaxel-encapsulated lipid-based drug delivery systems. *Austin. J. Lung Cancer Res.* **2017**, *2*, 1011–1016.
64. Mackay, D. J. G.; Hall, A. Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20685–20688.
65. Smit, M. A.; Maddalo, G.; Greig, K.; Raaijmakers, L. M.; Possik, P. A.; Van Breukelen, B.; Cappadona, S.; Heck, A. J.; Altelaar, A. F.; Peeper, D. S. ROCK1 is a potential combinatorial drug target for BRAF mutant melanoma. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *10*, 772–723.
66. Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. Ras and Rho GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355–366.
67. Jaffe, A. B.; Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 247–269.
68. Etienne-Manneville, S.; Hall, A.; Rho GTPases in cell biology. *Nature* **2002**, *420*, 629–635.
69. Vega, F. M.; Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS lett.* **2008**, *582*, 2093–2101.
70. Sadok, A.; McCarthy, A.; Caldwell, J.; Collins, I.; Garrett, M. D.; Yeo, M.; Hooper, S.; Sahai, E.; Kuemper, S.; Mardakheh, F. K.; Marshall, C. J. Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2272–2284.
71. Liu, M.; Bi, F.; Zhou, X.; Zheng, Y. Rho GTPase regulation by miRNAs and covalent modifications. *Trends Cell Biol.* **2012**, *22*, 365–373.
72. Aznar, S.; Lacal, J. C. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.* **2001**, *165*, 1–10.
73. Sahai, E.; Marshall, C. J. RHO–GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 133–142.
74. Wu, R. S.; Bonner, W. M. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell* **1981**, *27*, 321–330.
75. Nelson, D. M.; Ye, X.; Hall, C.; Santos, H.; Ma, T.; Kao, G. D.; Yen, T. J.; Harper, J. W.; Adams, P. D. Coupling of DNA synthesis and histone synthesis in S phase independent of cyclin/cdk2 activity. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 7459–7472.
76. De Souza, C. P.; Osmani, S. A. Mitosis, not just open or closed. *Eukaryot. cell* **2007**, *6*, 1521–1527.
77. Nigg, E. A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **1995**, *17*, 471–480.
78. Spellman, P. T.; Sherlock, G.; Zhang, M. Q.; Iyer, V. R.; Anders, K.; Eisen, M. B.; Brown, P. O.; Botstein, D.; Futcher, B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. cell*, **1998**, *9*, 3273–3297.

79. Dong, P.; Maddali, M. V.; Srimani, J. K.; Thélot, F.; Nevins, J. R.; Mathey-Prevot, B.; You, L. Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4750–4761.
80. Coleman, M. L.; Marshall, C. J.; Olson, M. F. RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 355–366.
81. Wang, C.; Wu, X.; Chen, M.; Duan, W.; Sun, L.; Yan, M.; Zhang, L. Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells. *Toxicology* **2007**, *231*, 120–128.
82. Chen, H. C.; Hsieh, W. T.; Chang, W. C.; Chung, J. G. Aloe-emodin induced in vitro G2/M arrest of cell cycle in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42*, 1251–1257.
83. Carreira, S.; Goodall, J.; Denat, L.; Rodriguez, M.; Nuciforo, P.; Hoek, K. S.; Testori, A.; Larue, L.; Goding, C. R. Mitf regulation of Dial controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 3426–3439.
84. Sahai, E.; Marshall, C. J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 711–719.
85. Tetsu, O.; McCormick, F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer cell*, 2003, *3*, 233–245.
86. Van De Wetering, M.; Sancho, E.; Verweij, C.; De Lau, W.; Oving, I.; Hurlstone, A.; Van der Horn, K.; Battle, E.; Coudreuse, D.; Haramis, Anna-P.; Tjon-Pon-Fong, M.; Moerer, P.; Van den Born, M.; Soete, G.; Pals, S.; Eilers, M.; Medema, R.; Clevers, H. The  $\beta$ -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **2002**, *111*, 241–250.
87. Samuel, M. S.; Lopez, J. I.; McGhee, E. J.; Croft, D. R.; Strachan, D.; Timpson, P.; Munro, J.; Schröder, E.; Zhou, J.; Brunton, V. G.; Barker, N.; Clevers, H.; Sansom, O. J.; Anderson, K. I.; Weaver, V. M.; Olson, M. F. Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and  $\beta$ -catenin activation to induce interfollicular epidermal hyperplasia and tumor growth. *Cancer Cell* **2011**, *19*, 776–791.
88. Habas, R.; Dawid, I. B. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?. *J. Biol.* 2005, *4*, 2–5.
89. Giles, R. H.; van Es, J. H.; Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, *1653*, 1–24.
90. Sinnberg, T.; Menzel, M.; Ewerth, D.; Sauer, B.; Schwarz, M.; Schaller, M.; Garbe, C.; Schitteck, B.  $\beta$ -Catenin signaling increases during melanoma progression and promotes tumor cell survival and chemoresistance. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23429.
91. Baldus, S. E.; Mönig, S. P.; Huxel, S.; Landsberg, S.; Hanisch, F. G.; Engelmann, K.; Schneider, P. M.; Thiele, J.; Hölscher, A. H.; Dienes, H. P. MUC1 and nuclear  $\beta$ -catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 2790–2796.

92. Larue, L.; Delmas, V. The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 733–742.
93. Hunter, T.; Pines, J. Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* **1994**, *79*, 573–582.
94. Mackay, D. J. G.; Hall, A. Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20685–20688.
95. Schlessinger, K.; Hall, A.; Tolwinski, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 265–277.
96. Boerner, J. L.; Danielsen, A.; McManus, M. J.; Maihle, N. J. Activation of Rho is required for ligand-independent oncogenic signaling by a mutant epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **2001**, *276*, 3691–3695.
97. Ramis, G.; Thomàs-Moyà, E.; de Mattos, S. F.; Rodríguez, J.; Villalonga, P. EGFR inhibition in glioma cells modulates Rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One* **2012**, *7*, e38770.
98. Matsuda, H.; Nakashima, S.; Oda, Y.; Nakamura, S.; Yoshikawa, M. Melanogenesis inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6048–6053.
99. Nakashima, S.; Matsuda, H.; Oda, Y.; Nakamura, S.; Xu, F.; Yoshikawa, M. Melanogenesis inhibitors from the desert plant *Anastatica hierochuntica* in B16 melanoma cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2337–2345.
100. Nakashima, S.; Oda, Y.; Nakamura, S.; Liu, J.; Onishi, K.; Kawabata, M.; Miki, H.; Himuro, Y.; Yoshikawa, M.; Matsuda, H. Inhibitors of melanogenesis in B16 melanoma 4A5 cells from flower buds of *Lawsonia inermis* (Henna). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2701–2706.
101. Kwon, B. S.; Haq, A. K.; Wakulchik, M.; Kestler, D.; Barton, D. E.; Francke, U.; Lamoreux, M. L.; Whitney, J. B. 3rd. Halaban, R. Isolation, chromosomal mapping, and expression of the mouse tyrosinase gene. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *93*, 589–594.
102. Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchettini, J. C.; Krebs, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 1084–1090.
103. Takara, K.; Iwasaki, H.; Ujihara, K.; Wada, K. Human tyrosinase inhibitor in rum distillate wastewater. *J. Oleo. Sci.* **2008**, *57*, 191–196.
104. Mason, H. S.; Peterson, E. W. Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1956**, *111*, 134–146.
105. Matsuda, H.; Higashino, M.; Nakai, Y.; Iinuma, M.; Kubo, M.; Lang, F. A. Studies of cuticle drugs from natural sources. IV. Inhibitory effects of some *Arctostaphylos* plants on melanin biosynthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 153–156.
106. Nakashima, S.; Oda, Y.; Kishimoto, M.; Uno, M.; Aoki, M.; Nakamura, S.; Tanaka, H.; Matsuda, H. Anti-invasive activity of *Lawsonia inermis* branch and its potential target protein. *Nat. Prod. Commun.* **2018**, *13*, 1337–1340.

107. Nakashima, S.; Matsuda, H.; Kurume, A.; Oda, Y.; Nakamura, S.; Yamashita, M.; Yoshikawa, M. Cucurbitacin E as a new inhibitor of cofilin phosphorylation in human leukemia U937 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2994–2997.

## 謝辞

本研究に際し、終始御指導、ご鞭撻を賜りました 京都薬科大学 生薬学分野 松田久司教授、並びに、中村誠宏准教授、中嶋聡一助教に衷心より深甚なる敬意を表します。

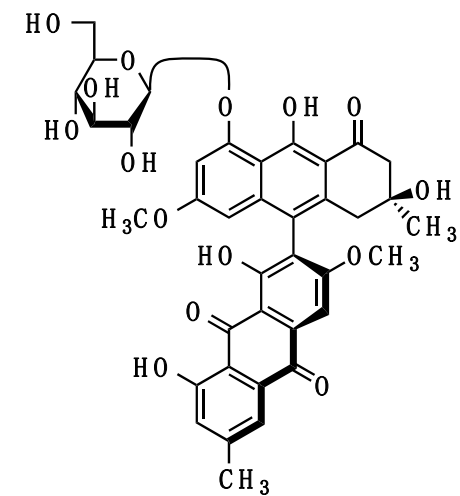
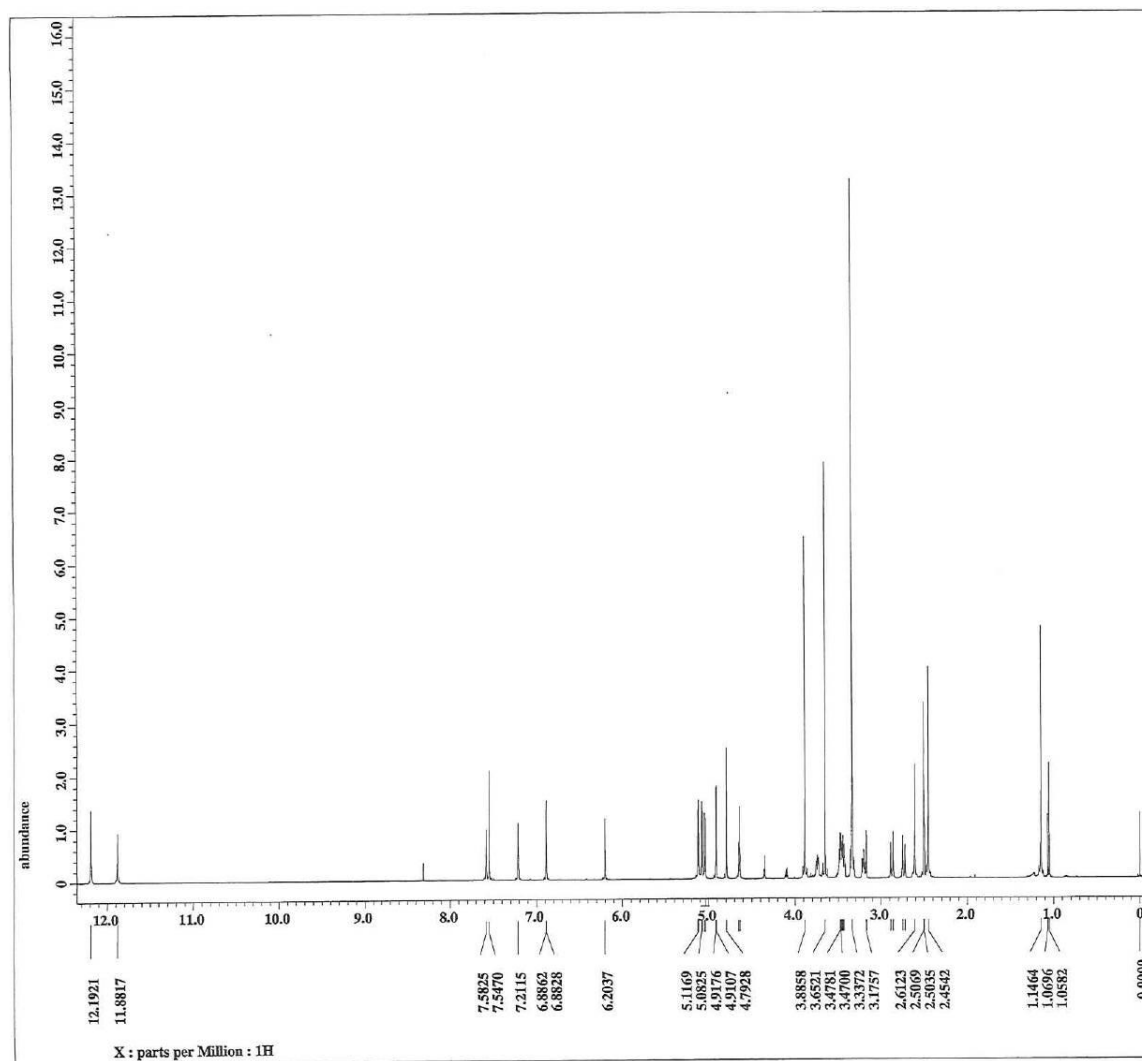
本論文の作成にあたり、貴重な御助言を戴くとともに細部にわたり御指導を戴いた病態生理学分野 芦原英司教授、並びに、生化学分野 中山祐治教授 に深謝申し上げます。

本研究に際し、大変お世話になりました 公衆衛生学分野 渡辺徹志教授、薬理学分野 藤井正徳准教授、公衆衛生学分野 松本崇宏助教に深謝致します。

本研究に際し、御協力下さいました 生薬学分野 小川慶子博士、同 尾田好美博士、同 呉剣波修士、同 矢野真実子学士、同 川本桃子学士、同 栗木菜津美氏、同 藤野加奈恵氏、同 有馬美貴氏、同 鈴木涼子氏、同 米山真穂氏、同 堀田有美氏、同 松尾有紗氏、同 安藤実紗氏、同 田中舞子氏、同 田中大輝氏、同 里崎久恵氏、同 山手直智氏、同 下岡美咲氏をはじめとする京都薬科大学生薬学分野博士、修士、学士の皆様に深く感謝致します。

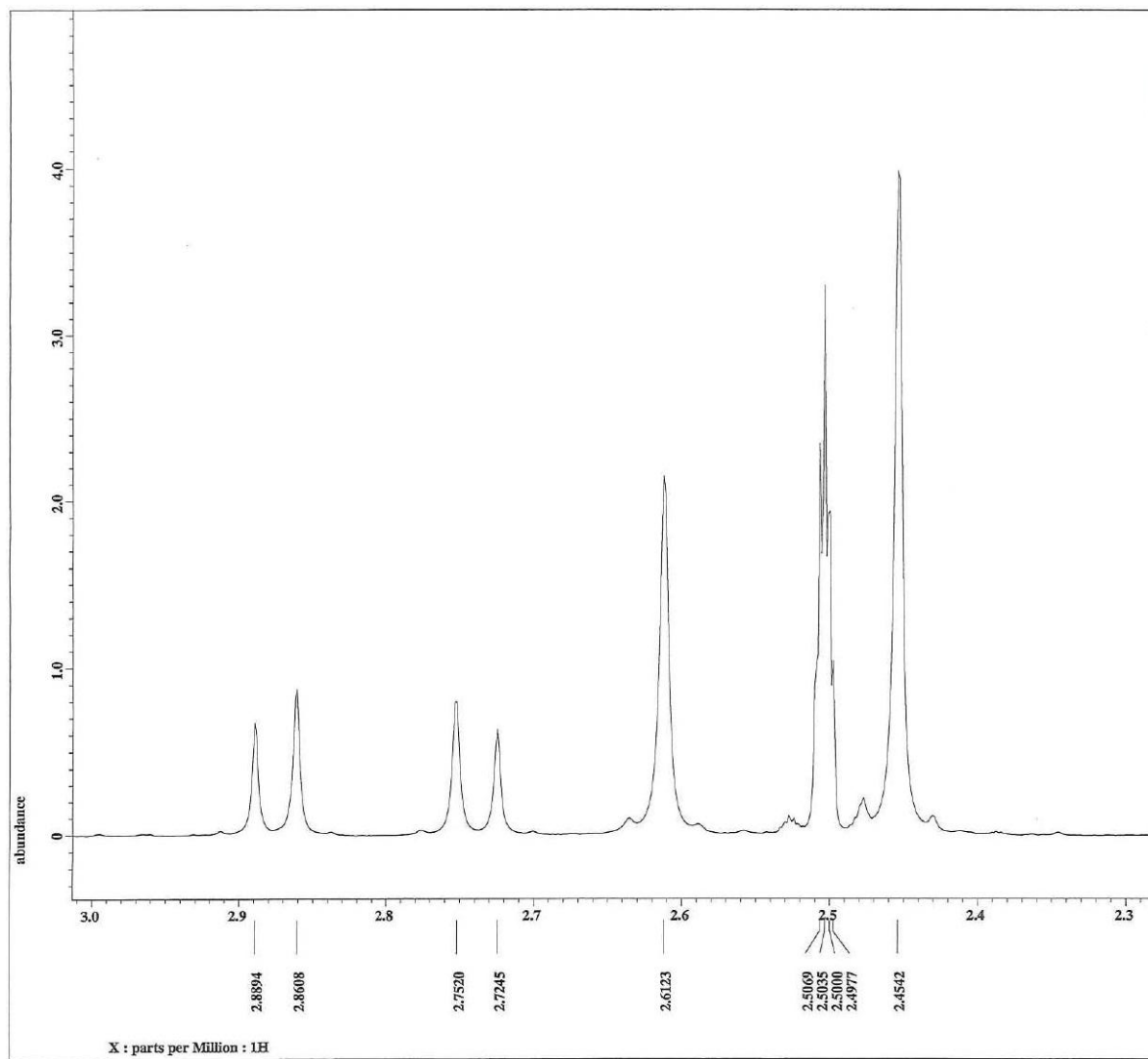
また、研究生生活を共にし、暖かい御支援を頂きました深谷匡学士、同 笠香織学士、同 米田太一学士、同 井上知紘氏、同 執行真莉奈氏、同 眞野みのり氏、同 森田萌子氏、同 澤田見宇氏、同 細田依里氏、同 森川葵氏、同 諸頭佑香氏、同 山下真由子氏をはじめとする京都薬科大学生薬学分野の学生諸氏に心より感謝致します。

最後に、本論文の作成にあたり、御協力下さいました 親友 趙南琪氏、同 李莎氏に心より感謝致します。

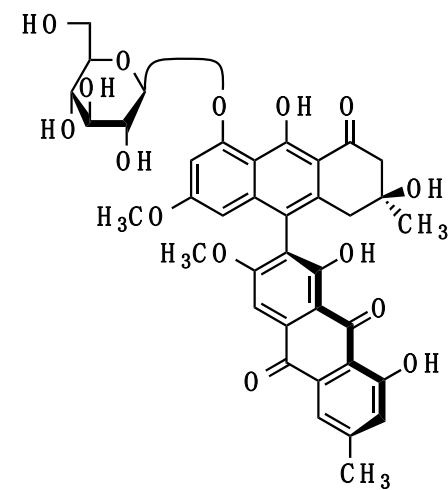
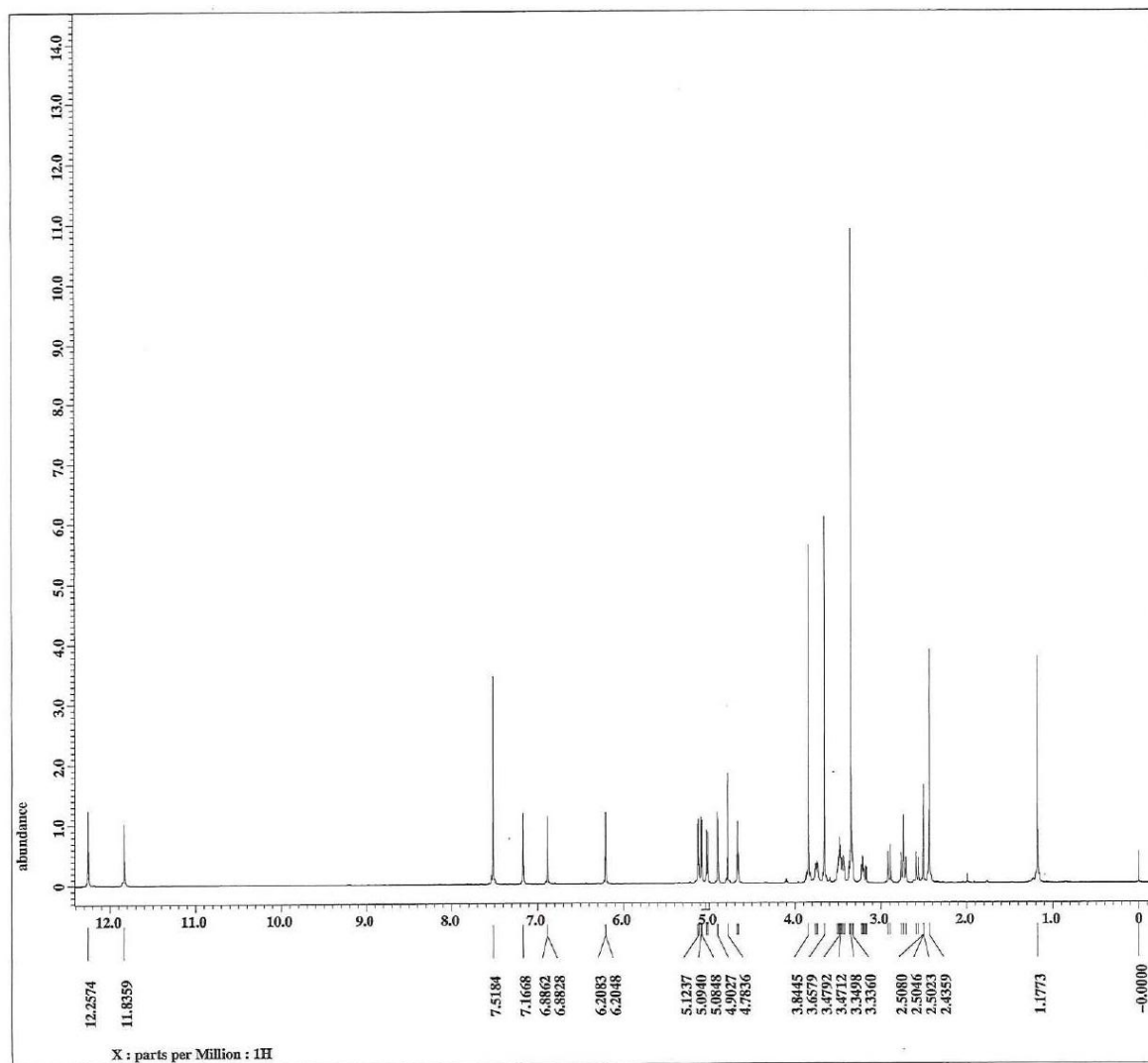


Auriculataoside A (1)

<sup>1</sup>H-NMR spectroscopic data for compound **1**. (1) Measured in DMSO.



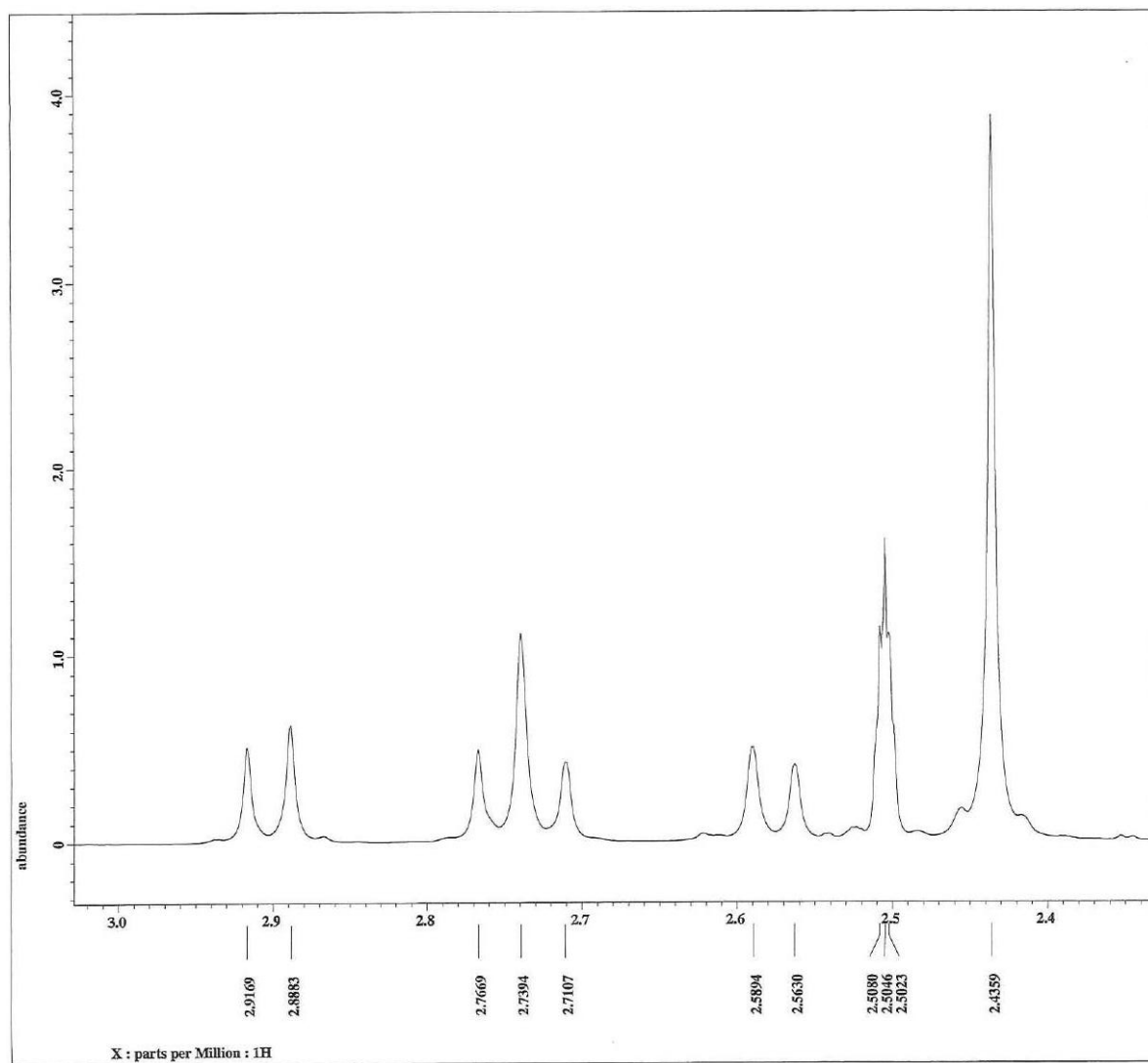
<sup>1</sup>H-NMR spectroscopic data for compound **1**. (2) Measured in DMSO.



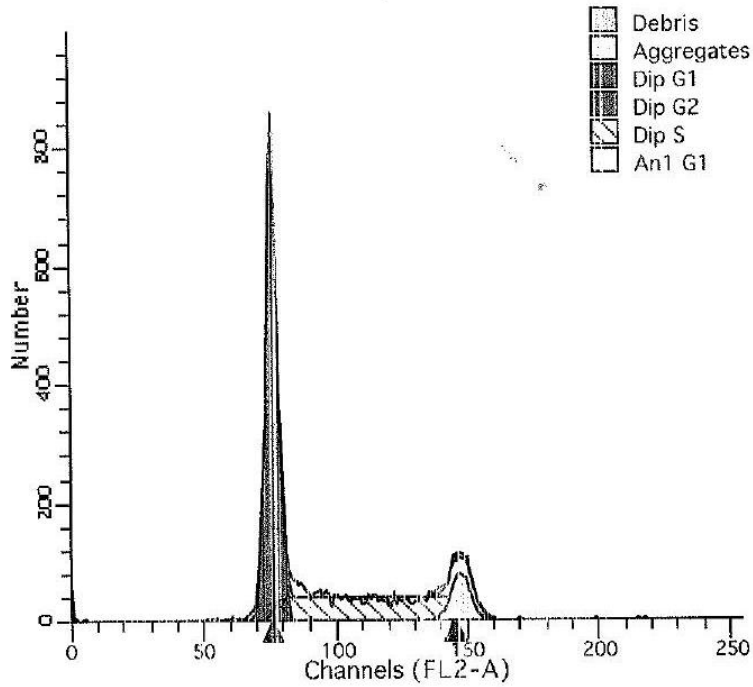
Auriculataoside B (2)

<sup>1</sup>H-NMR spectroscopic data for compound **2**. (1) Measured in DMSO.





<sup>1</sup>H-NMR spectroscopic data for compound **2**. (2) Measured in DMSO.



DMSO (0.1%), 24h

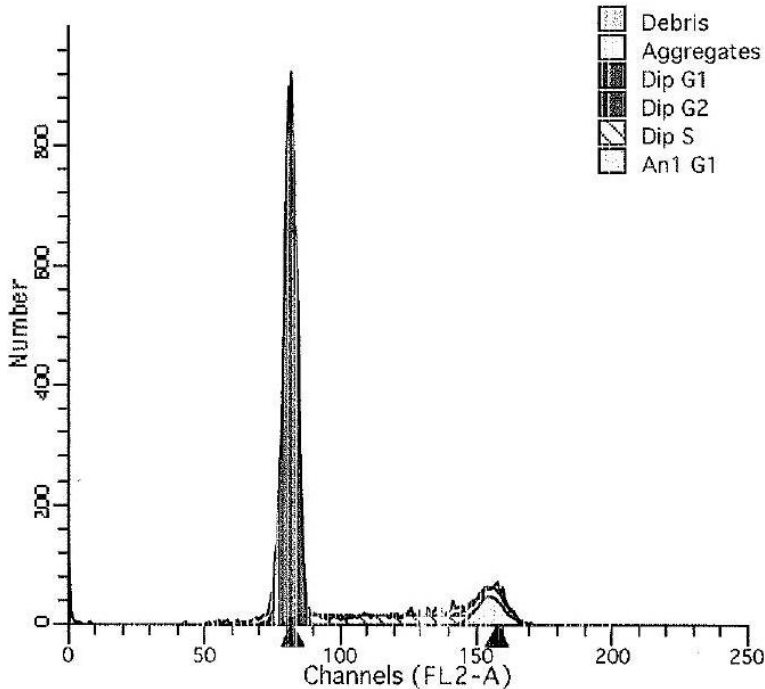
File analyzed: Data.001  
 Date analyzed: 17-Jul-2018  
 Model: 2DA0n\_DS<sub>n</sub>\_TSD  
 Analysis type: Automatic analysis

Diploid: 99.08 %  
 Dip G1: 55.55 % at 76.04  
 Dip G2: 8.00 % at 147.41  
 Dip S: 36.45 % G2/G1: 1.94  
 %CV: 2.97

Tetraploid: 0.92 %  
 An1 G1: 100.00 % at 147.41  
 An1 G2: % at  
 An1 S: 0.00 % G2/G1:  
 %CV: 2.52 DI: 1.94

Total Aneuploid S-Phase: 0.00 %  
 Total S-Phase: 36.12 %  
 Total B.A.D.: 0.39 %

Debris: 1.10 %  
 Aggregates: 1.25 %  
 Modeled events: 8468  
 All cycle events: 8269  
 Cycle events per channel: 107  
 RCS: 1.448



Auriculataoside A (1 μM), 24h

File analyzed: Data.002  
 Date analyzed: 17-Jul-2018  
 Model: 2DA0n\_DS<sub>n</sub>\_TSD  
 Analysis type: Automatic analysis

Diploid: 99.43 %  
 Dip G1: 73.01 % at 81.19  
 Dip G2: 8.00 % at 155.30  
 Dip S: 18.99 % G2/G1: 1.91  
 %CV: 2.85

Tetraploid: 0.57 %  
 An1 G1: 100.00 % at 155.30  
 An1 G2: % at  
 An1 S: 0.00 % G2/G1:  
 %CV: 3.21 DI: 1.91

Total Aneuploid S-Phase: 0.00 %  
 Total S-Phase: 18.88 %  
 Total B.A.D.: 0.38 %

Debris: 2.73 %  
 Aggregates: 0.57 %  
 Modeled events: 7411  
 All cycle events: 7166  
 Cycle events per channel: 87  
 RCS: 2.037

Cell cycle data of auriculataoside A (1).