

GYNURAの 作用メカニズム

* GYNURAとは、GYNURAという学名をもつ、キク科サンシチソウ属（ギヌラ属）の多年草。東南アジアを中心に中国南部からパプア・ニューギニアまで広く範囲で分布しております。野菜、香味料、薬草として食用されております。

古くから薬草として用いられてきた歴史があります。（解熱剤、赤痢の治療、切り傷、毒消し、血糖値を下げる効果があるといわれております）

* 古くから民間療法的に、がんや代謝疾患に効果があるとされ、体調をくずした際にその葉っぱを食べることで自ら治療してきたものです。

* このGYNURAに関連する成分について、主にがん、免疫に関する効果を検証し、若干の見解を得ましたので、それらをまとめた資料を作成しました。
検討内容及び結果の要約は以下になります。

試験1. 免疫反応を誘導するのか？
(IFN-ガンマの誘導)

結果：検体の単独刺激によってIFN産生量を増加させたのは、検体、1.2.(GYNURA)であった。

試験2. 自然免疫、獲得免疫のどちら？
(マクロファージ及びヘルパーTの活性化)

結果：GYNURA刺激ではマクロファージの蛍光ビーズ取り込み能力が特別高いことはなかった。
GYNURAは獲得免疫細胞（ヘルパーT細胞）全体を活性化するが、Th1/Th2の比率から特にTh1優位にするとは言えない結果であった。

試験3. 免疫を介してがん細胞を攻撃できるか？
(がん細胞への細胞傷害活性)

結果：各検体ともEL-4, Melanomaに対しては効果を示さなかったが、CT-26に対して若干の効果を認めた。
適応リンパ球におけるキラー活性が認められ、不適応リンパ球では認めないものはGYNURAであり、その作用は共通してCT-26に対して強くメラノーマではGYNURAにのみ効果が認められた。また全体的に作用が最も強かったのが、GYNURAであった。

総括結果：

GYNURAは免疫反応を高めること、特にその作用としてリンパ球を介するキラー活性によって各種がん細胞に障害を与えることが判明した。その強さは検討した検体の中では最も強いものであった。

試験1. 植物抽出物(GYNURA)による免疫応答反応の検討

[目的]

植物抽出物における免疫反応誘導能を検討することで、その後の薬効評価への可能性を検討する。

[試験材料]

抽出物(8検体)、及び既知の免疫反応誘導物、1～2種

[試験方法]

1. マウス脾臓細胞を精製して培養する。
2. 培養脾臓細胞に各種試験物の段階希釈したものを添加し、培養を継続させる。
3. 一定時間経過した段階で、培養液は回収し、後のサイトカイン測定用に保管しておく。
4. 脾臓細胞の増殖促進効果を検討するため、生細胞にのみ反応する試薬を加え、培養を継続させ、生細胞が発色反応を起こした段階で吸光度を測定することで、細胞増殖効果を判定する。(これはIFN測定で代替えるため省略)
5. ここで免疫細胞の増殖が確認された場合には、3.で回収しておいた培養液中のインターフェローンガンマ量をELISA法を用いて測定し、免疫細胞の活性化を検討する。
6. 既知の免疫誘導物における効果と比較検討する。
7. 追加検討として脾臓細胞からTotal RNAを抽出し、各種サイトカインのmRNA量を定量PCRにより測定した。

試験結果及び考察

1.(1、2)： ELISA法によるインターフェロン-ガンマ分泌量の検討

マウス脾臓細胞に検体(1/10000希釈)を添加した際に細胞から培養液中に分泌された免疫反応産物であるIFN- γ 量をELISAによって測定した。また脾臓細胞にあらかじめ細胞増殖刺激(Con A, LPS)を加えた細胞にも同様に検体を添加してIFN産生を実蛋白質量として比較検討した。

検体の単独刺激によってIFN産生量を増加させたのは、検体、1.2.であった。
Con A刺激に加えて相乗効果が得られるものは見出されなかった。またLPS刺激ではそれぞれの検体でIFN産生の増強効果が起こったが、その強さは1~4に比べて5~8の方が若干強い作用であった。Con AとLPSでは刺激のメカニズムが異なると考えられており、検体の増強効果もそのメカニズムに影響されたものと考えられた。

これらIFN産生の結果からだけでは検体の優越が判定できないため、実験を追加して様々なサイトカインのmRNAが上昇するのか、否かを定量PCR法を用いて検討することとした。

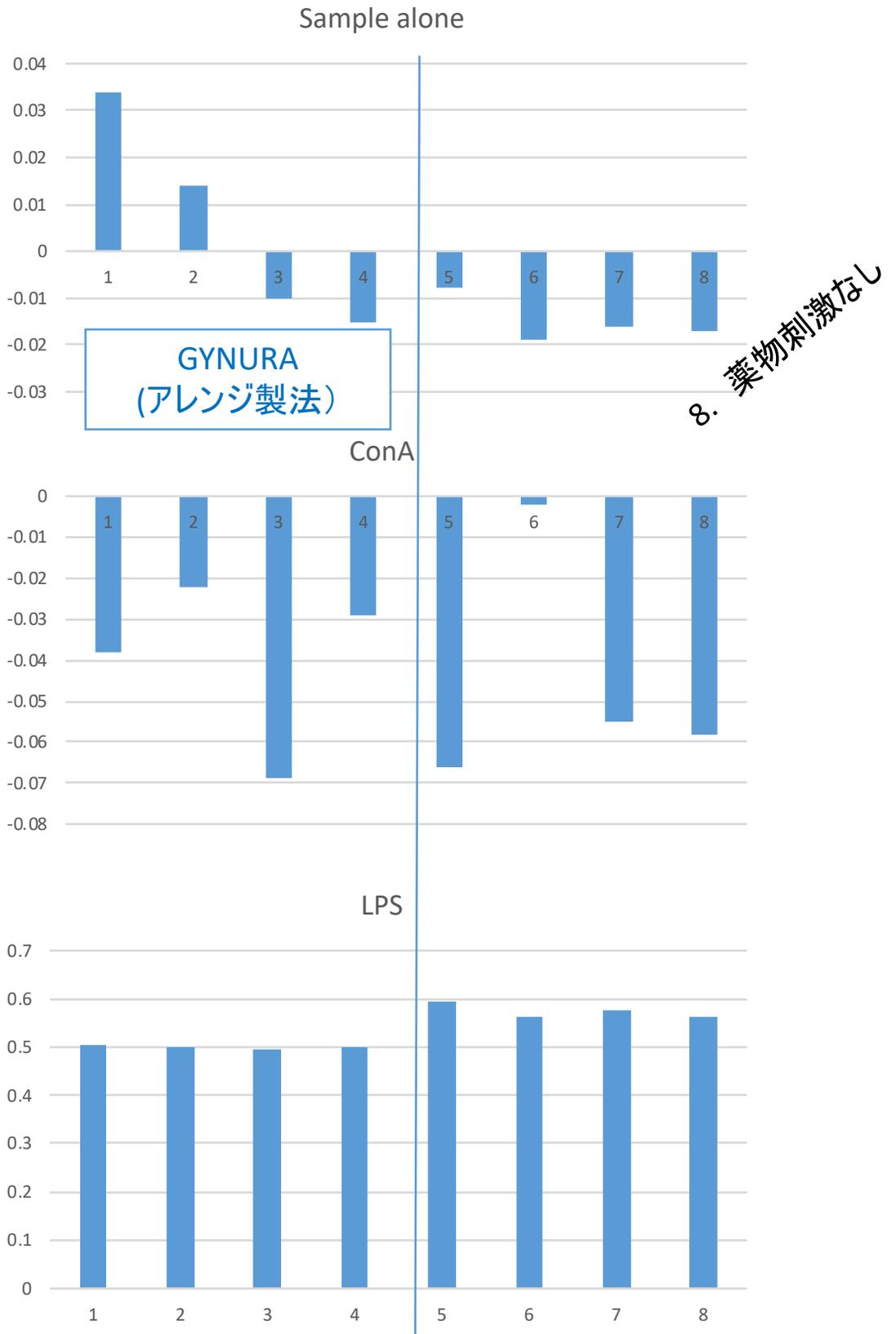
2. : 定量PCR法による各種サイトカイン-mRNA量の検討

6種のサイトカイン-mRNA量の変動を検証した。
HSPの1~4において、全体的にIL2, IFN, IL4に上昇傾向が認められたのに対して、IL1a, IL12, TNFでは抑制傾向を示した。

以上の結果を総合的に解釈すると、

1. GYNURAにおいては低温除湿乾燥をした後、粉碎することが免疫反応を引き起こすためには有効な方法であろうと考えられること。
2. 凍結融解は実施しないほうが良いと考えられること。

1.(2) ELISA法によるインターフェロン-ガンマ分泌量の検討 (薬物刺激無し及びConA, LPS単独刺激との比較)



試験2. 御社候補物質による免疫応答反応の検討 ～マクロファージ及びヘルパーT細胞の活性化～

[目的]

試験1.で得られた結果を元に、候補物質における免疫反応を更に自然免疫、獲得免疫に分割して検討する。

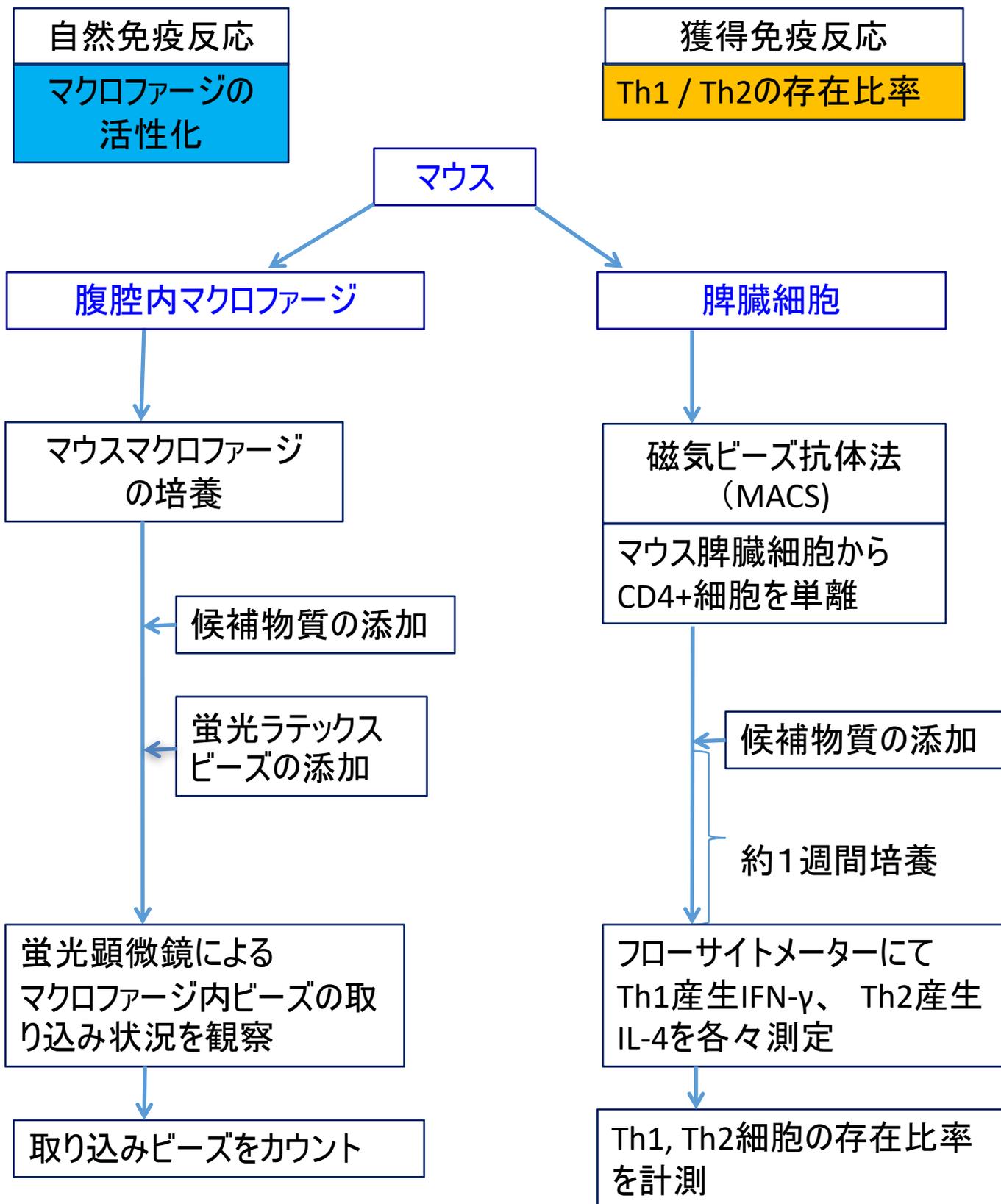
[試験材料]

各種候補物質

[試験方法]

1. マウスからマクロファージ、脾臓細胞を各々単離して培養する。
2. マクロファージの活性化の検討では、培養マクロファージに候補物質を添加したのち、蛍光ラテックスビーズを添加し、マクロファージの貪食能を検討する。
3. 一方、Th1 / Th2細胞の存在比率の検討では、まず脾臓細胞からCD4+T細胞を磁気ビーズ法(MACS法)にて単離し、候補物質を添加したのち、約1週間培養を継続する。
4. T細胞がIFN- γ を産生するようになるとTh1細胞、IL-4を産生するようになるとTh2細胞に分化したと判定できる。
5. これら細胞の存在比率を計測することで候補物質刺激によってTh1 / Th2バランスがどちらが優位に変動したか判定する。
6. 以下別紙に実験の流れを図に示した。

「試験方法」



試験結果及び考察

* 自然免疫反応 / マクロファージの活性化

蛍光顕微鏡を用いて蛍光ビーズの取り込みの状態を画像取り込みした。一定の蛍光輝度以上のスポットを識別させ、数値化処理を行った。各群の添加量(希釈倍数)毎に取り込み蛍光量をヒストグラムとして示した(図5.)。

その結果、GYNURA刺激ではマクロファージの蛍光ビーズ取り込み能力が特別高いことはなかった。

* 獲得免疫反応 / Th1, Th2の存在比率

培養リンパ球に各検体を添加し1週間培養したリンパ球を用いて、IFN- γ を産生するリンパ球をTh1、IL-4産生リンパ球をTh2とし、それぞれの存在を蛍光標識抗体を用いて測定した。

フローサイトメーターで検体の希釈倍数毎にそれぞれの産生細胞を%で表示した。

結果はIFN- γ とIL-4でそれぞれ整理し、各%からTh1 / Th2の比率を最終的に求めた。

GYNURAは獲得免疫細胞(ヘルパーT細胞)全体を活性化するが、Th1/Th2の比率から特にTh1優位にするとは言えない結果であった。

* 総合的に考察すると、GYNURAは自然免疫よりも獲得免疫系に強く働きかけることが明らかとなった。このことから抗腫瘍効果などが認められるためには、キラーT細胞、NK細胞などを活性化している、または直接、腫瘍細胞への殺細胞効果などが可能性として考えられる。

蛍光ビーズ
取り込み量

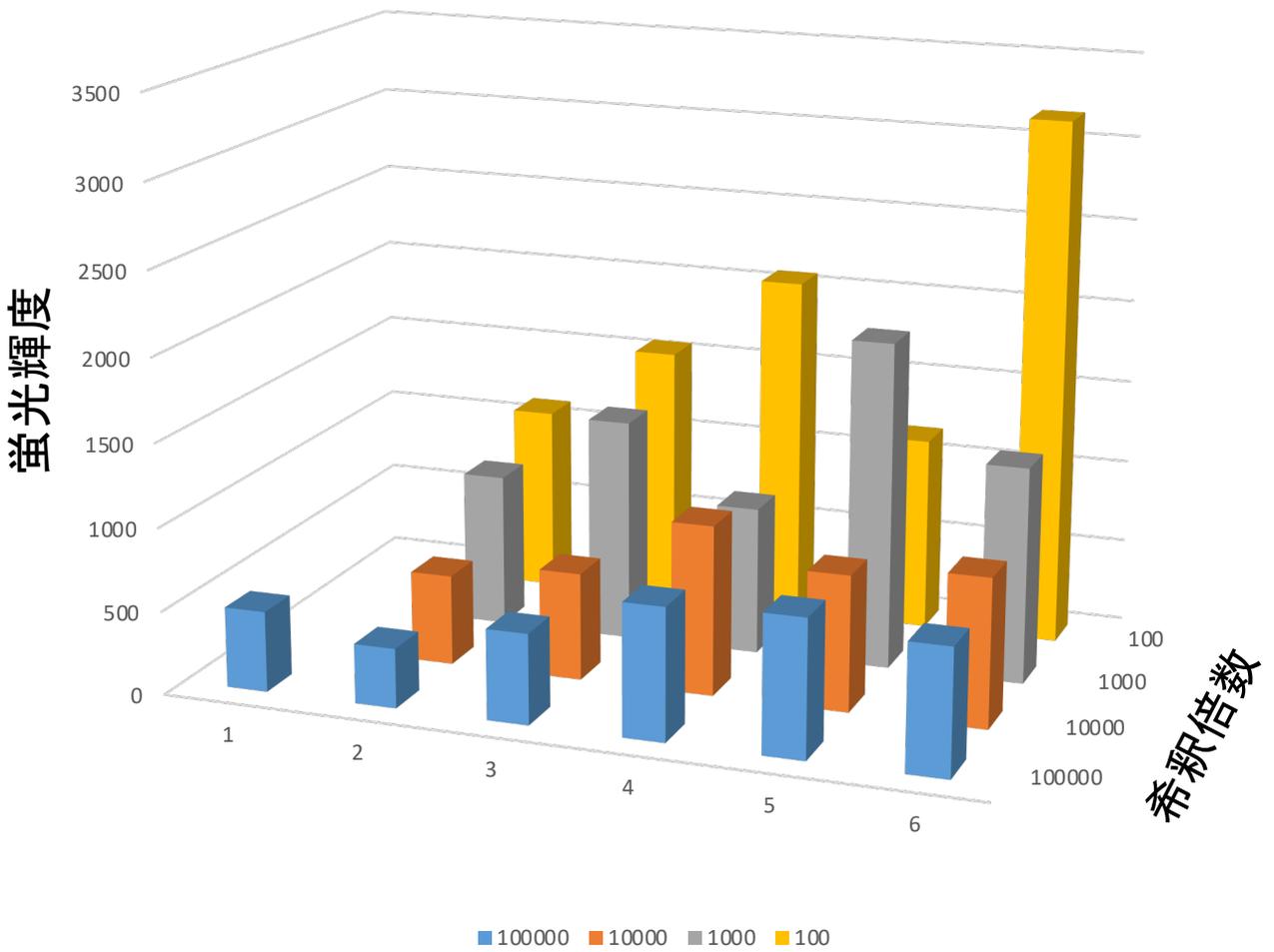
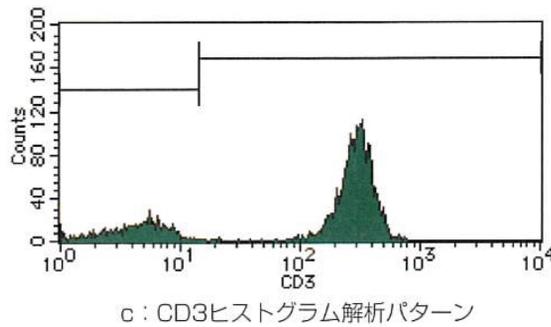
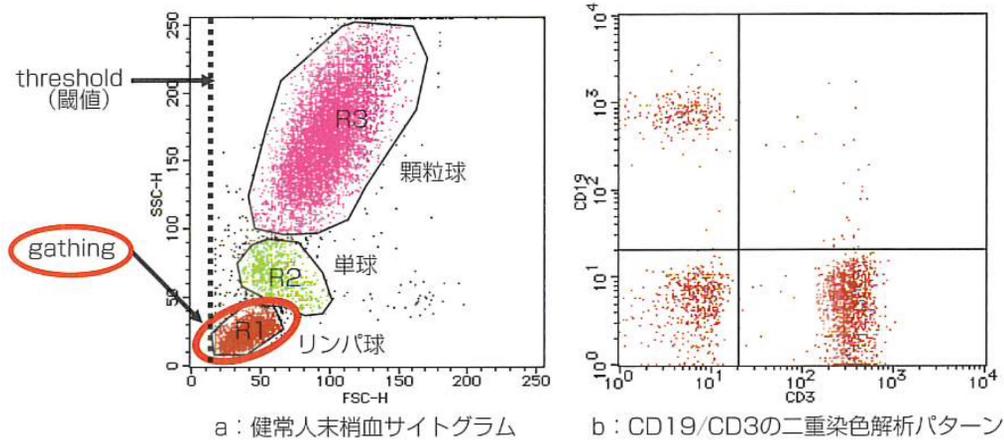


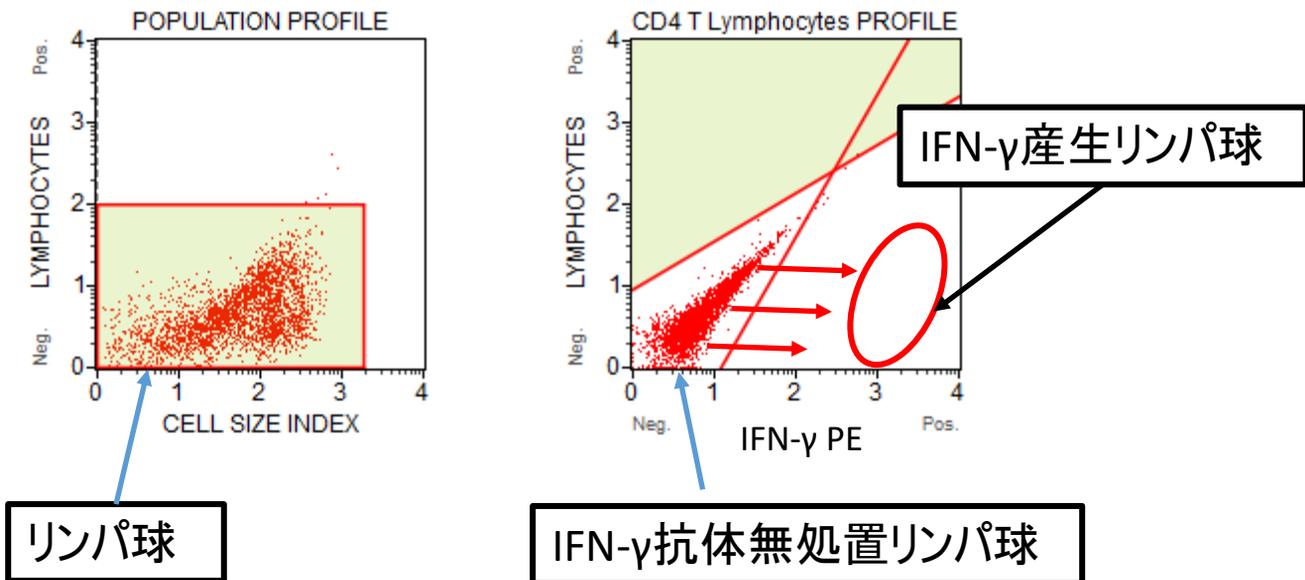
図5. マクロファージによる蛍光ビーズの取り込み量

試験結果

獲得免疫反応 / Th1、Th2の存在比率



* 今回の検討ではあらかじめリンパ球を磁気ビーズ抗体法 (MACS) で単離した後、実験に用いている。



試験結果

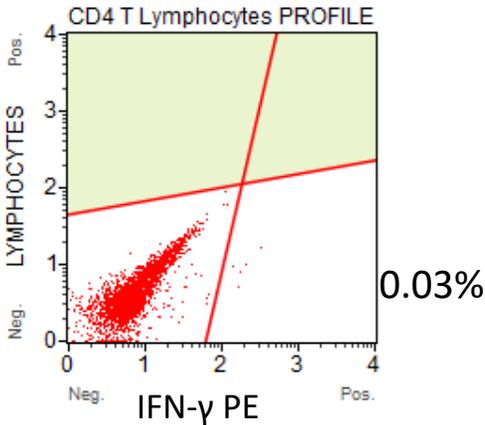
獲得免疫反応 / Th1、Th2の存在比率

IFN- γ 産生Th1細胞の存在

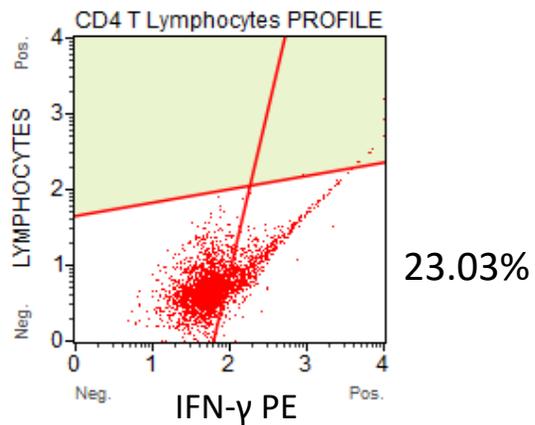
(10000倍希釈検体)

* 培養Tリンパ球全体をフローサイトメーターで検出するように設定した後、蛍光PE標識IFN- γ 抗体でラベルされるリンパ球が図中、右側にシフトする比率を測定する。

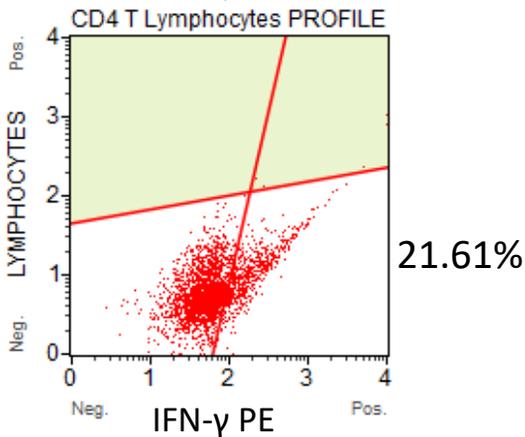
無処置Control



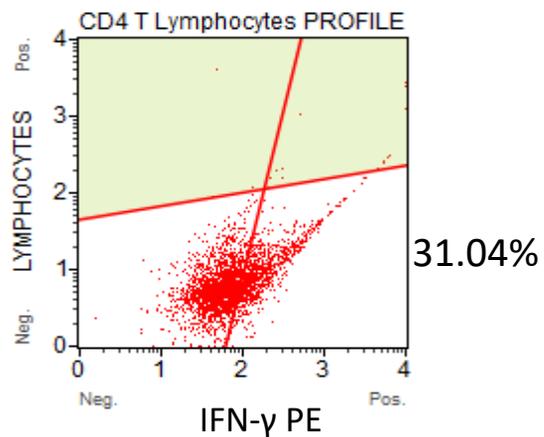
#2 GYNURA



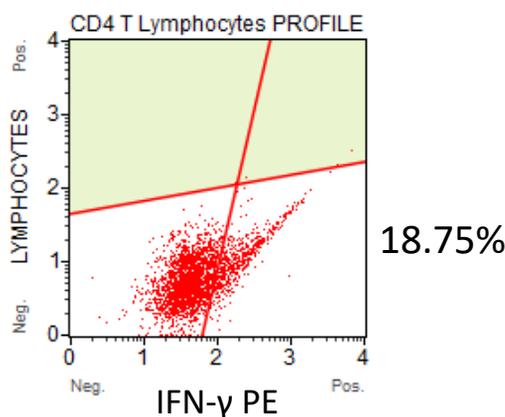
#3 ドクダミ



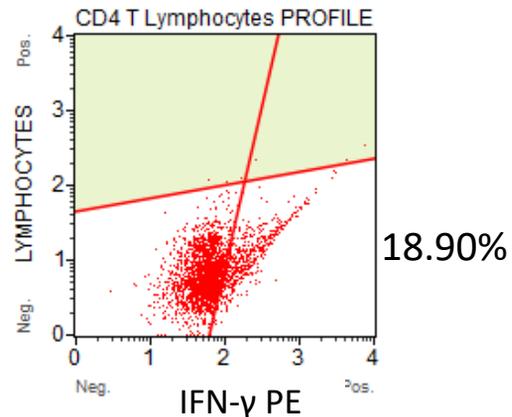
#4 オリーブ



#5 フコイダン



#6 2~5 Mix



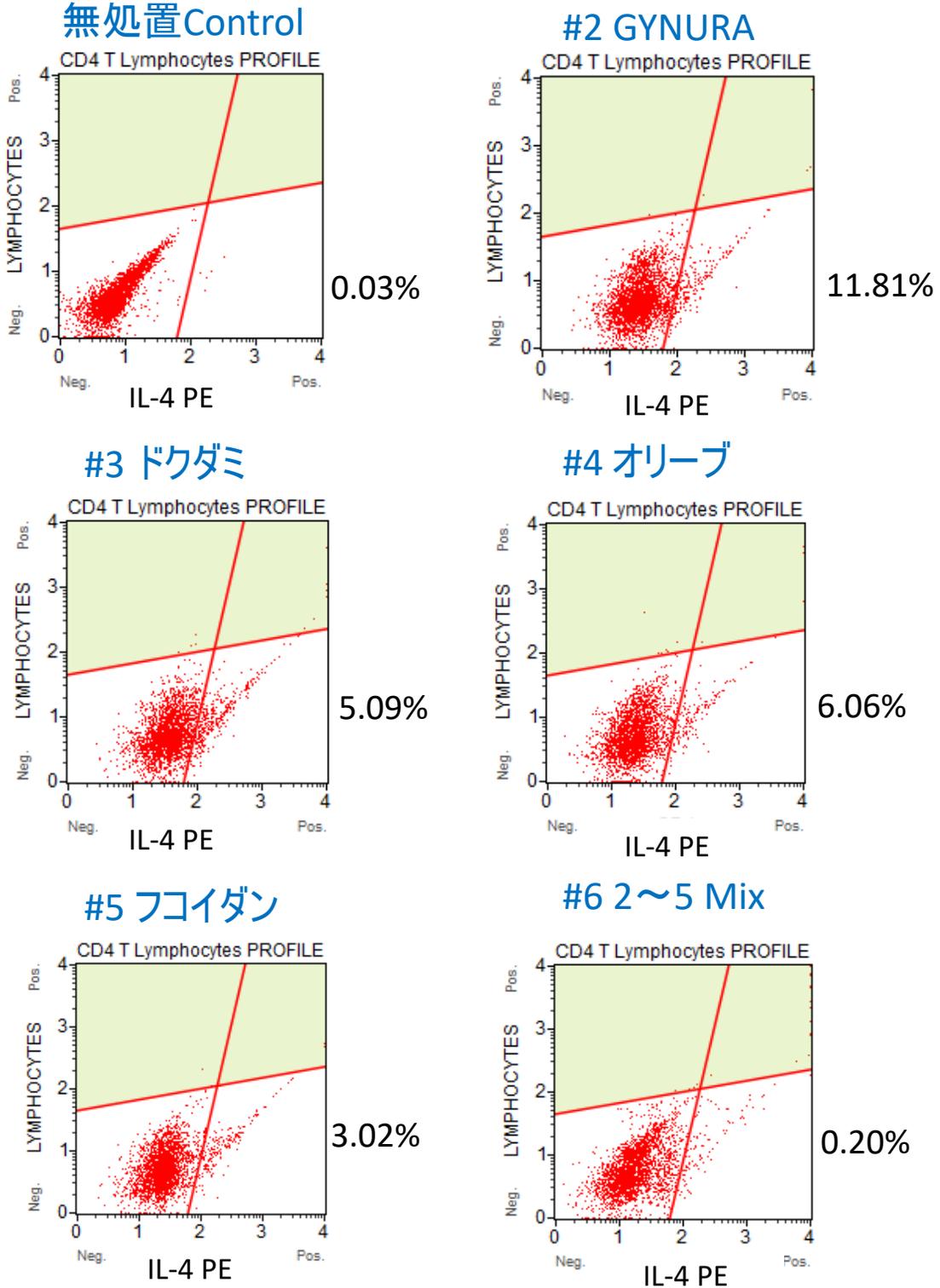
試験結果

獲得免疫反応 / Th1、Th2の存在比率

IL-4産生Th2細胞の存在

(10000倍希釈検体)

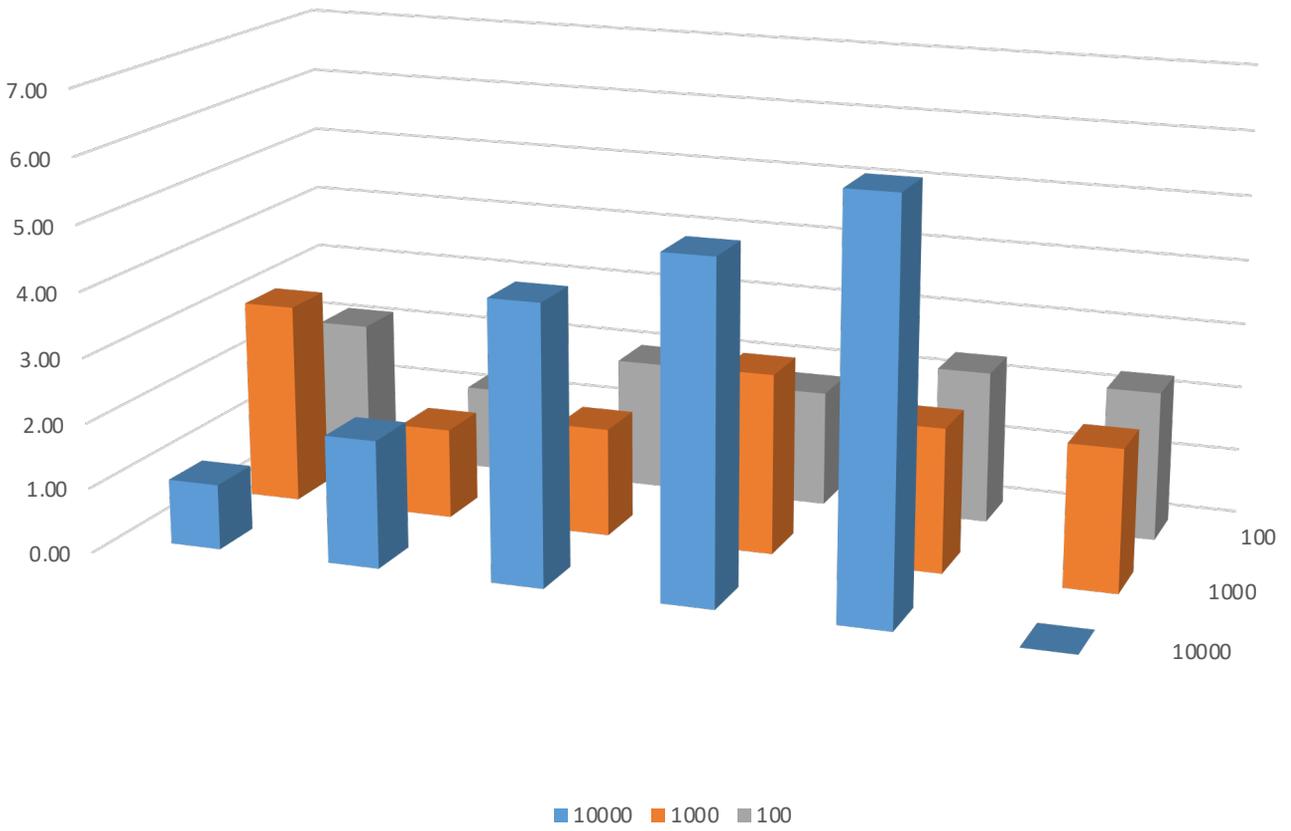
* 培養Tリンパ球全体をフローサイトメーターで検出するように設定した後、蛍光PE標識IL-4抗体でラベルされるリンパ球が図中、右側にシフトする比率を測定する。



試験結果

獲得免疫反応 / Th1、Th2の存在比率

Th1 / Th2



試験3. 御社候補物質による免疫応答反応の検討 ～キラー細胞、ナチュラルキラー細胞などによる がん細胞への細胞傷害活性の検討～

[目的]

試験1.2.で得られた結果を元に、候補物質における免疫反応を更にキラー細胞、ナチュラルキラー細胞などによるがん細胞への細胞傷害活性について検討する。

[試験材料]

各種候補物質

[試験方法]

1. マウスから脾臓細胞を単離して培養する。
2. それとは別に数種がん細胞を培養する。
3. がん細胞に対する**殺細胞効果**の検討では培養がん細胞に各種検体の段階希釈液を添加し、培養を継続し、その後のがん細胞増殖を測定する。
4. **キラー細胞の活性化**の検討では培養がん細胞にマウス脾臓細胞及び各種検体を添加し、培養を継続し、キラー活性によって死滅するがん細胞を計測する。
5. 細胞死と細胞傷害を定量する比色測定法として、細胞の懸濁液上清中に放出される乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定する原理に基づく方法を用いる。

「試験方法」

殺細胞効果
がん細胞

* がん細胞に対して直接的殺傷効果があるか、検討する。

キラー活性
リンパ球 / がん細胞

キラー細胞、ナチュラルキラー細胞の活性化を介してがん細胞に傷害を与えるか、検討する。

培養がん細胞
(固形がん; 大腸ガン: CT-26)
(血液系がん; リンパ腫: EL-4)
(表皮がん; メラノーマ: B16 mel)

候補物質の添加

約1週間培養

がん細胞の細胞死及び細胞傷害の測定

マウス

脾臓細胞

候補物質の添加

キラー活性の増強?

培養がん細胞

混合培養

約1週間培養

がん細胞の細胞死及び細胞傷害の測定

試験結果

* がん細胞に対する直接的殺細胞効果の検討

培養がん細胞に対して直接検体を添加した際の細胞を死滅させる殺細胞効果を検討した。3種のがん細胞はそれぞれ固形がん、血液系がん、表皮がんの代表的なマウスがん細胞株を用いた。(CT-26; 大腸がん、EL-4;リンパ腫、B16 mel;メラノーマ)

各検体ともEL-4, Melanomaに対しては効果を示さなかったが、CT-26に対して若干の効果を確認した。

* キラー細胞、ナチュラルキラー細胞の活性化を介するがん細胞傷害活性の検討

マウス脾臓から単離したリンパ球に各種検体を添加し、1週間培養した。この間にキラー活性が誘導されることを想定した。その後別途培養していた3種がん細胞にこれらのリンパ球を併せて培養を継続することによって、キラー活性が誘導されていれば、リンパ球によってがん細胞を障害する。その結果は細胞障害活性測定キット(Takara製 LDH Cytotoxicity Detection Kit)を用いて測定した。

予備実験において培養上清を用いて測定したところ、明確な差異を認めなかったことから、細胞質に残存する酵素を測定することによって、Controlより低値を示すものほど障害の程度が強い関係になることが明らかであったため、今回の結果は全て細胞質内酵素量により判定している。

マウスリンパ球は3種がん細胞に適應する種と不適應な種からそれぞれ単離しておいた。適應リンパ球によってがん細胞が障害され、かつ不適應なリンパ球では障害されないことが、がん特異的キラー活性の誘導と考えられる。

このような前提で検討を行ない、結果を% of Controlで示した。

適應リンパ球におけるキラー活性が認められ、不適應リンパ球では認めないものはGYNURAであり、その作用は共通してCT-26に対して強くメラノーマではGYNURAにのみ効果が認められた。また全体的に作用が最も強かったのが、GYNURAであった。

* これまで各種免疫反応に対する効果を検討してきた結果、GYNURAは免疫反応を高めること、特にその作用としてリンパ球を介するキラー活性によって各種がん細胞に障害を与えることが判明した。その強さは検討した検体の中では最も強いものであった。

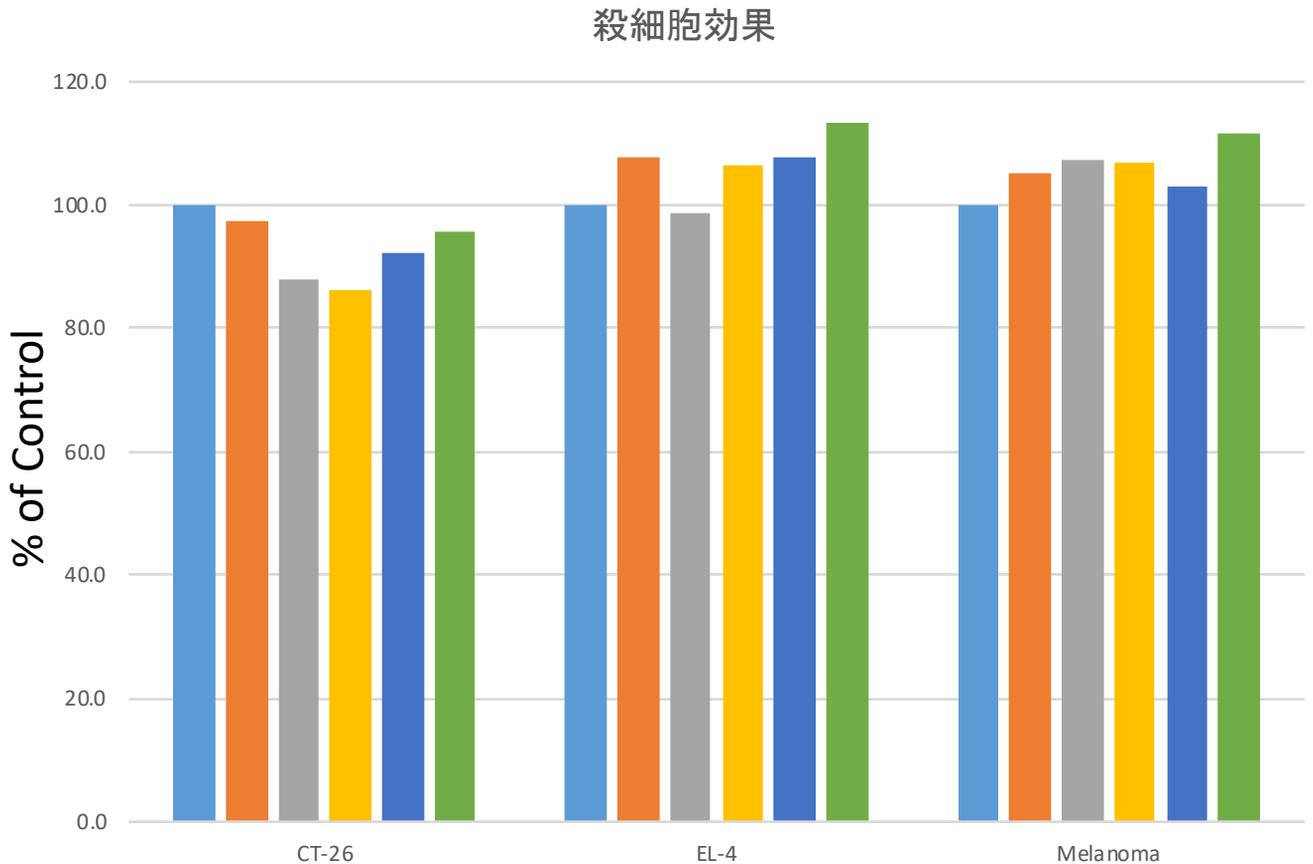
試験結果

* がん細胞に対する直接的殺細胞効果の検討

殺細胞効果

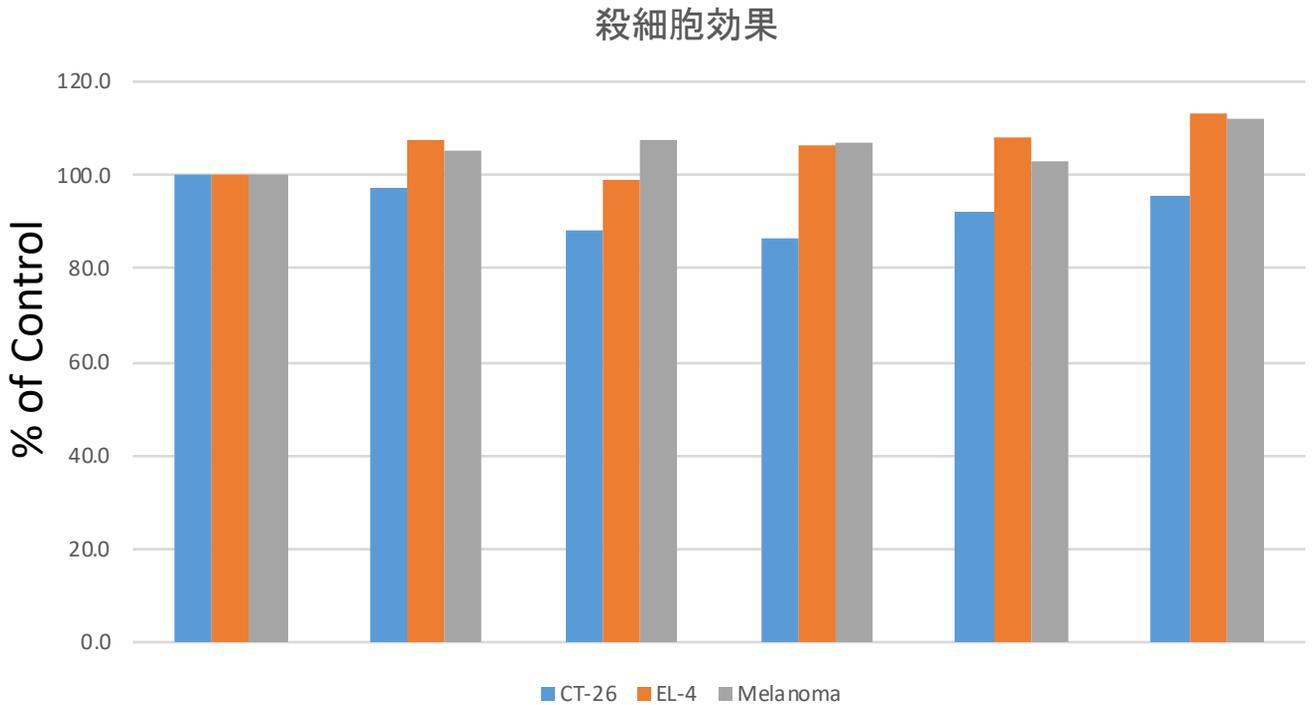
検討したがん細胞

1. 固形がん;大腸ガン:CT-26
2. 血液系がん;リンパ腫:EL-4
3. 表皮がん;メラノーマ:B16 mel



試験結果

* がん細胞に対する直接的殺細胞効果の検討



細胞障害活性(LDH Cytotoxicity; OD490nm) n:16 平均値

	CT-26	EL-4	Melanoma	
Control		1.736	0.799	0.959
[Blue Box]		1.689	0.861	1.010
		1.527	0.789	1.029
		1.500	0.851	1.024
		1.602	0.862	0.989
		1.659	0.906	1.072

細胞障害活性(LDH Cytotoxicity; % of Control)

	CT-26	EL-4	Melanoma	
Control		100.0	100.0	100.0
[Blue Box]		97.3	107.8	105.3
		88.0	98.7	107.3
		86.4	106.6	106.8
		92.3	107.9	103.1
		95.6	113.5	111.8

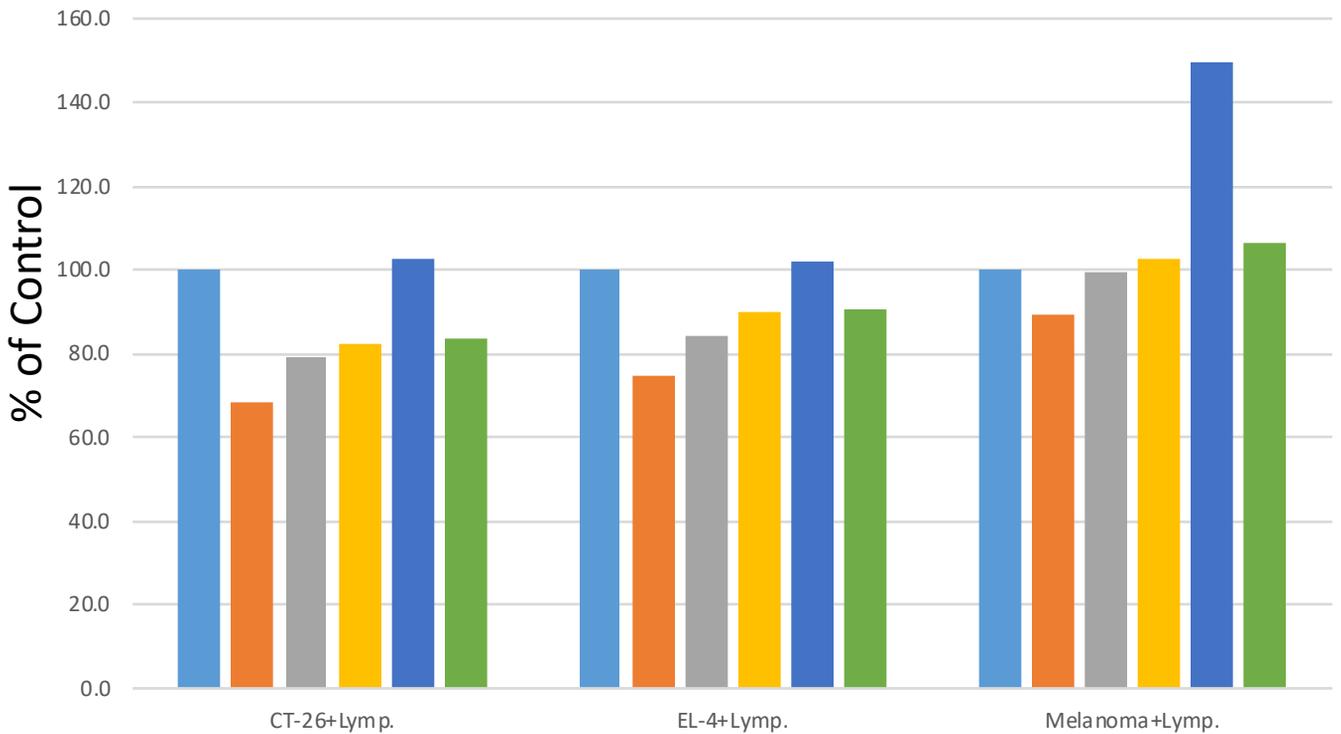
試験結果

キラー活性

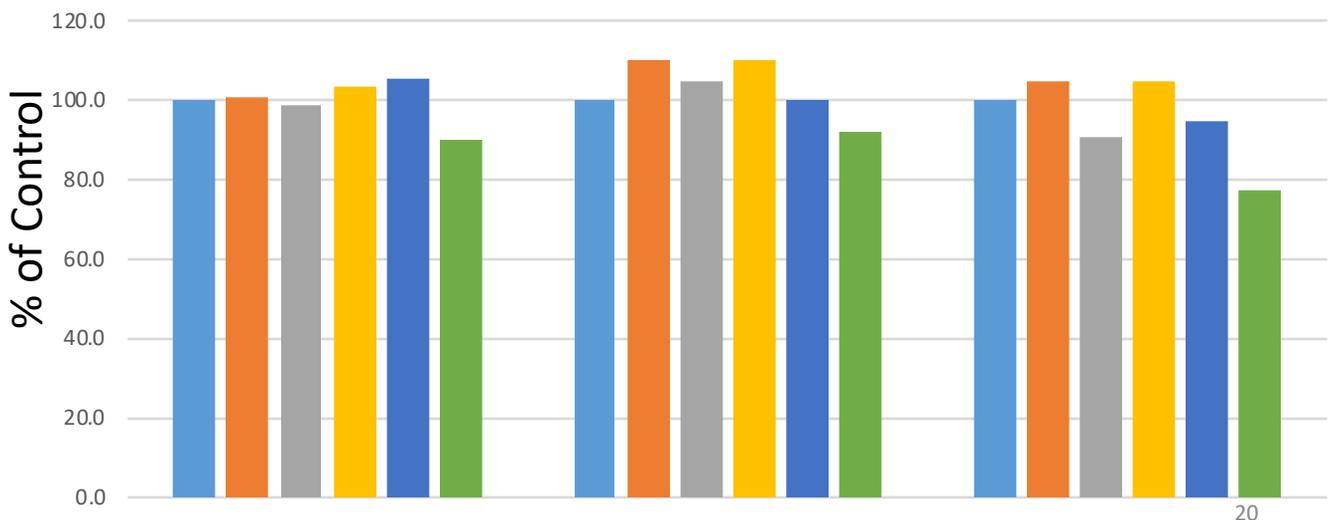
リンパ球 / がん細胞

キラー細胞、ナチュラルキラー細胞の活性化を介してがん細胞に傷害を与えるか検討する。

キラー活性(対応リンパ球)

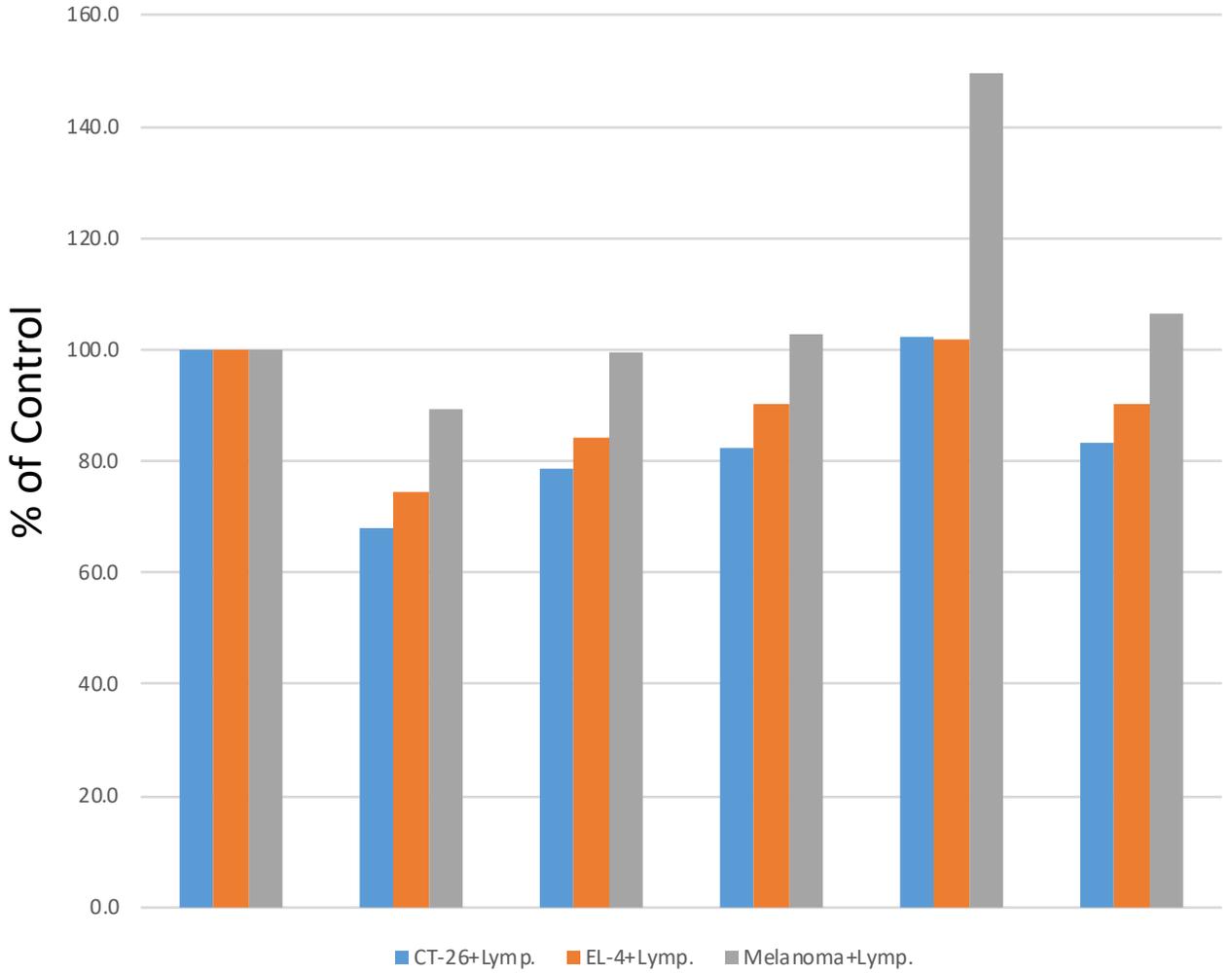


キラー活性(不対応リンパ球)



試験結果

キラー活性(対応リンパ球)

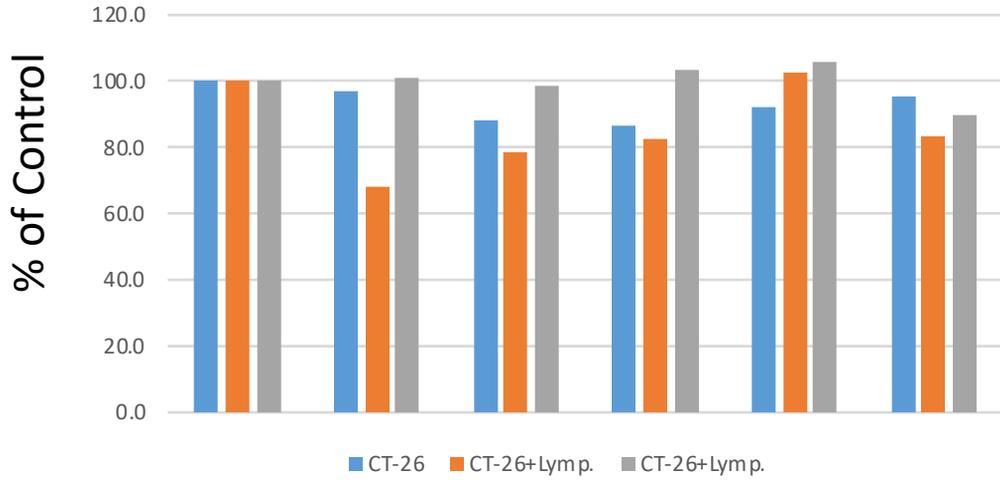


細胞障害活性(LDH Cytotoxicity; % of Control)

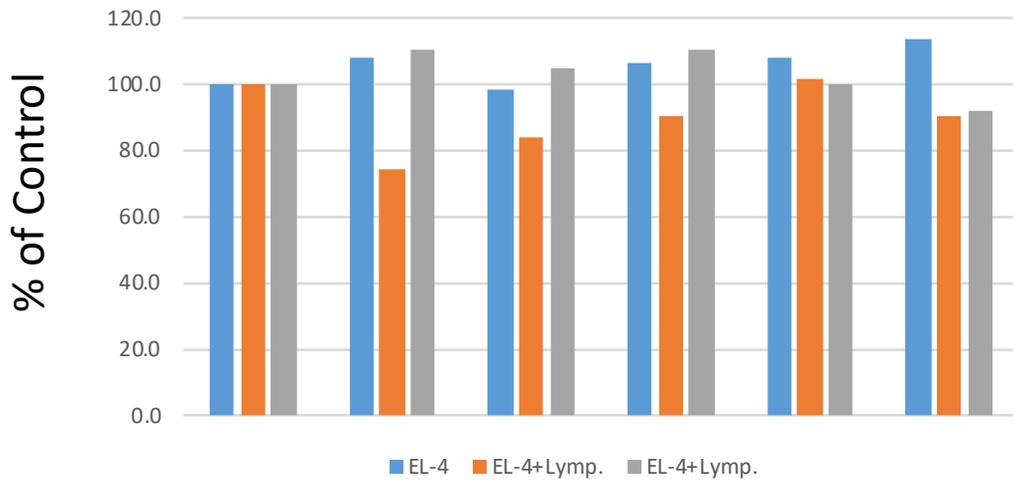
	CT-26+Lymph.	EL-4+Lymph.	Melanoma+Lymph.
Control	100.0	100.0	100.0
対応リンパ球	68.0	74.6	89.3
	78.8	84.2	99.6
	82.4	90.1	102.9
	102.3	101.9	149.4
	83.3	90.3	106.5
	90.1	92.2	77.1
Control	100.0	100.0	100.0
不対応リンパ球	101.0	110.1	104.4
	98.5	104.8	90.6
	103.4	110.2	104.7
	105.5	100.2	94.9
	90.1	92.2	77.1

試験結果

CT-26に対する効果



EL-4に対する効果



Melanomaに対する効果

