

氏名	よう りん 楊 霖
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	富生命博甲第 132 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 23 日
専攻名	生体情報システム科学専攻
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題目	<b>Evaluation of Effects of Natural Medicines on Mammalian Cells by Using Two-Dimensional Surface Plasmon Resonance Observation</b> (二次元表面プラズモン共鳴観察を用いる哺乳動物細胞 に対する天然薬の作用効果の評価)
論文審査委員	
(主査)	教授 黒澤 信幸
(副査)	教授 篠原 寛明
(副査)	教授 鈴木 正康
(副査)	准教授 東田 道久
指導教員	教授 篠原 寛明

## 学位論文内容要旨

(ふりがな) よう りん

氏 名 楊 霖

Ⓜ・女

Natural products have various biological activities such as anti-allergic effect and anti-cancer effect, these excellent properties make them attractive as lead chemicals for discovery of new drugs. Screening of natural products is becoming more important to find new and effective drug compounds. Therefore, lots of methods such as colorimetric, fluorescence, bioluminescence, biological and cell-based assays were applied in screening drugs from natural products. However the high cost, time consuming and complex experimental steps were disadvantages of these methods. Thus, the necessary of more rapid, simple screening methods is increasing now. Recently, surface plasmon resonance (SPR) sensor has been applied in drug screening. SPR change has been used to monitor changes of the refractive index by specific binding reactions such as antigen-antibody binding and DNA hybridization on the surface of a gold chip. On the other hand, Prof. Shinohara's group has tried to monitor cell response to agonist stimulation by two-dimensional surface plasmon resonance (2D-SPR) measurement at single cell level. His group has already succeeded to monitor the cell response upon antigen stimulation on the IgE-sensitized model mast cell, RBL-2H3 cell as described in Chapter 1. It was further considered that the 2D-SPR response

by the local refractive index change at RBL-2H3 cell bottom upon antigen stimulation might be related with protein kinase C (PKC) translocation in each RBL-2H3 cell. These research background and purpose of this study was described in Chapter 1.

In Chapter 2, all materials and methods for this study were described.

In Chapter 3, two-dimensional surface plasmon resonance (2D-SPR) measurement as a simple and rapid method was successfully applied to evaluate the anti-allergic effect of natural medicines on the degranulation of RBL-2H3 cells. The each cell response was observed by SPR imaging upon stimulation with model antigen, Albumin from bovine serum, 2, 4-Dinitrophenylated (DNP-BSA) after anti-DNP IgE sensitization on RBL-2H3 cells. Glycyrrhizic acid (GA) and isoliquiritigenin (ISL) from Licorice were examined as degranulation inhibitors. After the pretreatment with 30  $\mu$ M GA or 50  $\mu$ M ISL, the reflection intensity increase at cell regions upon DNP-BSA stimulation was completely suppressed. The suppression of reflection intensity increase at each cell regions in the 2D-SPR observation upon DNP-BSA stimulation was dependent on the GA and ISL concentration in pretreatment as same as  $\beta$ -hexosaminidase assay. These results demonstrated that the suppression effect of GA and ISL on the degranulation of RBL-2H3 cells could be evaluated by 2D-SPR observation at cell regions in quick and simple manner. My study further suggested that 2D-SPR observation might be applicable to screen anti-allergic components of natural products and useful to discuss its inhibitory effect in the intracellular signaling

pathway of mast cell upon antigen stimulation.

In Chapter 4, I have tried to apply 2D-SPR observation to evaluate the anti-proliferative activity of ISL on human lung cancer cell (A549 cells). It is known that ISL exhibits an inhibitory effect on proliferative activity of cells in prostate cancer, hepatocellular carcinoma, breast cancer, melanoma, lung cancer and so on. The human lung cancer cell proliferation was suppressed with the ISL treatment over 100  $\mu\text{M}$ . It was demonstrated that the SPR angle at A549 cell regions shifted positively day by day with cell proliferation in the absence of ISL, but the SPR angle did not change even after a few days in the presence of 100  $\mu\text{M}$  ISL. It suggested that 2D-SPR observation could monitor human lung cancer cell proliferation and evaluate the anti-proliferation effect of ISL without any probes.

In Chapter 5, I concluded the usefulness and advantages of 2D-SPR observation for evaluation of anti-allergic and anti-proliferation effect of traditional natural medicines on mammalian cells. My study further suggested that 2D-SPR observation method might be useful to discuss the intracellular signaling pathway and inhibition mechanism in individual cells.

## 【論文審査の結果の要旨】

本論文は第1章から第5章で構成されている。

第1章では、まず本研究の基盤である二次元表面プラズモン共鳴（2D-SPR）観察法について、その原理と利点が記述され、さらに楊氏の指導教員研究室において、この2D-SPR観察法によりモデルマスト細胞をIgE感作後、アレルゲン刺激した際の個々の細胞内の反応を屈折率変化として観察することにより、迅速簡便なアレルゲン検出が可能となっていること、また、天然薬の広範な有用性と一方でその作用評価の難しさに関する背景が記された。そして本論文ではこうした背景を基に、天然薬由来成分のグリチルリチンやイソリキリチゲニンのもつ抗アレルギー作用を、モデルマスト細胞のアレルゲン刺激により生じる2D-SPR応答を抑制する効果として、きわめて簡便に評価できると期待し、それを目指すことにしたこと、さらには、イソリキリチゲニンを例に、天然薬のがん細胞に対する増殖抑制作用も2D-SPR観察で評価できるものと期待し、併せて本博士論文の目的としたことが記された。

第2章では、これらの研究に用いた機器、器具や試薬類がまとめて記され、細胞培養法、2D-SPR観察法などの実験手法が記述された。

第3章では、モデルマスト細胞としてRBL2H3細胞を用いて、種々の濃度のグリチルリチン、およびイソリキリチゲニンによるアレルゲン刺激時の個々の細胞領域の2D-SPR観察を比較し、脱顆粒につながる細胞内シグナル伝達反応の抑制量を評価、それぞれのIC<sub>50</sub>値を求めた。RBL2H3細胞のアレルゲン応答の2D-SPR観察法は、従来法のβ-ヘキソサミニダーゼ放出測定法と同様に、天然薬の抗アレルギー作用の評価に有効であることが示されるとともに、一方でβ-ヘキソサミニダーゼアッセイに比べ、検出試薬等を要しない迅速で簡便な方法であることが記された。また、阻害剤を用いて2D-SPRで観察されるアレルゲン刺激による細胞内シグナル伝達反応を検討し、プロテインキナーゼCのトランスロケーションが大きく寄与していることも明らかにされた。

さらに第4章では、多くのがん細胞への増殖抑制効果が報告されているイソリキリチゲニンを例として用い、ヒトの肺がん細胞株であるA549細胞へ投与した際の増殖抑制効果を、ウェル中での細胞計数と、多くの細胞を含む広い領域でのSPR観察をした際の共鳴角の変化を比較しながら調べた。その結果、100 μM以上のイソリキリチゲニンの添加により、がん細胞の増殖抑制が顕微鏡観察されるとともに、2D-SPR観察でも共鳴角の上昇が抑えられ一定となる形で評価できることが示された。また、個々の細胞領域での共鳴角を分析したところ、どの領域でもほぼ同様に12時間以内に共鳴角は負方向にシフトし、その後は一定になる様子が観測され、単一細胞レベルでの細胞増殖抑制効果が評価できる可能性も示された。

第5章では、上記3章と4章の成果をまとめるとともに、今後の展望として、細胞内で生じる反応を細胞底部の屈折率変化として観察可能な2D-SPR測定法を用いることによって、天然薬が持つ哺乳動物細胞への種々の作用と効果、またその作用メカニズムを迅速簡便に評価できるものと期待していることが記述された。

上記の様に本論文は、従来の細胞アッセイ法に比べ、検査試薬等を要せず、迅速簡便に天然薬の作用スクリーニングや作用効果の評価、またその作用メカニズムを検討できる新規な細胞観察評価システムの開発を記したものであり、十分に新規性と独創性、そして応用展開性が認められる。さらに本論文の関連論文として、以下の1報が国際誌に投稿掲載されている。よって、本論文は、博士の学位基準を満たすものと評価され、学位論文審査は合格と判定した。

- 1) Lin YANG\*, Xianwei ZHU, Minoru SUGA, and Hiroaki SHINOHARA\*,  
Evaluation of the Anti-Allergic Effect of Natural Medicines on Mast Cell by  
Using Two-Dimensional Surface Plasmon Resonance Observation,  
***Electrochemistry***, **89** (1), 7-11(2021) (published online: Oct. 8, 2020).  
(Electrochemistry 誌は、Web of Science, Scopus に登録されています。)