

受賞者

大槻 崇

千葉大学大学院薬学研究院活性構造化学研究室

研究テーマ

天然物を基盤とした腫瘍選択的アポトーシス増強物質の探索

1. 緒言

抗腫瘍性リガンド TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) とその受容体 (Death Receptors: DRs) を介するシグナル伝達は、正常細胞には毒性を示さず腫瘍細胞選択的にアポトーシスを誘導する。このため、TRAIL シグナル伝達系は新たな癌治療薬の有望な標的経路として注目されている。実際に、組み換え型 TRAIL や DR5 モノクローナル抗体などが開発され臨床試験が進められているが、近年、胃癌や乳癌細胞などの多くの腫瘍細胞が TRAIL に耐性を示すことが報告されている。この解決策として、TRAIL 感受性を高めるすなわち Death Receptors の発現量を増加させることが有効であると考えられ、このような作用を有する化合物の発見は、副作用を低減した新たながん化学療法確立に大きく貢献できる。そこで本研究では、腫瘍選択的なアポトーシスを増強する薬剤の創製を目指して、多様性に富んだ化合物の発見が期待される熱帯植物を対象として Death Receptors のうち DR5 の発現を誘導する化合物の探索を行った。更に、得られた化合物の中で強い活性が認められた化合物について、TRAIL 耐性細胞に対する耐性克服作用の検討を行った。

2. 方法

アッセイ系は、Fig. 1 に示すスクリーニングシステムを用いる。すなわち、DR5 プロモーター領域を有するルシフェラーゼレポータープラスミドを安定導入したヒト大腸がん細胞株 (DLD1/SacI cells) を用い、試料添加時のルシフェラーゼ遺伝子の発現量 (化学発光量) を指標として DR5 プロモーター活性を評価する。また、スクリーニ

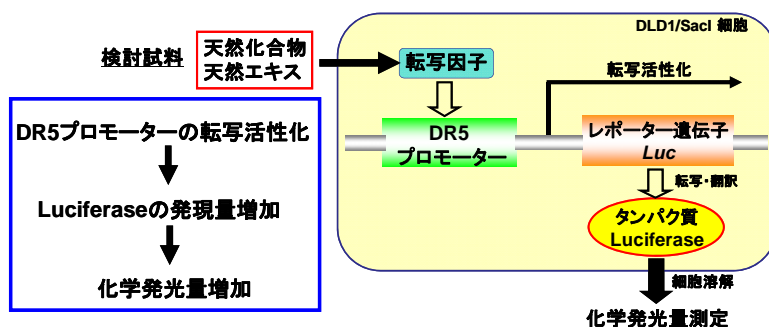


Fig.1 Screening system for DR5 expression enhancement activity

ングは、当研究室で独自に採集、構築したタイ、インドネシア、バングラデシュ産の植物エキス群を対象とし、良好な活性を示す検体を選別する。なお、DLD1/SacI 細胞は、京都府立医科大学酒井敏行教授よりご恵与頂いた。

3. 結果

(1) スクリーニング

当研究室の天然物資源ライブラリー (天然抽出物) のうち、植物エキス 250 種についてスクリーニングを行ったところ、16 種に DR5 プロモーター活性を上昇させることが判明した。このうち、強い活性が認められた *Millettia brandisiana* (マメ科), *Catimbiium speciosum* (ショウガ科), *Ardisia colorata* (ヤブコウジ科), *Garcinia mangostana* (オトギリソウ科), *Eupatorium odoratum* (キク科) の計 5 種を試料として選択し活性成分の探索を行った。

(2) マメ科 *Millettia brandisiana* からの活性成分の探索

Millettia brandisiana の葉部より作製した MeOH 抽出物 (30.5 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、MeOH 溶出画分について Hexane, EtOAc, BuOH による溶媒分配を行った。EtOAc 可溶部に DR5 プロモーター活性の顕著な上昇が認められたため、この可溶部について分画を行い、化合物 1-11 を単離した。これらの化合物のうち 1-6 は、各種スペクトルデータ (FABMS, NMR, CD) の詳細な解析により新規イソフラボノイドであることが判明し brandisianin A-F とそれぞれ命名した。また、化合物 7-11 は各種スペクトルデータを文献値と比較することにより、4'-demethyltoxicarol isoflavone (7), viridiflorin (8), naringenin (9), olibergin A (10) 及び (-)-epicatechin (11) と同

定した。

(3) ショウガ科 *Catimbum speciosum* からの活性成分の探索

Catimbum speciosum の根茎部より作製した MeOH 抽出物について、活性を指標に分画を繰り返し行い、EtOAc 可溶部より 6 種の化合物を単離し、それぞれ pinocembrin (12), naringenin (13), 3-methylkaempferol (14), pinocembrin carcone (15), cardamomin (16), 5, 6-dehydrokawain (17) と同定した。

(4) ヤブコウジ科 *Ardisia colorata* からの活性成分の探索

A. colorata の樹皮より作製した MeOH 抽出物について、活性を指標に分画を繰り返し行い、EtOAc 可溶部より新規イソフラボノイド coloratanin A (18) を含む 10 種の化合物 (18-27) を単離し、各種スペクトル分析などの詳細な解析によりその化学構造を決定した。

(5) オトギリソウ科 *Garcinia mangostana* からの活性成分の探索

G. mangostana の果皮より作製した MeOH 抽出物について、活性を指標に分画を繰り返し行い、EtOAc 可溶部より 8 種のキサントン (28-35) を単離した。これらは、各種スペクトル分析及び文献値との比較より同定した。

(6) キク科 *Eupatorium odoratum* からの活性成分の探索

E. odoratum の葉部より作製した MeOH 抽出物について、活性を指標に分画を繰り返し行い、EtOAc 可溶部より新規フラボノイド (36 及び 37) を含む 16 種の化合物 (36-51) を単離し、各種スペクトル分析などの詳細な解析によりその化学構造を決定した。

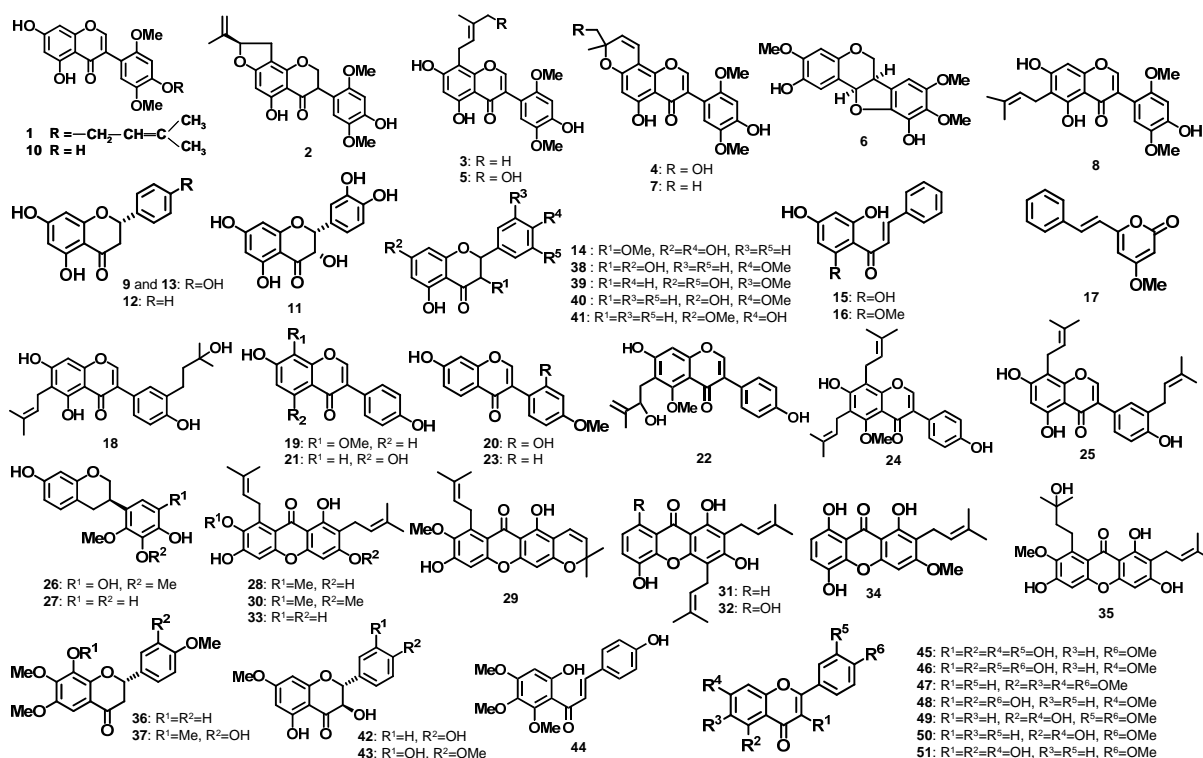


Fig.2 Structures of compounds isolated from *M. brandisiana* (1-11), *C. speciosum* (12-17), *A. colorata* (18-27), *G. mangostana* (28-35), and *E. odoratum* (36-51)

(7) 単離した化合物のDR5プロモーター活性

単離した化合物 (1-51) について DR5 プロモーター活性を評価したところ、化合物 4, 7, 16, 28, 29 及び 31 に顕著な活性が認められた。特に、化合物 16 は 18.5 μ M で未処理群比較し DR5 プロモータ

一活性を 4.1 倍上昇させることが判明した。

(8) TRAIL耐性克服作用

これまでに単離した化合物は、DR5 プロモーター活性をもつことから、TRAIL との併用処理を行うことで、TRAIL 耐性克服作用を示すことが期待される。そこで、比較的強い DR5 プロモーター活性を示した化合物 **4**, **7**, **16**, **28**, **29** 及び **31** について、TRAIL 耐性ヒト胃癌細胞 (AGS 細胞) に対する TRAIL 耐性克服作用を検討した。耐性克服作用は、AGS 細胞に対して、化合物と TRAIL の単独、並びに併用処理を行い、各処理群における細胞生存率を比較することにより評価を行った。その結果、化合物 **4**, **7**, **16** 及び **31** は、各々の化合物単独処理に比べ、TRAIL との併用処理において、細胞生存率の低下が認められた。以上のことから、これらの化合物は DR5 の発現誘導を介して TRAIL 感受性を増強させたものと示唆された。そこで、これらの化合物の中で、化合物 **7** を対象に耐性克服作用のメカニズムについて詳細な検討を行った。

(9) 化合物 **7** の TRAIL 耐性克服作用のメカニズムの検討

AGS 細胞において、化合物 **7** と TRAIL の単独、並びに併用処理を行い、アポトーシス誘導能について、フローサイトメトリー法により評価を行った。Fig. 3 に示すように、各単独処理においては、アポトーシス細胞の割合に大きな変化は認められないが、化合物 **7** と TRAIL の併用処理群のみにおい

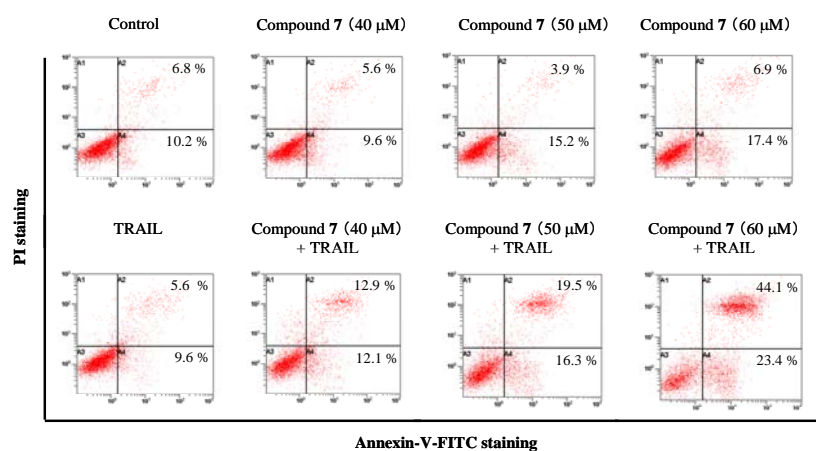


Fig.3 Induction of apoptosis by combination of compound **7** and TRAIL in AGS cells. Cells were treated with 40 to 60 mM of compound **7** and/or 200 ng/mL of TRAIL for 24 h.

て、濃度依存的にアポトーシス細胞の上昇が認め

られた。更に、併用処理におけるカスパーゼ活性について検討を行ったところ、濃度依存的にカスパーゼ 8, 3/7 活性の上昇が認められた。そこで、アポトーシス誘導における DR5 の関与を明らかにするため、DR5 のドミナントネガティブである DR5/Fc キメラタンパクの添加実験を行った。その結果、これらの併用効果は、DR5/Fc キメラタンパクの添加により強く抑制された。更に、化合物 **7** 単独処理による DR5 の mRNA、タンパクについて、リアルタイム-PCR、ウエスタンブロットにより検討を行ったところ、濃度依存的に DR5 の mRNA、タンパク量の上昇が認められた。以上のことから、化合物 **7** は DR5 の発現誘導を介して TRAIL 感受性を増強させ、AGS 細胞の TRAIL 耐性を克服したものと示唆された。更に、併用処理による正常細胞への影響を検討するために、ヒト胎児腎由来細胞 (293T 細胞) について検討を行ったところ、併用処理による細胞生存率の低下は認められなかった。

4. まとめ

DR5 誘導作用をもつ天然物の探索を行い、5 種の植物エキスについて、活性を指標に分画を行い、新規化合物 7 種を含む 51 種の化合物を単離した。また、化合物 **7** は AGS 細胞に対して、TRAIL との併用処理により、DR5 の発現上昇を介し、TRAIL 誘導性アポトーシスを誘導することが明らかになった。また、これらの併用効果は、正常細胞に対しては認められないことから、腫瘍細胞選択性は保持されているものと推察される。本研究で得られた DR5 の誘導作用をもつ化合物は、腫瘍細胞選択的にアポトーシスを誘導するがん治療薬の補助剤のリードとして期待される。

5. 発表論文

(1) Ohtsuki, T.; Hiraka, T.; Kikuchi, H.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Sakai, T.; Ishibashi, M. "Flavonoids from *Eupatorium odoratum* with death receptor 5 promoter enhancing activity" *Heterocycles* **2009**, *77*, 1379-1388.