

令和元年6月18日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08311

研究課題名(和文)腫瘍細胞に選択的細胞死誘導活性を示す(S)-エリポエギンKの作用機構

研究課題名(英文) Mechanism of (S)-erypoeigin K having tumor cell-specific cytotoxicity

研究代表者

金田 典雄 (Kaneda, Norio)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：00144139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はポリピアデイゴの樹皮からヒトの白血病に有効なイソフラボン化合物を単離し、(S)-エリポエギンKと命名している。この化合物はヒト正常リンパ球に対してはほとんど作用を示さないことから、がん細胞に特異的である。また胃がん細胞を皮下に移植したマウスに(S)-エリポエギンKを腹腔内投与したところ、がんの増殖は有意に抑制され、その作用は従来の抗がん剤の一つである5-フルオロウラシルと同等またはより強力であった。(S)-エリポエギンKはがん細胞の分裂に関与する酵素を阻害していることが示唆され、本化合物は新しい抗がん剤の開発に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本人の死因の3分の1はがんであることから、新しい抗がん剤の開発は社会的に重要な課題である。我々は植物に含まれる抗がん活性を有する化合物の中から、(S)-エリポエギンKというイソフラボン化合物を発見した。本化合物はヒト白血病や胃がん細胞に対して有効で、その作用機構は細胞の分裂に関与する酵素の阻害であることが示唆された。本研究は新規の抗がん剤を開発するための基本化合物となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We isolated an isoflavone from stem bark of *Erythrina poeppigiana* which is effective against human leukemia and gastric cancer cells. The isoflavone named as erypoeigin K shows cancer-specific activity because it showed very weak toxicity toward human normal lymphocytes. Erypoeigin K also showed anti-tumor activity, when administered intraperitoneally, against the tumor-bearing mouse with a xenograft of human gastric cancer cells. The growth inhibitory effect on tumor cells was comparable or stronger than that of 5-fluorouracil, one of the typical anti-tumor agents. We found that erypoeigin K can inhibit the enzyme activity which is involved in cell division in the cell cycle. It was suggested that erypoeigin K may be a useful and effective lead compound for the development of new anti-tumor drugs.

研究分野：薬学

キーワード：抗腫瘍活性物質 イソフラボン ヒト白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオキサラーゼ I (GLO-I) は古くから知られる酵素であるが、近年、抗がん剤の新たな標的分子として特に注目を集めている。従来の抗がん剤は、分裂の盛んな正常細胞にも作用するため強い副作用が発現したり、長期使用によって薬剤耐性株が出現するなどの問題がある。近年の分子標的薬においても、同様に薬剤耐性の獲得や高い生産コストなど、課題も多い。

これまでに抗腫瘍活性を示す多くの植物由来天然化合物が単離・構造決定されており、研究代表者らもヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 に対するアポトーシス誘導活性を指標に、いくつかの新規化合物を同定している¹⁾。しかし、多くは腫瘍細胞特異性が見られないなど、現状では有効な抗腫瘍活性を有するシード化合物の発見には至っていない。

一般に腫瘍細胞内は嫌氣的で、エネルギー代謝は解糖系に大きく依存している (Warburg 効果)。その結果、腫瘍細胞では解糖系副産物であるメチルグリオキサール (MG) の産生が亢進する。MG は分子内にアルデヒド基とケトン基を持ち、タンパク質の糖化や DNA への架橋を引き起こすなど、極めて細胞毒性が強く、アポトーシスを誘導する²⁾。これに対して腫瘍細胞は自らを守るための解毒機構として GLO-I を発現誘導し、還元型グルタチオンの存在下、MG を無毒な乳酸に変換している。

そこで本研究では、GLO-I を特異的に阻害することで、腫瘍細胞に MG を蓄積させ、アポトーシスを誘導するような新規の分子標的薬の開発をめざした。

2. 研究の目的

研究代表者らはこれまでにポリピアデイゴ *Erythrina poeppigiana* 樹皮より、GLO-I 阻害活性を有するイソフラボンであるエリポエギン K を単離・構造決定している。植物中のエリポエギン K はラセミ体として存在し、かつ含量は極めて微量である。また、(S)-エリポエギン K は HL-60 細胞に対して強力なアポトーシス誘導活性を示すが、(R)-エリポエギン K はそのような作用を全く示さないことを明らかにしている。さらに、エリポエギン K は正常細胞のヒト末梢血リンパ球に対する細胞死誘導作用は弱く、腫瘍細胞選択性がある。したがって、(S)-エリポエギン K はがんに対する新しい分子標的薬のシード化合物となる可能性がある。

本研究では、(S)-エリポエギン K の種々の造血器腫瘍や固形腫瘍細胞に対する作用を明らかにするとともに、マウス個体における腫瘍縮小、延命効果について明らかにする。また GLO-I 以外にも想定される細胞内標的タンパク質を同定し、エリポエギン K による細胞死誘導機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) (S)-および(R)-エリポエギン K の調製は、キラルカラムによる分離では効率が悪いので、共同研究先の信州大学繊維学部浅尾直樹教授に各光学異性体の合成を依頼した。

(2) 腫瘍細胞として、HL-60 以外に B 細胞性リンパ腫細胞株、T 細胞性リンパ腫細胞株などの種々のヒト造血器腫瘍に対するエリポエギン K の細胞死誘導活性 (細胞生存率) を MTS アッセイにより評価し、アポトーシスであるかどうかの評価はカスパーゼ 3 の活性測定により行った。

(3) *in vivo* における抗腫瘍活性は、ヒト胃がん細胞株 GCIY をヌードマウス皮下に移植し、移植後 1 週間目から、(S)-および(R)-エリポエギン K (10 mg/kg body weight) またはポジティブコントロールとして 5-フルオロウラシル (10 mg/kg body weight) を腹腔内投与し、腫瘍サイズを測定することにより評価した。

(4) 標的タンパク質の同定には、エリポエギン K のイソフラボン骨格 B 環のフェノール性 OH

基は反応性が高いことを利用して、(S)-および(R)-体にそれぞれエポキシ化磁気ビーズを反応させ、エリポエギン K 固定化アフィニティービーズを作成した。また光親和性小分子固定化法を用いて、(S)-および(R)-エリポエギン K 固定化アフィニティービーズを作成した。いずれの場合も HL-60 細胞から細胞抽出液を調製し、エリポエギン K 固定化アフィニティービーズを反応させ、洗浄後、遊離型エリポエギン K で溶出し、SDS-PAGE/銀染色法により、結合タンパク質を検出した。これとは別のアプローチとして、標的タンパク質同定のための「文科省分子プロファイリング支援事業」の細胞パネルの増殖解析による分子プロファイリングの支援を受けた。これにより、39 種類のがん細胞パネルに対する(S)-エリポエギン K の感受性プロファイルを求め、標的分子が既知の各種化合物のプロファイルと比較した。

4. 研究成果

(1) 本研究計画の申請段階では、分取型キラルカラムを用いて光学異性体を分離することを想定していたが、多額の費用を要することから不斉合成を行うこととした。合成には約 1 年を要したが、イソフラボンであるゲニステインを出発材料として不斉触媒による合成と再結晶を繰り返し、グラム単位で光学純度 96% 以上の各光学異性体を得ることに成功した。

(2) これらを用いて、HL-60 細胞以外に各種の B 細胞性リンパ腫細胞株に対する細胞死誘導活性を評価した。その結果、B 細胞性リンパ腫細胞株 DHL-4、DHL-10、Raji 細胞では細胞死が引き起こされたが、アポトーシスではなかった。このことからエリポエギン K による細胞死誘導作用は細胞依存的に異なることが示された。

(3) エリポエギン K の *in vivo* における抗腫瘍効果を検討するため、ヌードマウス皮下に胃がん細胞株 GCIY を移植し、(S)-および(R)-エリポエギン K を投与したところ、(S)-体では、(R)-体に比べて有意に腫瘍組織の増殖抑制効果が見られた。この腫瘍増殖抑制効果は、5-フルオロウラシルと同等かそれ以上であった。

(4) 大腸菌で発現・精製したヒト GLO-I に対して(S)-および(R)-エリポエギン K が酵素活性を特異的に阻害するかどうか検討したところ、意外なことに(S)-体および(R)-体で阻害活性に差は見られなかった。このことは HL-60 細胞内に(S)-エリポエギン K に特異的な標的タンパク質の存在することが強く示唆された。

(5) 標的タンパク質の探索を行うため、アフィニティービーズを作成するための予備実験を行った。その結果、フェノール性水酸基をアルキル基で修飾すると HL-60 に対する細胞死誘導活性が消滅してしまった。そこで別の光親和性小分子固定化法を試みた。この方法ではリガンド分子のランダムな位置でアフィニティービーズと反応すると考えられる。これを用いて HL-60 細胞抽出液中の標的タンパク質を探索したが、(S)-および(R)-エリポエギン K で有意に差のあるタンパク質バンドを検出することはできなかった。

(6) そこで平成 30 年度文科省分子プロファイリング支援事業の細胞パネルの増殖解析による分子プロファイリングの支援に応募した。その結果、(S)-エリポエギン K は既知の抗がん剤の一つと類似のプロファイルを示し、かつより低濃度で有効であることが示唆された。このことは、(S)-エリポエギン K がより有効な抗がん剤のリード化合物となる可能性を示している。現在、この酵素活性を(S)-エリポエギン K が特異的に阻害するかどうか検討中である。

引用文献

Murata T. *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 58, 975- 980 (2006), Murata T. *et al.*, J. Pharm. Pharmacol. 60, 385-389 (2008) 他

5 . 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計4件)

Arthorn Loisruangsin, Kiyomi Hikita, Norikazu Seto, Masatake Niwa, Yoshiaki Takaya, Norio Kaneda
Structural analysis of the inhibitory effects of polyphenols, (+)-hopeaphenol and (-)-isohopeaphenol, on human SIRT 1
BioFactors 査読あり 45, 253-258 (2019)

Kiyomi Hikita, Norikazu Seto, Yusuke Takahashi, Ayako Nishigaki, Yuya Suzuki, Tomiyasu Murata, Arthorn Loisruangsin, Nanik Siti Aminah, Yoshiaki Takaya, Masatake Niwa, Norio Kaneda
Effect of resveratrol dimers and tetramers isolated from Vitaceous and Dipterocarpaceous plants on human SIRT1 enzyme activity
Natural Product Communications 査読あり 13, 1531-1534 (2018)

Kiyomi Hikita, Natsuki Hattori, Aya Takeda, Yuko Yamakage, Rina Shibata, Saori Yamada, Kuniki Kato, Tomiyasu Murata, Hitoshi Tanaka, Norio Kaneda
Potent apoptosis-inducing activity of erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, against human leukemia HL-60 cells
Journal of Natural Medicines 査読あり 72, 260-266 (2018)

疋田清美、田中 齋、村田富保、金田典雄
ポリピアデイゴ (*Erythrina poeppigiana*) から単離されたイソフラボン化合物 erypoeigin K のヒト白血病細胞株 HL-60 に対する強いアポトーシス誘導活性
名城大学総合研究所紀要 査読なし 第23号 p.199-202 (2018)

〔学会発表〕(計8件)

疋田清美、瀬藤 愛、溝口 葵、松岡健太、三枝聡実、村田富保、浅尾直樹、田中 齋、金田典雄
イソフラボン(S)-erypoeigin K によるヒト白血病細胞株 HL-60 に対するアポトーシス誘導機序の解明 日本薬学会第139年会 2019年

佐藤公亮、疋田清美、岡部有里、村田富保、高谷芳明、丹羽正武、金田典雄
植物由来レスベラトロールオリゴマーの白血病細胞株 HL-60 の細胞増殖に対する効果 第91回日本生化学会大会 2018年

鈴木千晴、瀬藤 愛、杉山実咲季、疋田清美、村田富保、浅尾直樹、加藤國基、田中 齋、金田典雄
(S)-erypoeigin K によるヒト白血病細胞株 HL-60 に対するアポトーシス誘導活性 第64回日本薬学会東海支部大会 2018年

Norio Kaneda Biological study on the phytochemical compounds with anti-inflammatory and apoptosis-inducing activities 第8回南京・名古屋・瀋陽薬学シンポジウム 2018年

Aoi Mizoguchi, Kenta Matsuoka, Kiyomi Hikita, Tomiyasu Murata, Yoshiaki Takaya, Masatake Niwa, Norio Kaneda Apoptosis-inducing activity of resveratrol oligomers from plants against human leukemia HL-60 cells 第8回南京・名古屋・瀋陽薬学シンポジウム 2018年

疋田清美、杉山実咲季、村田富保、浅尾直樹、加藤國基、田中 齋、金田典雄
(S)-erypoeigin K の HL-60 細胞に対するアポトーシス誘導活性 第90回日本生化学会大会 2017年

外山 葵、疋田清美、村田富保、浅尾直樹、加藤國基、田中 齊、金田典雄 ヒト急性前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 における Doxorubicin または Cytarabine と(S)-erypoeigin K の併用効果 日本薬学会第 137 年会 2017 年

Kiyomi Hikita, Tomiyasu Murata, Hitoshi Tanaka, Kuniki Kato, Norio Kaneda Erypoeigin K, an isoflavone isolated from *Erythrina poeppigiana*, has potent anti-proliferative activity against human leukemia HL-60 cells 第 7 回名古屋・南京・瀋陽薬学シンポジウム 2016 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：グリオキサラーゼ I 阻害剤及びその利用
発明者：金田典雄、田中 齊
権利者：(学)名城大学
種類：特許
番号：第 6281837 号
取得年：2018 年
国内外の別：国内

〔その他〕

金田典雄 抗がん剤シード化合物としてのイソフラボン誘導体 (R)-, (S)-erypoeigin K の合成
文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業 分子・物質合成プラットフォーム
平成 28 年度シンポジウム

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：村田 富保
ローマ字氏名：Murata Tomiyasu
所属研究機関名：名城大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：80285189

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：疋田 清美
ローマ字氏名：Hikita Kiyomi

研究協力者氏名：今西 進
ローマ字氏名：Imanishi Susumu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。