

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08346

研究課題名(和文) AMPKを標的とした天然物由来難治がん治療薬シーズの探索とその併用効果

研究課題名(英文) Search for new natural products with anticancer potential in targeting with AMPK, and their combination effects with metformin

研究代表者

三巻 祥浩 (Mimaki, Yoshihiro)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90229790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マメ科 *Glycyrrhiza uralensis* 種子から単離されたフラボノイド誘導体 isoschaftoside が HepG2 細胞に対して、2 mM の濃度で有意に AMPK 活性化を示すことを明らかにした。メトホルミンにイレイセンエキスを添加すると、メトホルミンの細胞毒性が増強した。その細胞毒性は AMPK 阻害剤を添加すると、有意に減弱した。イレイセンの基原植物の一つである *Clematis mandshurica* の根および根茎の成分探索を行った結果、1 種の新規化合物を含む 6 種のトリテルペン配糖体が単離された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治がんの克服を目的とし、天然物を対象とした系統的な AMPK 活性化物質の探索研究は、国内外を含め未開拓の研究分野である。本研究課題のように、AMPK に着目した漢方系生薬の活性スクリーニングはこれまでにほとんど例がなく、天然からの新規抗がん剤シーズの探索研究としては新たな試みである。HepG2 ヒト肝がん細胞を用いたスクリーニングの結果、イレイセンエキスはメトホルミンの細胞毒性を増強させた。この結果は、AMPK 活性化を介した新しいタイプの抗がん剤シーズの発見の端緒となることが期待される研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Flavone C-glycosides (1-7) were isolated from *Glycyrrhiza uralensis* seeds for the first time. Isoschaftoside (3) significantly enhanced the AMPK activity in HepG-2 human hepatoma cells at a sample concentration of 2 mM. On the other hand, apigenin 6,8-di-C-L-arabinopyranoside (1) tended to activate AMPK in an inversely dose-dependent manner in HepG-2 cells. As a result of our systematic screening for an increasing cytotoxic effect of metformin by combination of a crude drug extract on HepG-2 cells, the addition of a *Clematis Radix* extract to metformin was found to enhance the cytotoxicity of metformin against HepG-2 cells. When the AMPK inhibitor was added to the mixture of a *Clematis Radix* extract and metformin, the combination cytotoxic effect decreased. Phytochemical investigation of the roots and rhizomes of *Clematis mandshurica* led to the isolation of six triterpene glycosides, including one new compound.

研究分野：生薬・天然物化学

キーワード：AMPK isoschaftoside HepG-2 細胞 細胞毒性 メトホルミン イレイセン *Clematis mandshurica*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

AMPK (AMP-activated protein kinase) はセリン/スレオニンキナーゼの1種で、細胞内のエネルギーセンサーとしての役割を担っているが、多くのがん細胞でその活性が抑制されている。AMPK は、1) がん細胞で亢進している嫌気性解糖系(ワールブルク効果)を阻害する、2) p53 ががん抑制遺伝子を活性化する、3) スタチン系薬剤と同様に HMG-CoA 還元酵素を阻害し、コレステロールの合成、糖タンパクの合成、GTP 結合タンパクのイソプレニル化を抑制する、4) mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) 活性を阻害し、細胞増殖や血管新生を抑制するなどの作用を有することから、AMPK の活性化を介したがん細胞の増殖抑制やアポトーシスの誘導が期待される。事実、ピグアナイド系2型糖尿病治療薬のメトホルミンは、LKB1/AMPK 経路などの活性化を介して腫瘍細胞に対しアポトーシスやオートファジー型の細胞死を誘導し、さらに後ろ向きコホート研究の結果、膵臓がん患者の生存期間を有意に延長することが報告されている [De Souza, A. *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **77**, 235-242 (2016); Snima, K. S. *et al.*, *Curr. Cancer Drug Targets*, **14**, 727-736 (2014) など]。天然物では、ベルベリン [Yu, R. *et al.*, *Cancer Cell Int.*, **14**:49, 2014]、オレアノール酸 [Nie, H. *et al.*, *Cell Biol. Int.*, **40**, 770-778 (2016)]、パイクレイン [Kim, H. J. *et al.*, *Drug Dev. Res.*, **77**, 73-86 (2016)]、レスベラトロール [Zhang, J. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **86**, 317-328 (2013)] などに、AMPK の活性化を介したヒト腫瘍細胞の増殖抑制活性が報告されている。

しかしながら、メトホルミンは2型糖尿病治療薬であるうえ、肝・腎機能障害のある患者や高齢者に対する使用が制限されており、がん患者へどこまで適用できるかは未知である。また、現在までに報告されている天然物由来物質の AMPK 活性化を介した抗腫瘍活性はあまり強いものではなく、研究素材はよく知られている既知の天然物に限られている。したがって、AMPK の活性化を標的とした抗腫瘍活性天然物の探索研究は、ほとんど未着手といえる。

2. 研究の目的

本研究では、申請者の現在までの研究実績を基盤に、AMPK を活性化する天然物由来物質を探索し、それらの膵臓がん細胞をはじめとする難治がん細胞に対する直接的な細胞毒性と作用メカニズムを評価するとともに、強い腫瘍細胞毒性を有するステロイド配糖体や強心ステロイド、ヒガンバナ科アルカロイドなどとの併用効果、さらには既存の抗がん剤との併用効果を検討する。難治がん治療薬のシーズ探索および併用効果を目的に、天然物を対象とした系統的かつ本格的な AMPK 活性化物質の探索研究は、国内外を含めこれが初めての例となる。以上、本研究は天然資源からの新規抗がん剤の探索研究として、新たな試みと考えられる。

3. 研究の方法

1) 抽出・分離・精製

生薬、薬用植物、ハーブ抽出物について、多孔質ポリスチレン樹脂 (Diaion HP-20[®])、シリカゲル、ODS を充填したカラムクロマト、分取 HPLC など、各種クロマトグラフィーを駆使して常法により活性成分を単離した。

2) 構造決定

高分解能 MS による分子式の決定、NMR (¹H NMR、¹³C NMR、1D selective TOCSY、¹H-¹H COSY、HMQC、HMBC、HSQC-TOCSY、2D TOCSY、NOESY、ROESY など) の解析による平面構造ならびに相対立体配置の決定、既知化合物への誘導や Mosher 法による絶対立体配置の決定を行っ

た。

3) 活性評価

AMPK活性化の評価

1次抗体として rabbit anti-phospho AMPK、2次抗体として anti-rabbit IgG-HRP を用いた ELISA 法により評価した。生薬、薬用植物などの抽出エキス、分離後の粗画分、単離した化合物などの AMPK 活性化作用を評価した。

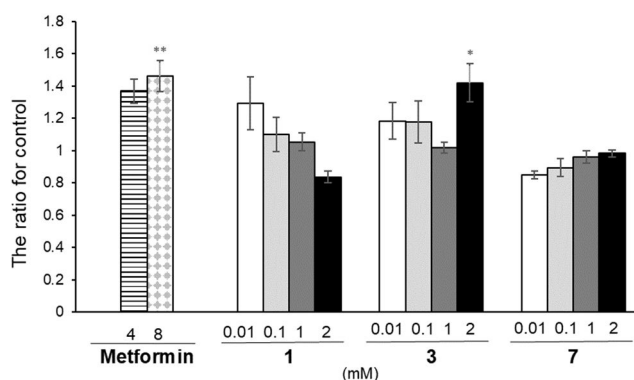
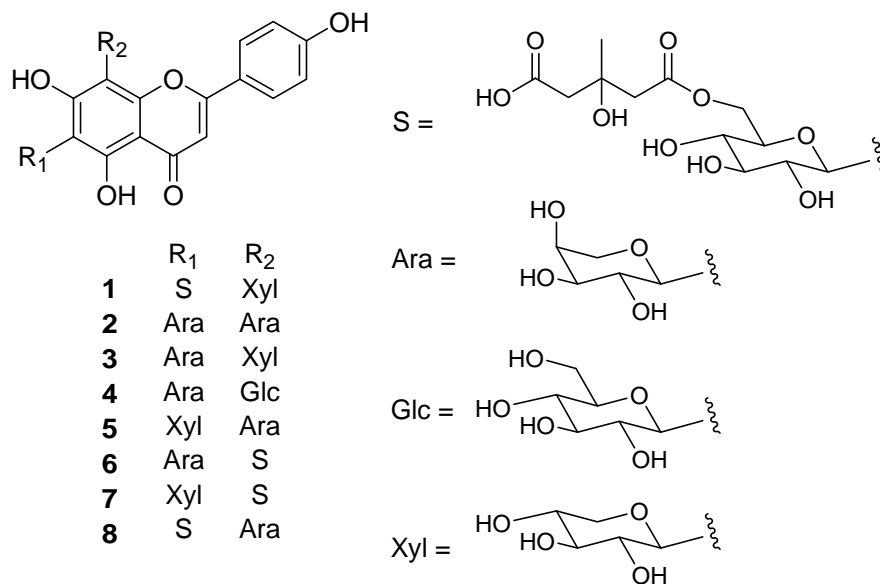
細胞毒性の評価

HepG2 ヒト肝がん細胞に対する細胞毒性は、MTT アッセイやトリパンブルー染色などの常法により評価した。

4. 研究成果

1) マメ科 *Glycyrrhiza uralensis* 種子から単離したフラボノイドの AMPK 活性化作用 (図 1)

マメ科 *Glycyrrhiza uralensis* 種子から単離したフラボノイド誘導体 5 種について、HepG2 ヒト肝がん細胞における AMPK 活性化を ELISA 法により評価した。その結果、apigenin 6-C- α -L-arabinopyranoside 8-C- β -D-glucopyranoside (isoschaftoside) (3) は、2 mM の濃度で有意に、HepG2



Effects of **1**, **3**, **7** (0.01, 0.1, 1, 2 mM), and metformin (4, 8 mM) on AMPK activity in HepG-2 cells
AMPK activity was expressed as the fold induction compared with control treatment. Data are represented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ** $p < 0.01$ vs. control, * $p < 0.1$ vs. control

細胞に対して AMPK を活性化した。一方、apigenin 6,8-di-C- α -L-arabinopyranoside (1) は、低い濃度である 0.01 mM の方が、2 mM よりも強い AMPK 活性化作用を示すという知見を得た。

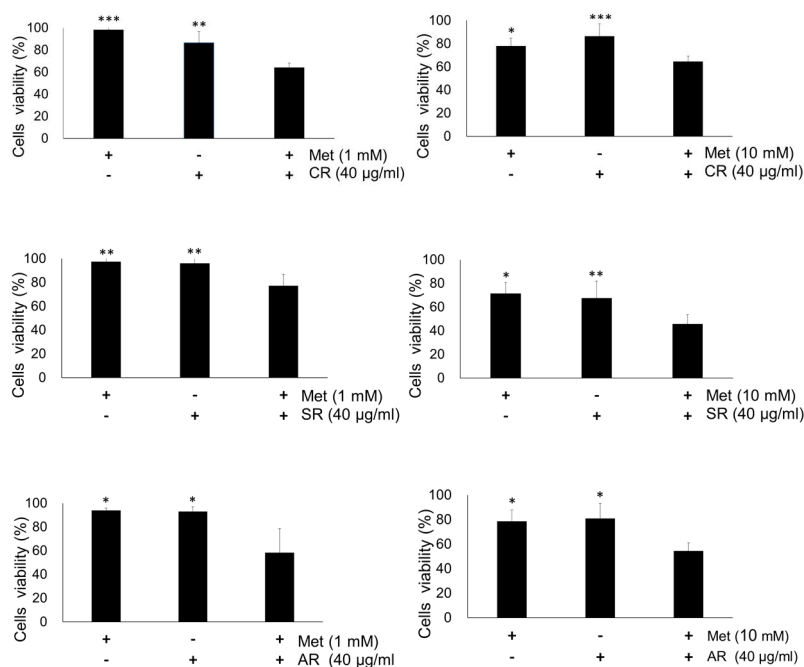
2) オオキンケイギク頭花から単離したフラボノイドの AMPK 活性化作用

さらに、AMPK 活性化作用を有するフラボノイドを得ることを目的として、フラボノイドが豊富に含まれていることが予想されるキク科オオキンケイギク *Coreopsis lanceolata* 頭花 (乾燥重量 270 g) のメタノール抽出エキス (70 g) を調製し、成分分離を行った。その結果、5 種のカルコン類、3 種のフラバノン類、3 種のフラボン類、1 種のキナ酸誘導体、1 種のピフラボノイドを単離し、各種スペクトルデータにより絶対配置も含めて構造を決定した。このうち 2 種 (5 および 14) は新規化合物であった。HepG2 細胞を用いて、オオキンケイギク頭花メタノール抽出エキスおよび Diaion HP-20 カラムのエタノール溶出画分 (各 100 μ g/mL) 単離された化合物 0.1、1.0、10 μ M) の AMPK 活性化作用を ELISA 法により評価したが、いずれも AMPK 活性化作用を示さなかった。

3) 生薬のスクリーニング、およびイレイセンとメトホルミンの併用効果 (図 2、3)

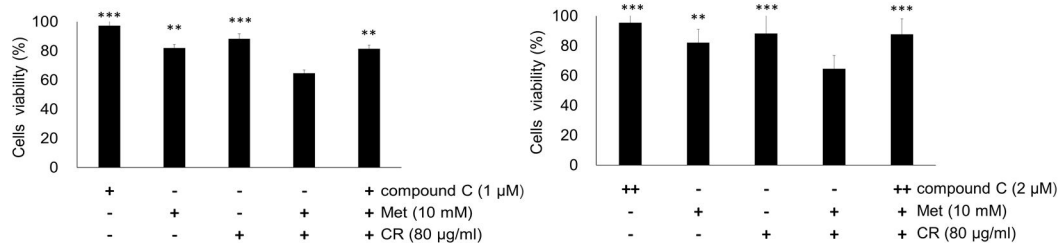
漢方系生薬 40 種のエタノール抽出エキスについて、メトホルミンの HepG2 細胞に対する細胞毒性の増強効果を MTT 法によりスクリーニングした。

その結果、3 種の生薬エキス、イレイセンエキス (CR)、オウゴンエキス (SR)、ビャクジュツエキス (AR) は、メトホルミンの細胞毒性を増強することが確認された。次に、CR とメトホルミンの併用処理群に AMPK 阻害剤 (dorsomorphin: 1.0、2.0 μ M) を添加すると、細胞毒性は有意に減弱した。したがって、CR によるメトホルミンの細胞毒性増強効果は AMPK 活性化が関与していることが示唆された。



Effect of metformin (Met) (1, 10 mM), ethanol extract of Clematidis Radix (CR) (40 μ g/mL), Scutellaride Radix (SR) (40 μ g/mL), Atractylodis Rhizoma (AR) (40 μ g/mL), and the mixture of Met and each crude drug extract on cell viability in HepG2 cells

Data are presented as the mean values \pm S.E.M. ($n = 3$). Significantly different from the mixture of Met and each crude drug extract: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$



Effect of metformin (Met) (10 mM), ethanol extract of *Clematidis Radix* (CR) (80 μg/mL), dorsomorphin (compound C) (1, 2 μM), the mixture of Met and CR, and the mixture of Met, CR and dorsomorphin on cell viability in HepG2 cells

Data are represented as the mean values ± S.E.M. ($n = 3$). Significantly different from the mixture of Met and CR: *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$

図 3

メトホルミン単独、および CR とメトホルミンで併用処理した HepG2 細胞を青色蛍光色素 DAPI で染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、アポトーシス細胞に特徴的な細胞の萎縮・核クロマチンの凝集が認められた。

イレイセンの基原植物の一つである *Clematis mandshurica* 根および根茎 (10 kg) を MeOH で抽出し、得られた MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、5 個の粗画分に分画した。それらのうち、50% MeOH 溶出画分の成分分離を行い、トリテルペン配糖体、セスキテルペン配糖体、リグナンを単離した。現在、単離された化合物の AMPK 活性化を測定中である。

以上、*Glycyrrhiza uralensis* 種子から AMPK 活性化作用のあるフラボノイド配糖体を見出した。また、イレイセンエキス、オウゴンエキス、ビャクジュツエキスがメトホルミンの細胞毒性を増強させることを見出した。イレイセンの基原植物 *C. mandshurica* 根および根茎の成分研究の結果、AMPK 活性化成分の候補物質として新たにトリテルペン配糖体を単離した。本研究成果は、AMPK 活性化を標的とした新たながん化学療法の端緒になりうるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsuo Y., Iguchi T., Kuroda M., Ishigura M., Takatori K., Nara T., Mimaki Y.	4. 巻 74
2. 論文標題 Flavone C-glycosides from the seeds of <i>Glycyrrhiza uralensis</i> and the effect of AMPK activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Jpn. J. Pharmacog.	6. 最初と最後の頁 108-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本憲哉、小笠原里歩、松尾侑希子、深谷晴彦、三巻祥浩
2. 発表標題 Juniperus horizontalisの化学成分 (2)
3. 学会等名 日本生薬学会 第64回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野崎智椰、中川実香、松尾侑希子、深谷晴彦、稲葉二郎、三巻祥浩
2. 発表標題 生薬ゴシュユの生活習慣病治療薬のシーズ探索研究
3. 学会等名 第62回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤井拓也、木村優花、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究 (1) オオキンケイギク頭花の化学成分とaldose reductase阻害活性について
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村優花、藤井拓也、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、横須賀章人、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究 (2) ナガエツルノゲイトウ地下部の化学成分と生物活性について
3. 学会等名 第63回 日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奈良拓郎、青木証行、松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 漢方系生薬とメトホルミンの併用効果
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野愛実、青木証行、高取和広、小黒愛理、松尾侑希子、横須賀章人、三巻祥浩
2. 発表標題 漢方系生薬エキスとメトホルミンの併用効果およびキンポウゲ科 <i>Clematis mandshurica</i> 根及び根茎の化学成分
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤宏直、木村優花、藤井拓也、三宅克典、黒田明平、松尾侑希子、横須賀章人、三巻祥浩
2. 発表標題 特定外来植物からの医薬品シーズの探索研究 (3) ナガエツルノゲイトウ地下部およびオオキンケイギク頭花の成分研究
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	横須賀 章人 (Yokosuka Akihito) (20318190)	東京薬科大学・薬学部・准教授 (32659)	
研究 分担者	松尾 侑希子 (Matsuo Yukiko) (70434016)	東京薬科大学・薬学部・講師 (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------