

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06735

研究課題名(和文)植物由来ステロイドをモチーフとした新規がん分子標的治療薬シーズの探索

研究課題名(英文)Discovery of the seeds for novel cancer molecular-targeted agents from plant-derived steroid compounds

研究代表者

横須賀 章人 (Yokosuka, Akihito)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20318190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規がん分子標的治療薬シーズを見出すことを目的に、植物由来ステロイドに着目し、キンポウゲ科、イネ科、キョウチクトウ科などの植物から、新規化合物を含む50種のステロイドおよびステロイド化合物を単離・構造決定した。それら化合物のうち、キンポウゲ科Helleborus属植物から単離されたステロイド化合物は、ヒト培養腫瘍細胞に対して既存の抗がん剤よりも強い細胞毒性を有し、ヒト白血病細胞に対して細胞分裂期(G2/M期)で細胞周期を停止させるとともに、ミトコンドリアを介した経路でアポトーシスを誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在まで細胞毒性メカニズムの詳細が明らかにされていない植物由来のステロイド化合物に着目して、既存の抗がん剤の問題点を克服する医薬シーズの探索研究に着手した。本研究により、腫瘍細胞に対して細胞分裂期で細胞周期を停止する傾向を示すと同時にアポトーシスを誘導する新規植物由来ステロイドを見出した。それらの化合物は、ヒト腫瘍細胞の細胞分裂期のがん細胞に作用する新規がん分子標的治療薬シーズとして今後の研究の展開が期待され、学術的意義や社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fifty steroidal compounds including new compounds were isolated from Ranunculaceae, Poaceae, and Apocynaceae plants for the purpose of searching for new seed compounds of cancer molecular-targeted agents. Among them, steroidal compounds isolated from the genus Helleborus (Ranunculaceae) had potent cytotoxicity to human cancer cells, and induced apoptosis by a mitochondrial mediated pathway and arrested cell cycle progression in G2/M phase in human leukemia cells.

研究分野：抗腫瘍活性天然物の探索研究

キーワード：ステロイド がん分子標的 アポトーシス ミトコンドリア 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 天然物から開発されたビンカアルカロイドなどの微小管作用薬は、現在も抗がん剤として臨床で用いられているが、細胞周期の静止期の正常細胞にも作用するため、重篤な副作用の発現や薬剤耐性の問題があり、細胞分裂期のがん細胞に特異的に作用する治療薬が望まれている。

(2) 高等植物から新規抗腫瘍活性成分を探索する研究の過程で、主に観賞用として用いられるユリ科 *Ornithogalum saundersiae* から単離されたステロイド配糖体やキンボウゲ科 *Helleborus foetidus* から単離された強心ステロイドが、ヒト培養腫瘍細胞に対して強力な細胞毒性を示すとともに、微小管作用薬の特徴である細胞分裂期 (G2/M 期) でヒト腫瘍細胞の細胞周期を停止させることを明らかにした。これまでに、細胞分裂期の微小管形成を作用点とする植物由来ステロイド化合物の報告は少なく、細胞毒性メカニズムの詳細も検討されていないことから、植物由来のステロイド化合物に着目し、ヒト腫瘍細胞の細胞分裂期のがん細胞にのみ作用する新規がん分子標的治療薬シーズを探索することは意義があると考えられた。

(3) 近年、細胞分裂期の紡錘体形成の調節因子として、TACC3 や  $\gamma$ -チューブリンが見出されているが、それらを作用点とする化合物の抗がん剤としての臨床応用には至っていない。植物由来ステロイド化合物の細胞分裂期の紡錘体形成に關与する標的分子に着目した研究への展開に興味を持たれた。

## 2. 研究の目的

本研究では、植物由来のステロイド化合物に着目し、ヒト腫瘍細胞の細胞分裂期のがん細胞に特異的に作用する新規がん分子標的治療薬シーズを見出すことを目的とする。本研究により見出されたステロイド系化合物は、微小管作用薬に耐性を示したがん細胞に対して細胞毒性を有し、がん細胞選択的に細胞毒性を有することが考えられ、臨床応用に向けたがん分子標的治療薬シーズに繋がること期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物エキスのヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価

ステロイド化合物を含むことが推定されるキンボウゲ科、イネ科、キョウチクトウ科などの植物のアルコール抽出エキスについて、ヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価を行う。

### (2) 植物由来ステロイド化合物の単離・構造決定

腫瘍細胞として HL-60 ヒト前骨髄性白血病細胞、A549 ヒト肺腺がん細胞、SBC-3 ヒト肺小細胞がん細胞を用いた。それらの腫瘍細胞に対して細胞毒性が認められた植物エキスについて、細胞毒性スクリーニングを指標に、多孔質ポリスチレン樹脂 (Diaion HP-20)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS を充填したカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC などを用いて分離・生成を行い、活性成分を単離する。単離された化合物について、高分解能 MS により分子式を決定し、各種 NMR スペクトル ( $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、 $1\text{H}-^1\text{H}$  COSY、HSQC、HMBC、TOCSY、NOESY、ROESY など) の解析により平面構造および相対立体配置を決定する。それらの NMR スペクトルを中心とした解析と化学的手法をあわせ、単離された化合物の構造を絶対立体配置を含めて決定する。

### (3) 植物由来ステロイド化合物の細胞毒性およびアポトーシス誘導活性の評価

単離・構造決定された化合物の、HL-60 細胞、A549 細胞、SBC-3 細胞に対する細胞毒性試験を MTT 法により行い、腫瘍細胞選択的な細胞毒性を評価する。アポトーシス誘導活性は、HL-60 細胞を用い、細胞の蛍光顕微鏡による形態観察、断片化 DNA の観測、caspase-3 活性化の確認により評価する。また、ミトコンドリアを經由するアポトーシス誘導であるか否かをミトコンドリア膜電位の変化と cytochrome *c* のミトコンドリアから細胞質への放出の確認により評価する。

### (4) 細胞分裂期に作用するステロイド化合物の探索

細胞分裂期に作用する化合物のスクリーニングを、細胞周期解析により行う。HL-60 細胞に対して細胞毒性の認められたステロイド化合物で一定時間処理した HL-60 細胞を、70% EtOH で膜透過処理を行い、ヨウ化プロピジウムで DNA を染色した。その後、フローサイトメトリーにより細胞内 DNA 含量の変化を確認した。

## 4. 研究成果

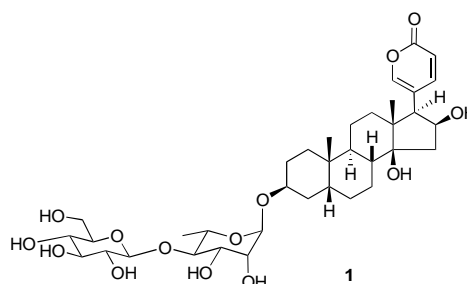
### (1) 植物エキスのヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価

ステロイド化合物を含むことが推定される 3 種のキンボウゲ科 *Helleborus* 属植物 (*H. lividus*、*H. niger*、*H. foetidus*)、1 種のイネ科植物 (*Avena sativa*)、1 種のキョウチクトウ科植物 (*Trachelospermum asiaticum*) を研究材料として用いた。これら植物のメタノール抽出エキスと、抽出エキスを多孔質ポリスチレン樹脂で分画した粗画分について、HL-60 細胞および A549 細胞に対する細胞毒性を評価した結果、全ての植物の抽出エキスに細胞毒性が認められた。

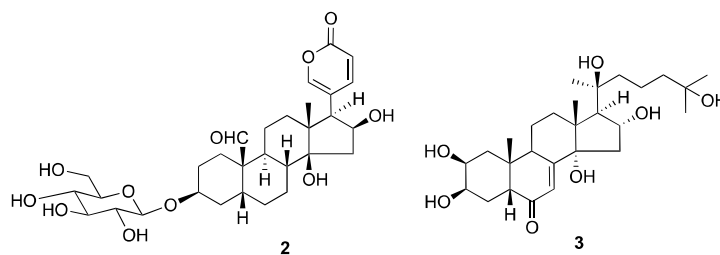
### (2) 植物由来ステロイド化合物の単離・構造決定と細胞毒性の評価

腫瘍細胞に対して細胞毒性が認められた植物エキスについて、同活性を指標にカラムクロマトグラフィーや分取 HPLC を駆使し、以下に示すステロイド化合物を単離・構造決定した。

キンボウゲ科 *H. lividus* から、新規ブファジェノリド配糖体 5 種、新規ブファジェノリド誘導体 2 種を含む計 10 種の化合物を単離・構造決定した。単離された化合物は、いずれも HL-60 細胞および A549 細胞に対して強力な細胞毒性を示した ( $IC_{50}$  0.0022  $\mu$ M - 0.77  $\mu$ M)。本植物より単離された新規ブファジェノリド配糖体 1 は、HL-60 細胞および A549 細胞に対して強い細胞毒性を示した ( $IC_{50}$  0.021  $\mu$ M、0.018  $\mu$ M)。化合物 1 で処理した HL-60 細胞に、核クロマチンの凝集と、アガロースゲル電気泳動における DNA の断片化が確認され、caspase-3 の活性化を示したことから、1 は HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示された。さらに、1 で処理した HL-60 細胞ではミトコンドリア膜電位の消失と、cytochrome *c* のミトコンドリアから細胞質への放出が認められたことから、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが確認された。



キンボウゲ科 *H. niger* から新規ブファジェノリド配糖体 2 種、新規ブファジェノリド誘導体 1 種、新規エクジステロン誘導体 1 種を含む計 8 種のステロイド化合物を単離・構造決定した。単離された化合物のうち 6 種の化合物は、HL-60 細胞、A549 細胞、SBC-3 細胞に対して細胞毒性を示した ( $IC_{50}$  0.0055  $\mu$ M - 1.9  $\mu$ M)。本植物より単離された新規ブファジェノリド配糖体 2 と新規エクジステロン誘導体 3 で処理した HL-60 細胞には、核クロマチンの凝集と caspase-3 の活性化が確認されたことから、2 と 3 は HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導することが示された。さらに、2 と 3 で処理した HL-60 細胞の細胞周期を解析した結果、細胞分裂期 (G2/M 期) で細胞周期を停止する傾向が認められるとともに、アポトーシス細胞に特徴的な sub-G1 細胞の増加が確認された。



イネ科 *A. sativa* から新規フロスピロスタン配糖体 2 種、新規プレグナン配糖体 2 種、新規コレスタン配糖体 1 種、新規フロスタン配糖体 1 種を含む計 12 種のステロイド化合物を単離・構造決定した。単離された化合物のうち、新規フロスピロスタン配糖体 4 は、HL-60 細胞に対して細胞毒性を示し ( $IC_{50}$  0.79  $\mu$ M)。4 で処理した HL-60 細胞には、核クロマチンの凝集と、アガロースゲル電気泳動における DNA の断片化が確認され、caspase-3 の活性化が確認された。さらに、4 で処理した HL-60 細胞ではミトコンドリア膜電位の消失と、cytochrome *c* のミトコンドリアから細胞質への放出が認められたことから、4 は HL-60 細胞に対して、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが確認された。

そのほかに、キンボウゲ科 *H. foetidus* から新規スピロスタン配糖体 20 種、新規フロスタン配糖体 1 種を含む計 28 種のステロイド化合物を、キョウチクトウ科 *Trachelospermum asiaticum* から 2 種のプレグナン配糖体を単離・構造決定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yokosuka Akihito, Inomata Mina, Yoshizawa Yuka, Iguchi Tomoki, Mimaki Yoshihiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Bufadienolides and ecdysteroids from the whole plants of <i>Helleborus niger</i> and their cytotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 393 ~ 402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-021-01481-6	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 -

1. 著者名 Iguchi Tomoki, Yokosuka Akihito, Tamura Naoya, Takano Shingo, Mimaki Yoshihiro	4. 巻 176
2. 論文標題 Bufadienolide glycosides and bufadienolides from the whole plants of <i>Helleborus lividus</i> , and their cytotoxic activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112415 ~ 112415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2020.112415	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 -

1. 著者名 Iguchi Tomoki, Yokosuka Akihito, Kawahata Riko, Andou Madoka, Mimaki Yoshihiro	4. 巻 172
2. 論文標題 Bufadienolides from the whole plants of <i>Helleborus foetidus</i> and their cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112277 ~ 112277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2020.112277	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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉澤 由佳、猪俣 美菜、横須賀章人、三巻 祥浩
2. 発表標題 キンボウゲ科植物の化学成分（36） <i>Helleborus niger</i> 全草から単離されたステロイド誘導体の構造と腫瘍細胞毒性
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 猪俣 美菜, 横須賀章人, 井口 巴樹, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンポウゲ科Helleborus nigerから単離されたステロイド誘導体の構造と腫瘍細胞毒性
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 竜野 暁, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 コンズランゴから単離されたプレグナン配糖体の構造と腫瘍細胞毒性
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横須賀章人, 猪俣 美菜, 井口 巴樹, 三巻 祥浩
2. 発表標題 Helleborus nigerから単離された化合物の腫瘍細胞毒性とアポトーシス誘導活性
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪俣 美菜, 横須賀章人, 井口 巴樹, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンポウゲ科植物の化学成分(35) Helleborus niger全草から単離されたステロイド誘導体の腫瘍細胞毒性とアポトーシス誘導活性
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井口 巴樹, 黒田 明平, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 高等植物由来新規ステロイド系化合物の構造とアポトーシス誘導活性
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 高野 真吾, 井口 巴樹, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンボウゲ科植物の化学成分 (29) <i>Helleborus lividus</i> 全草の bufadienolides の構造と細胞毒性
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高取 和広, 井口 巴樹, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンボウゲ科植物の化学成分 (30) <i>Helleborus</i> 属植物から単離されたステロイド誘導体のアポトーシス誘導活性
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 剛士, 石原 慧太, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 <i>Avena sativa</i> 全草より単離された新規ステロイド配糖体の化学構造
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井口 巴樹, 黒田 明平, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 高等植物由来ステロイド系化合物の構造と腫瘍細胞毒性
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪俣 美菜, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンボウゲ科植物の化学成分(31) Helleborus niger全草から単離された新規bufadienolide誘導体の構造と腫瘍細胞毒性
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井口 巴樹, 内田 優香, 高野 真吾, 高取 和広, 横須賀章人, 三巻 祥浩
2. 発表標題 キンボウゲ科植物の化学成分(32) Helleborus foetidus 全草から単離された新規ステロイド配糖体の構造
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学薬学部漢方資源応用学教室ホームページ  
<https://www.ps.toyaku.ac.jp/kanposhigen/>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------