

平成21年2月27日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007~2008

課題番号:19710180

研究課題名(和文)天然物を基盤とした腫瘍選択的アポトーシス誘導剤の探索研究

研究課題名(英文)Studies on death receptor 5 inducing natural products of tropical medicinal plants

研究代表者

氏名(ローマ字):大槻 崇(OHTSUKI TAKASHI)

所属機関・部局・職:千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号:30401011

研究成果の概要:

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, TRAIL 受容体のうち DR5 の発現を誘導する化合物の探索を天然物(天然医薬資源)を対象に行った. 強い活性が認められた 7 種の植物から, 新規化合物 9 種を含む 59 種の化合物を単離した. また, 単離した化合物のうち cardamomin 及び 4'-demethyltoxicarol isoflavone は, TRAIL 耐性細胞に対して DR5 の発現上昇を通じて TRAIL 耐性を克服することが判明した.

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,000,000	0	2,000,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野:複合新領域

科研費の分科・細目:生物分子科学・生物分子科学

キーワード:天然物有機化学、TRAIL、DR5、アポトーシス、天然化合物

## 1. 研究開始当初の背景

アポトーシスはネクローシス(壊死)による細胞死とは大きく異なり, 原則的に炎症反応を伴わず生体への侵襲がほとんどない. 従って, がん細胞にアポトーシスを誘導できれば副作用を低減したがん治療が可能となり, アポトーシスは抗がん剤開発の重要な標的機構となっている. これまでにアポトーシスを誘導する薬剤は, 既存

の化学療法剤を含め多数報告されているが, その効果は必ずしも腫瘍選択的ではない. 従って, 腫瘍選択的かつ副作用の小さい有効な新規抗がん剤の開発が求められており, 腫瘍選択的なアポトーシス誘導剤の研究の意義は非常に大きい.

## 2. 研究の目的

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に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。これまでの研究から、デスレセプターの一つである DR5 (Death Receptor 5/TRAIL-R2) の発現量の上昇が、TRAIL に対する感受性を高めることが明らかにされている。従って、DR5 の発現量を増強する化合物は、TRAIL に対する感受性を高め、TRAIL 耐性を克服することが可能と考えられる。またこのような化合物は、副作用を低減した新たながん化学療法の実現に大きく貢献できると考えられる。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。

## 3. 研究の方法

DR5 誘導作用は、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した。

## 4. 研究成果

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 100  $\mu$ g/mL で DR5 プロモーター活性 (=DR5 誘導活性) を 2 倍以上上昇させることが確認された。このうち、強い活性が認められた *Millettia brandisiana* (キク科), *Catimbiium speciosum* (ショウガ科), *Ehretia microphylla* (ムラサキ科), *Kaempferia galanga* (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 7 種を試料として選択し活性成分の探索を行った。その結果、新規イソフラボノイド Brandicianin A-F (1-6), 新規イソフラボノイド coloratanin A (7), 新規フラボノイド (2S)-8-hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone (8), (2S)-3'-hydroxy-6,7,8,4'-tetramethoxyflavone (9) の 9 種を含む計 59 種の化合物を単離し、その化学構造を明らかにした。

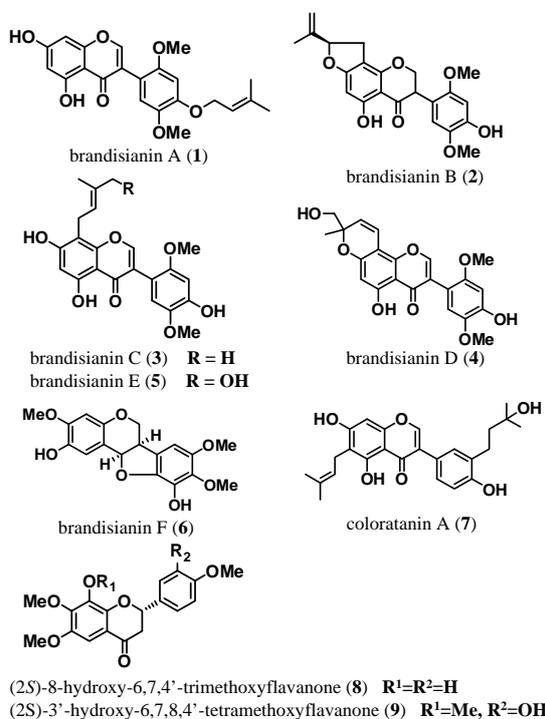


Fig.1 New compounds isolated from *Millettia brandisiana*(1-6), *Ardisia colorata* (7), and *Eupatorium odoratum* (8 and 9)

また、単離した化合物のうち、18 種は未処理群と比較して DR5 プロモーター活性を有意に上昇させることが判明した。特に、*Catimbiium speciosum* より単離した cardamomin (10)は、TRAIL 耐性 DLD1 細胞に対して TRAIL 併用時の耐性克服作用をもつことが判明した。これは、cardamomin が DR5 の発現上昇を通じて TRAIL 耐性 DLD1 細胞の TRAIL への感受性を高め、TRAIL 誘導性アポトーシスを増強したものと示唆された。また、*Millettia brandisiana* より単離した 4'-demethyltoxicarol isoflavone (11)の TRAIL 耐性克服の作用機序について検討したところ、TRAIL 耐性細胞である AGS 細胞に対して濃度依存的に DR5 の mRNA、タンパク量の発現を上昇させることが判明した。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により、11 と TRAIL との併用効果が強く抑制されたことから、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。

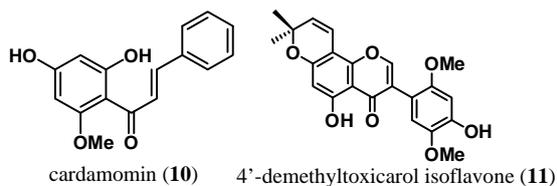


Fig.2 Chemical structures of cardamomin (10) and 4'-demethyltoxicarol isoflavone (11)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 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(査読有).

- ② Kikuchi, H.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Sakai, T.; Ishibashi, M. "Death receptor 5 targeting activity-guided isolation of isoflavones from *Millettia brandisiana* and *Ardisia colorata* and evaluation of ability to induce TRAIL-mediated apoptosis" *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1181-1186(査読有).
- ③ Ohtsuki, T.; Tamaki, M.; Toume, K.; Ishibashi, M. "A novel sesquiterpenoid dimer parviflorene F induces apoptosis by upregulating the expression of TRAIL-R2 and a caspase-dependent mechanism" *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1756-1763 (査読有).
- ④ M. Ishibashi and T. Ohtsuki, "Studies on Search for Bioactive Natural Products Targeting TRAIL Signaling Leading to Tumor Cell Apoptosis" *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 688-714(査読有).
- ⑤ Kikuchi, H.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Sakai, T.; Ishibashi, M. "Brandisianins A-F, isoflavonoids isolated from *Millettia brandisiana* in a screening program for death-receptor expression enhancement activity" *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1910-1914(査読有).

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① 菊地博之, 大槻崇, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 酒井敏行, 石橋正己, "デス受容体誘導作用をもつ天然物の探索:新規イソフラボン等の単離とTRAIL耐性克服作用", 第 17 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2008 年10月29日, 福岡.

- ② T. Ohtsuki, H. Kikuchi, T. Sakai, and M. Ishibashi, "Studies on natural constituents inducing expression of death receptor 5", 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 29 日, 名古屋.
- ③ F. Ahmed, 大槻崇, 会田渉, 石橋正己, "TRAIL 耐性克服作用をもつ放線菌由来の天然物探索 II", 日本生薬学会第 55 年会, 2008 年 9 月 20 日, 長崎.
- ④ 大槻崇, 菊地博之, 平賀敬人, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 酒井敏行, 石橋正己, "熱帯植物由来のデスレセプター誘導作用をもつ天然物の探索", 日本生薬学会第 55 年会, 2008 年 9 月 20 日, 長崎.
- ⑤ 大槻崇, 菊地博之, 酒井敏行, 石橋正己, "熱帯植物由来のデスレセプター誘導作用をもつ天然物", 第 12 回がん分子標的治療研究会学術総会, 2008 年 6 月 27 日, 東京.
- ⑥ 大槻崇, 菊地博之, 酒井敏行, 石橋正己, "Cardamomin の TRAIL 誘導性アポトーシス増強作用", 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
- ⑦ 菊地博之, 大槻崇, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 酒井敏行, 石橋正己, "*Millettia brandisiana* および *Ardisia colorata* からのデスレセプター誘導作用をもつ天然物の探索", 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
- ⑧ Firoj Ahmed, 大槻崇, 会田渉, 石橋正己, "TRAIL 耐性克服作用をもつ放線菌由来の天然物探索", 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
- ⑨ 宮川高, 大槻崇, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "TRAIL 耐性克服作用を有する天然物の探索", 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
- ⑩ T. Ohtsuki, H. Kikuchi, T. Sakai, and M. Ishibashi, "Studies on death receptor 5

inducing natural products of tropical medicinal plants", 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007 年 10 月 3 日, 横浜.

- ⑪ 菊地博之, 大槻崇, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 酒井敏行, 石橋正己, "*Millettia brandisiana* からのデスレセプター誘導作用を有する天然物の探索", 日本生薬学会第 54 年会, 2007 年 9 月 15 日, 名古屋.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大槻 崇 (OHTSUKI TAKASHI)  
千葉大学大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：30401011

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：