

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16033

研究課題名(和文) ID0-1を分子標的とした天然物由来の難治がん治療薬のシーズ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 ID0-1, and their combination effects with anticancer agents

研究代表者

松尾 侑希子 (Matsuoy, Yukiko)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70434016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：天然物資源からID0-1阻害活性および腫瘍細胞毒性を示す化合物の探索を目的として、植物エキスおよび化合物ライブラリーの活性評価とともに植物エキスの成分分離と単離化合物の構造決定を行った。その結果、薬用植物オニユリの変種で長崎県対馬にのみ分布するオウゴンオニユリから2種、園芸品種のオオツルボから1種、合計3種の活性化合物を見出した。一方、有毒植物ヨウシュヤマゴボウから抗がん剤の毒性を増強させる併用効果をもつ化合物類を見出したが、これらの化合物はID0-1阻害活性を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ID0-1 酵素は、がんの免疫逃避機構に関与していることから、活性阻害によるがん細胞の増殖抑制効果が期待されている。本研究は、難治がんの克服を目的として天然物の系統的な ID0-1 阻害物質の探索を行う初めての例である。成果として、ユリ科植物から3種の新たなID0-1阻害活性物質が見出され、有毒植物からはID0-1阻害活性は示さなかったものの、併用により抗がん剤の活性を強める成分が新たに見出された。これらの成果はメカニズム解明の端緒になるとともに、抗がん剤の治療効果の向上、副作用の軽減、医療費の削減などへの展開が期待できる。植物資源の利活用に繋がる点でも重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)：We conducted screening assay and phytochemical examinations of plant extracts or isolated compounds for the purpose of searching natural compounds with ID0-1 inhibitory activity and cytotoxic activity. As a result, 3 steroidal glycosides have been identified from *Lilium lancifolium* var. *flaviflorum* and *Scilla peruviana*. Furthermore, several compounds have been identified from *Phytolacca americana*. Although the isolated compounds from *P. americana* did not show ID0-1 inhibitory activity, they enhanced the cytotoxicity of etoposide or doxorubicin.

研究分野：生薬学、天然物化学

キーワード：ID0-1 オウゴンオニユリ オオツルボ ステロイド配糖体 併用効果 細胞毒性

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ (IDO-1) は、必須アミノ酸のトリプトファンをキヌレニンに代謝する律速酵素である。IDO-1 は T 細胞の増殖を抑制する免疫抑制因子として、がんの免疫逃避機構に関与していることから、IDO-1 の阻害を介したがん細胞の増殖抑制効果が期待されている。臨床試験では IDO-1 阻害薬エパカドスタットと免疫チェックポイント阻害薬の併用による有意な治療効果が認められている。しかしながら IDO-1 阻害剤の抗腫瘍活性は強いものではなく、単剤での治療効果は認められていない。天然物由来物質では、タデ科タデアイに含まれるインドロキナゾリン環のアルカロイドや、ヒドロ虫類から発見されたナフトキノン誘導体に IDO-1 阻害活性が認められているものの、天然物の探索資源は一部の植物や海洋生物あるいは真菌に限定されている。構造活性相関は、1-メチルトリプトファン の立体異性体やナフトキノン類のアナログ合成が報告されているのみである。以上の様に、IDO-1 阻害活性成分の構造研究は途上であり、抗腫瘍活性天然物の探索研究は断片的である。

2. 研究の目的

申請者はがんと生活習慣病の標的分子を指標に天然物から創薬シーズの探索研究を行ってきた。本研究では現在までの研究実績を基盤に、IDO-1 阻害活性を有する天然物を系統的に探索し、それらの腫瘍細胞毒性を評価するとともに、既存の抗がん剤との併用効果を検討する。インドロキナゾリン型アルカロイドはミカン科、ラン科、キョウチクトウ科植物に、ナフトキノン類は生薬シコンやノウゼンカズラ科植物に、アントラキノンはタデ科、マメ科、ユリ科植物などに含まれる。IDO-1 阻害剤の基礎研究として、これら植物エキスの成分研究は必要不可欠であると考えられる。本研究は天然資源からの新規抗がん剤シーズ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) 植物エキスのスクリーニング

植物エキスおよび漢方エキスの IDO-1 阻害活性を評価する。活性は IDO-1 Inhibitor Screening Assay Kit を用いて評価した。すなわち、96 穴プレート上で酵素反応開始 3 時間後の IDO-1 量を吸光度で定量した。陽性対照として IDO-1 阻害剤エパカドスタットを用いた。

2) 植物エキスの成分探索と単離化合物の構造決定

活性を示した植物エキスについては、同活性を指標に多孔質ポリスチレン樹脂、NH シリカゲルなどの各種クロマトグラフィーを駆使して活性成分を単離する。構造決定は MS、NMR、CD、VCD など各種スペクトルや化学変換、HPLC 分析を用いて糖の絶対配置も含めて決定する。

3) 単離化合物および化合物ライブラリーの IDO-1 阻害活性の評価および構造活性相関の解明

単離した化合物および天然物ライブラリーの IDO-1 阻害活性を評価する。天然物の活性評価の結果をまとめて、構造活性相関に関する知見を得る。

4) 難治がん細胞に対する毒性および併用効果の評価

IDO-1 阻害活性を示した化合物および漢方薬については、ヒト肺がん (SBC-3、A549)、ヒト膵臓がん (MIA Paca-2)、ヒト肝がん (HepG2)、ヒト腎臓がん (Caki-1)、ヒト口腔扁平上皮がん (HSC-2)、ヒト舌扁平上皮がん (HSC-4) など難治がん細胞に対する毒性を評価する。さらに IDO-1 阻害活性を示した化合物および漢方薬エキスと既存の抗がん剤 (エトポシド、シスプラチン、ドキシソルビシンなど) との併用効果を評価し、難治がん治療薬のシーズを見出す。細胞毒性は MTT 法、トリパンブルー法などで評価する。併用効果は Combination Index 値が 0.5 以下の場合、併用効果ありとする。

4. 研究成果

1) ユリ科オウゴンオニユリから単離したステロイド配糖体の IDO-1 阻害活性 (図 1)

オウゴンオニユリ *Lilium lancifolium* var. *flaviflorum* は、長崎県の対馬にのみ分布するユリ科ユリ属の植物であり、オニユリの変種である。オニユリは日本薬局方において、そのりん片葉をビャクゴウの基原植物に規定され、フェニルプロパノイド誘導体やステロイド配糖体が報告されている一方、オウゴンオニユリの鱗茎の成分研究は全く行われておらず、含有成分は明らかにされていない。そこでオウゴンオニユリ鱗茎の成分探索を行ったところ、4 種の新規化合物を含む、3 種のフェニルプロパノイド誘導体、3 種のプロスピロスタノール配糖体、4 種のコレスタノール配糖体、5 種のスピロスタノール配糖体、2 種のプロスタノール配糖体を単離し構造を決定した。単離化合物の IDO-1 阻害活性を評価した結果、2 種のステロイド配糖体 (LLF-11、LLF-14) が IDO-1 阻害活性を示した (IC₅₀ 約 100 microM, 70 microM)。これらの化合物は共にアグリコンの 6 位にケトン基、3 位にラムノースとグルコースの二糖を有するスピロスタノール配糖体である。

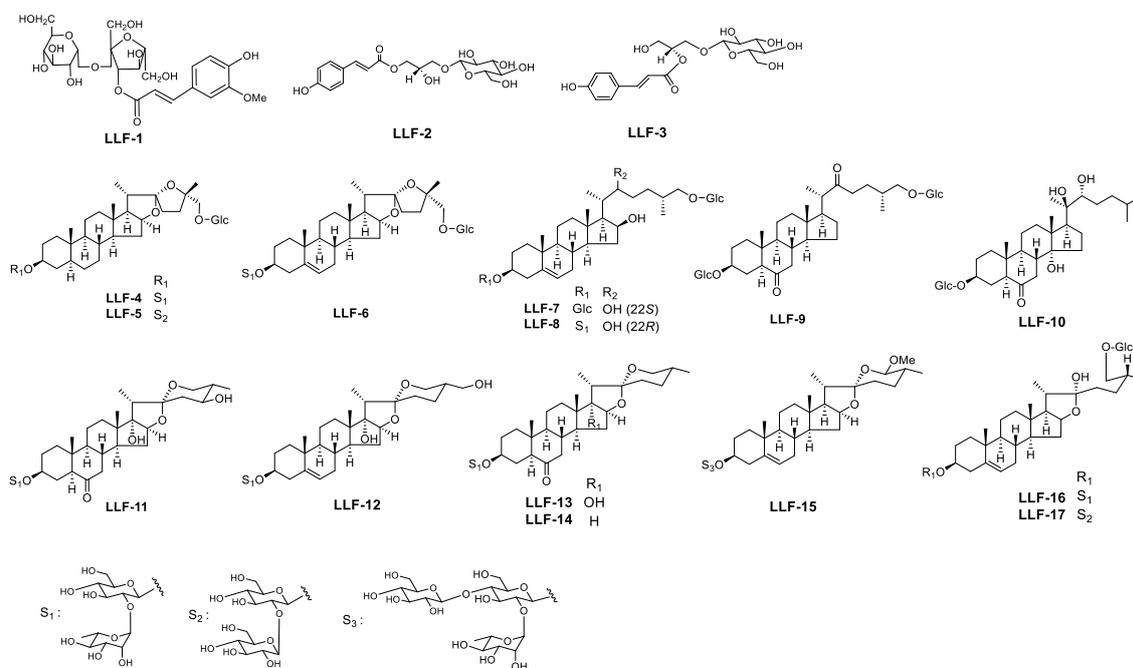


図 1 単離化合物一覧

2) 天然物ライブラリーの IDO-1 阻害活性 (図 2)

1) の研究成果からステロイド配糖体に着目し、天然物ライブラリーの活性を評価した。22 種のトリテルペン配糖体および 15 種のステロイド配糖体の計 37 種のサポニンの IDO-1 阻害活性を評価した。ユリ科植物を中心にゴマノハグサ科、トベラ科、ナス科植物から単離した化合物を選定した。その結果、ユリ科オオツルボ *Scilla peruviana* から単離された 1 種のトリテルペン配糖体が IDO-1 阻害活性を示した (IC₅₀ 50.5 microM)。トリテルペン配糖体は 3 位水酸基に 5 つの糖鎖が結合したラノステロール型トリテルペン配糖体である。

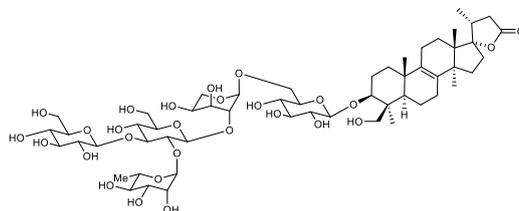


図 2 IDO-1 阻害活性成分

3) ヤマゴボウ科ヨウシュヤマゴボウから単離したトリテルペン配糖体と抗がん剤の併用効果 (図 3)

ヨウシュヤマゴボウ *Phytolacca americana* は有毒植物であり、強い生理活性物質が主要成分として報告されているが、それ以外の詳細な成分研究はなされていない。そこでヨウシュヤマゴボウ地下部の成分探索を行ったところ、新規化合物 1 種を含む 13 種のトリテルペン配糖体を単離し構造を決定した。十分な収量が得られた単離化合物について、SBC-3 ヒト肺がん細胞および TIG-3 肺正常細胞に対する毒性を評価したところ、いずれも弱い毒性を示した (IC₅₀ 15-30 microM)。次に、弱い毒性を示したトリテルペン配糖体について、抗がん剤ドキシソルビシンおよ

びエトポシドの SBC-3 細胞に対する細胞毒性の増強効果を MTT 法により評価した。その結果、モノデスモシド配糖体 **1** はドキソルビシンの細胞毒性を増強し、ビスデスモシド配糖体 **8** はエトポシドの細胞毒性を増強した。残念ながら、これらトリテルペン配糖体は IDO-1 阻害活性を示さなかった。

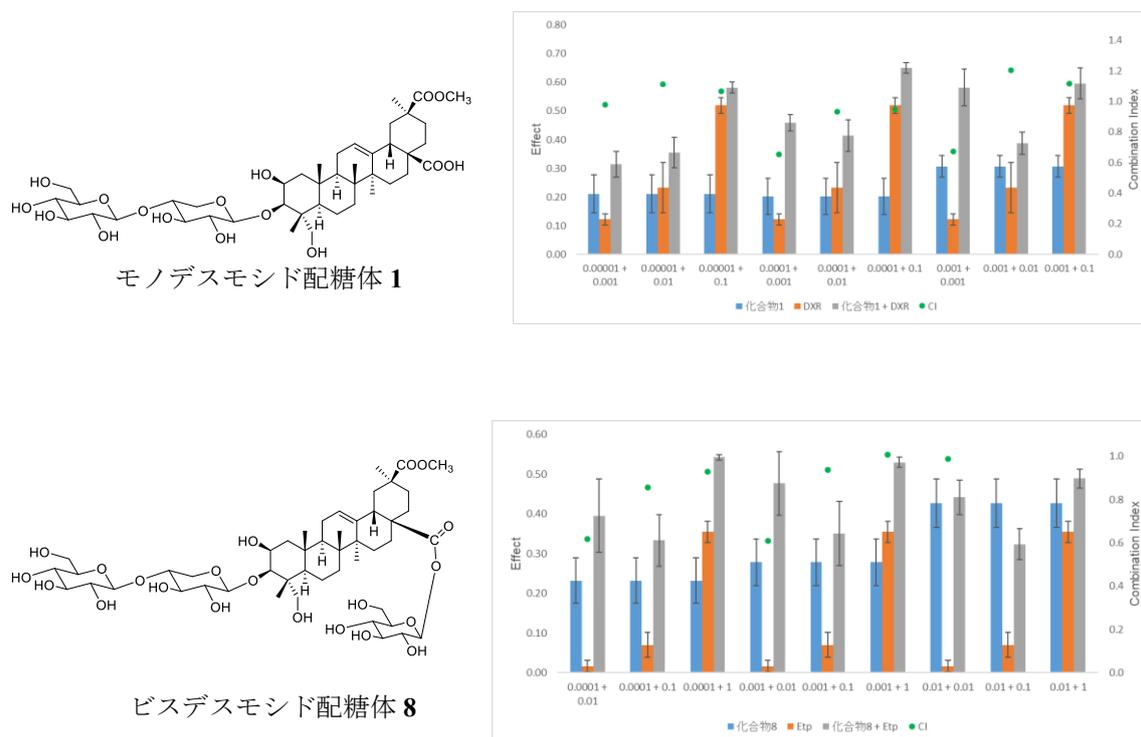


図3 トリテルペン配糖体と抗がん剤の併用効果

以上、2種のステロイド配糖体および1種のトリテルペン配糖体に IDO-1 阻害活性を見出した。サポニン類の IDO-1 阻害活性の報告は本研究が初めてである。なお、漢方エキスの IDO-1 阻害活性のスクリーニングを実施したものの、今回は活性を示す漢方エキスが見いだせなかったため、代わりに研究が当初の計画どおりに進まない時の対応として天然物ライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、トリテルペン配糖体に IDO-1 阻害活性を見出すことができた。サポニン類の IDO-1 阻害活性にはアグリコンのカルボニル基が関与している可能性が示唆されるが、今後のさらなる研究が必要である。また、抗がん剤ドキソルビシンおよびエトポシドとそれぞれ併用効果を示す 2 種のトリテルペン配糖体を見出した。残念ながらこれらのトリテルペン配糖体には IDO-1 阻害活性は認められなかった。今後メカニズム解析を進める。本研究成果は、IDO-1 阻害活性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 1件）

1. 著者名 Yukiko Matsuo, Hiroko Tsuchihashi, Kazuhiro Takatori, Haruhiko Fukaya, Minpei Kuroda, Yoshihiro Mimaki	4. 巻 122
2. 論文標題 Cytotoxic triterpene and steroidal glycosides from the seeds of <i>Digitalis purpurea</i> and the synergistic cytotoxicity of steroidal glycosides and etoposide in SBC-3 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bioorg.2022.105697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayame Kobayashi, Yoh Noguchi, Motokuni Nakajima, Ryota Morikawa, Yukiko Matsuo, and Masako Takasu
2. 発表標題 Molecular Dynamics Simulation of the Complex of PDE5 and Evodiamine
3. 学会等名 XXXII IUPAP Conference on Computational Physics（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾 侑希子, 三巻 祥浩
2. 発表標題 生物活性を指標としたがんと生活習慣病の治療薬のシーズ探索研究
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山寺 祐輔, 松尾 侑希子, 三宅克典, 三巻 祥浩
2. 発表標題 ユリ科植物の化学成分 (92) オウゴンオニユリ <i>Lilium lancifolium</i> var. <i>flaviflorum</i> の化学成分について (1)
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 彩芽, 野口 瑤, 森河 良太, 松尾 侑希子, 高須 昌子
2. 発表標題 PDE5 とエボジアミン複合体の MD シミュレーション
3. 学会等名 日本物理学会2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松尾 侑希子
2. 発表標題 天然物を由来とするステロイド系化合物からの新規抗がん剤シーズの探索研究
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中三鈴、土橋寛子、高取和広、三宅克典、松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 トベラPittosporum tobira葉の新規トリテルペン配糖体と細胞毒性
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 松尾侑希子、三巻祥浩
2. 発表標題 がん治療薬のシーズ化合物の探索研究～ステロイド系化合物を中心に～（シンポジウム）
3. 学会等名 第39回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松尾侑希子、黒田明平、三巻祥浩
2. 発表標題 ジギタリス種子由来の新規ステロイド系化合物の構造と細胞毒性
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 諸喜田すず、田中三鈴、松尾侑希子、三宅克典、三巻祥浩
2. 発表標題 トベラ科トベラPittosporum tobira 葉の化学成分とID01阻害活性
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松尾 侑希子、三巻 祥浩	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」2022年12月臨時増刊号 漢方薬・生薬研究の最前線 臨床応用を主眼として	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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