

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21603012

研究課題名（和文） ホヤ由来アルカロイドの抗炎症活性、抗癌活性の発現機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the mechanisms of anticancer and anti-inflammatory activities of alkaloids from ascidians

研究代表者

浪越 通夫 (NAMIKOSHI MICHIO)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30189196

研究成果の概要（和文）：

インドネシア産群体ボヤ由来の抗がん物質リソクリバディンは、がん細胞のアポトーシス（細胞の自殺：プログラムされた細胞死）に重要なタンパク質であるカスパーゼの活性を促進してがん細胞にアポトーシスを起こさせることが分かった。沖縄県西表島産の海綿からがん細胞のアポトーシスを誘導するアルカロイドを2種類単離した。インドネシア産単体ボヤのアルカロイド成分 DDMG-1 が示す TNF- $\alpha$ （リウマチやがんなどで過剰に産生されることが知られている）の産生抑制活性の分子機構を明らかにした。インドネシア産の軟体サンゴ（ソフトコーラル）から、TNF- $\alpha$  の産生を抑制する物質3種類を単離した。

研究成果の概要（英文）：

Lissoclibadins, anticancer alkaloids isolated from an Indonesian colonial ascidian, induced an apoptosis (programmed cell death) to cancer cells by increasing the activity of caspases, important proteins for the induction of an apoptosis. Two alkaloids were isolated from a sponge collected in Iriomote Is., Okinawa as cytotoxic components, which induced an apoptosis to cancer cells. DDMG-1, an alkaloid isolated from an Indonesian solitary ascidian, decreased the production of TNF- $\alpha$ , an inflammatory cytokine that over produced in rheumatism and cancer, and the molecular mechanism of action was elucidated. Three components, which inhibited the production of TNF- $\alpha$ , were isolated from an Indonesian soft coral.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：ホヤ、アルカロイド、抗癌活性、抗炎症活性、生物活性発現機構、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、 $\alpha$ -カルボリン

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は本邦においても死因の第1位であり、有効な抗がん剤の開発は引き続き社

会の大きなニーズとなっている。抗がん作用のターゲットとしては、核酸やタンパク質の合成阻害、有糸分裂阻害、免疫の腑活、血管

新生阻害など多岐にわたるが、我々はがん細胞へのアポトーシスの誘導に焦点を絞った。また、がん細胞では TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインが異常産生され、がんの浸潤や転移などにも関与していると考えられているので、このような炎症性サイトカインの産生に影響を与える化合物の研究も重要な課題である。

TNF- $\alpha$  はまた、関節リウマチやクローン病などの炎症性疾患をはじめ多くの疾病において、その産生が異常に亢進されていることが知られている。最近では、糖尿病との関連も明らかになってきている。TNF- $\alpha$  受容体のミミックなど、TNF- $\alpha$  と受容体との結合を阻害するペプチド・タンパク質が関節リウマチなどの治療薬として利用され、成果をあげている。しかし、これらの薬剤は高価であることと、アナフィラキシーショック、自己免疫疾患、結核などの感染症に対する抵抗力の低下などの重篤な副作用を持つため、有効性の高い低分子の TNF- $\alpha$  産生抑制剤の開発が求められている。また、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインの産生の機構が徐々に明らかにされてきているが、その詳細な分子機構の解明には低分子の阻害物質が分子プローブとしてとても役に立つ。

このような背景から、我々はがん細胞にアポトーシスを誘導する化合物および炎症性サイトカイン、特に TNF- $\alpha$  の産生を抑制する化合物を熱帯・亜熱帯の海洋生物から単離し、活性発現の分子機構の解明を行っている。

## 2. 研究の目的

本研究は、ニシキボヤ（単体ボヤ）から単離した *N,N*-didesmethylgrossularine-1（以下 DDMG-1 と略す、図 1）が示す TNF- $\alpha$  産生抑制活性および群体ボヤ *Lissoclinum cf. badium* から得た *lissoclibadin* 類（Lb 類、図 1 に 1 種類を示した）のアポトーシス誘導のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを第 1 の目標とした。DDMG-1 は天然には稀

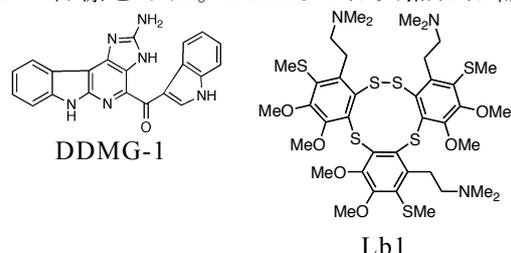


図 1. DDMG-1 と Lb1 の構造  
な  $\alpha$ -carboline 骨格をもつアルカロイドで、同族体は単体ボヤ由来の 3 種類しか知られていない。このような化合物が TNF- $\alpha$

の産生に影響することは知られていなかったもので、活性発現機構や構造-活性相関の解明により新しい知見が得られると期待できる。また、Lb 類は複数の S 原子を含む特異な化合物で、既に 18 種類（未発表を含む）を単離していた。これらの化合物は構造の違いが活性発現に大きな差をもたらす点で興味深い。

### (1) DDMG-1

我々はホヤや海綿から単離した化合物の TNF- $\alpha$  産生に対する影響を調べている。マウスマクロファージ様細胞 RAW 264.7 株をリポポリサッカライド (LPS) で刺激すると TNF- $\alpha$  の産生が誘導される。この培養細胞系に単離した化合物を加えて培養し、ELISA で TNF- $\alpha$  の産生量を定量したところ、DDMG-1 がコントロールよりも低い値を示すことを見いだした。そこで本研究ではまず、DDMG-1 の TNF- $\alpha$  産生抑制活性の分子機構を明らかにすることとした。

### (2) *Lissoclibadin* (Lb) 類

平成 19 年度に JST の「シーズ発掘試験」の資金援助を得て、Lb 類の培養ヒト癌細胞増殖抑制活性とヌードマウスによる抗癌活性（ヒト大腸癌 HCT-15 に対する Lb1 の活性）を検討し、有望な結果を得た。Lb1、Lb8、Lb14 は特に、抗癌剤エトポシドに感受性の低い乳癌細胞や悪性中皮腫細胞に対しても強い活性を示した。この研究の際に、Lb 類で処理した癌細胞において核の凝縮と断片化が認められたことから、Lb 類は癌細胞の（初期）アポトーシスを誘導すると考えた。そこで本研究ではまず、Lb 類によるアポトーシス誘導の鍵となる生体分子（タンパク質）の同定と分子機構の解明を目指した。

### (3) 新しい活性化合物の探索

上記の研究と並行して、がん細胞のアポトーシスを誘導する化合物および TNF- $\alpha$  の産生を抑制する化合物をインドネシアおよび沖縄の海洋無脊椎動物と海洋糸状菌から単離する研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) DDMG-1

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞およびヒト単球系細胞株 THP-1 細胞を用いて、DDMG-1 の TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8 産生に対する影響を ELISA 法で調べた。また、TNF- $\alpha$  の産生を抑制するメカニズムを解明するため、リアルタイム RT-PCR による TNF- $\alpha$  の mRNA 量の変化、ウエスタンブロット、EMSA などによる転写因子 AP-1 と NF- $\kappa$ B の活性および MAP キナーゼカスケードへの影響を調べた。

### (2) リソクリバディン (Lb) 類

① インドネシア産群体ボヤ *Lissoclinum cf.*

*badium* からは、新規 14 種類を含む 18 種類の Lb 類を単離したが、Lb8~Lb14 の 7 種類の構造が確定していなかったため、それらの構造決定を行った。

② Lb1 で処理した細胞をアネキシン V 及びヨウ化プロピディウム (PI) で染色してそれぞれの蛍光を観察し、初期アポトーシスであるかどうかを調べた。また、カスパーゼの阻害剤等を用いて、Lb1 が活性化するカスパーゼの種類を調べた。

③ THP-1 細胞を LPS で刺激し、産生する IL-8 量への Lb1~Lb7 の影響を ELISA で測定した。また、微小管重合阻害剤 rhizoxin の共存下に THP-1 細胞を LPS で刺激して産生される IL-8 量への Lb1~Lb7 の影響を ELISA で測定した。

#### (3) ソフトコーラル *Sarcophyton* sp.

インドネシア産のこのソフトコーラルからは既に 2 種類の新規化合物と既知化合物 2 種類を単離していたが、粗抽出物が示す活性を持たなかったため、活性化合物の単離を行った。LPS で刺激した RAW264.7 細胞および THP-1 細胞を用いて、単離した化合物の TNF- $\alpha$  と IL-8 産生に対する影響を ELISA 法で調べた。また、ウエスタンブロット、EMSA、ルシフェラーゼアッセイなどにより、この生物活性発現機構を検討した。

#### (4) 群体ボヤ *Leptoclinides dubius*

インドネシア産のこのボヤのエタノール抽出物から、新規アルカロイド成分の探索を行った。

#### (5) 海綿 *Haliclona* sp.

沖縄県西表島で採集したこの海綿のエタノール抽出物が、ヒト固形癌細胞に対して非常に強い増殖抑制活性を示し、これらのがん細胞のアポトーシスを誘導していると推定されたため、がん細胞増殖抑制活性化合物の単離を行った。また、単離した化合物の培養ヒト癌細胞株に対する増殖抑制活性の検討ならびに蛍光染色・顕微鏡観察による核の形態変化の検出およびフローサイトメトリーによる細胞周期の分析を行った。

#### (6) 炎症性サイトカイン産生系に影響を示すその他の海洋天然物

炎症性サイトカイン産生系のアッセイを行うための予備検定として、13 種類の単離海洋天然物についてチャイニーズハムスター V79 細胞のコロニー形成に対する影響を調べた。V79 アッセイで活性を示した化合物について、LPS で刺激した RAW 264.7 細胞および THP-1 細胞から培養上清中に分泌される炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$  と IL-8) の量を ELISA 法で定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) DDMG-1

DDMG-1 は、LPS 刺激した RAW264.7 細胞における TNF- $\alpha$  と IL-6 の産生を抑制した。

このとき、TNF- $\alpha$  の mRNA の産生、NF- $\kappa$ B の標的 DNA への結合および I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解を阻害した。また、LPS 刺激した THP-1 細胞によるヒト型 TNF- $\alpha$ 、IL-1b、IL-6 および IL-8 の産生を抑制した。THP-1 細胞においても、DDMG-1 は NF- $\kappa$ B の活性化および mRNA の発現を抑制する効果を示した。よって、DDMG-1 は関節リウマチやクローン病などの治療を目的とした抗炎症剤のモデル化合物として有用であることが分かった。DDMG-1 自体の活性はあまり強くないが、この化合物をリードとして、より有効性の高い医薬品候補の開発が期待される。

#### (2) リソクリバディン (Lb) 類

① *L. cf. badium* から単離した 14 種類の新規 Lb 類のうち、Lb1~Lb7 の構造は既に発表していたが、Lb8~Lb14 の構造は確定していなかった。スペクトルデータとコンピューターによるコンフォメーション解析によってこれらの構造を明らかにした結果、Lb8 は特異な 4 量体構造を持っていることが分かった。Lb9 は Lb1 と同様に、3 量体構造であった。また、Lb8 と Lb14 (図 2) は非常に強いがん細胞増殖抑制活性を示し、その活性は最も強い Lb1 と同等であった。

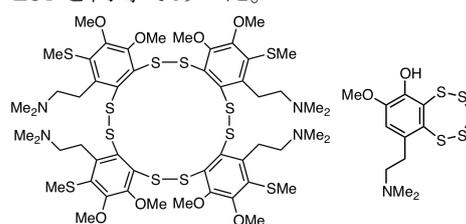


図 2. Lb8 (左) と Lb14 (右) の構造

② Lb1 処理により、アネキシン V 陽性細胞が時間依存的に増加し、12 時間後には 54% に達した。全カスパーゼ阻害剤による処理により、アポトーシスは完全に抑制された。また、カスパーゼ 9 の特異的阻害剤は、同 8 の特異的阻害剤よりも強くアポトーシスを抑制した。以上のことから、Lb 類はカスパーゼの活性化を介してがん細胞のアポトーシスを誘導していることが分かった。

③ 炎症性サイトカインの産生に対する影響を調べた結果、Lb1~Lb3、Lb5、Lb6 は 1 および 3  $\mu$ M において LPS 単独および RX 共存刺激のいずれにおいても、THP-1 細胞からの IL-8 産生を抑制した。一方、同条件下で Lb4 と Lb7 は逆に、IL-8 の産生を誘導した。同一実験条件下で異なる挙動を示すという作用の違いがどのような要因によるのかが、次の興味ある課題である。

#### (3) ソフトコーラル *Sarcophyton* sp.

このソフトコーラルから新たに、LPS 刺激した RAW264.7 細胞における TNF- $\alpha$  の産生を抑制する化合物を 3 種類単離した。残念ながら、いずれも既に発表されている

lobohedleolide、(7Z)-lobohedleolide、denticulatolideと一致したが、活性発現機構を検討した結果、NF- $\kappa$ B活性を阻害することによりTNF- $\alpha$ の産生を抑制することが分かった。また、3種類のうちlobohedleolideのみがLPS刺激したRAW264.7細胞からのIL-8産生を促進し、他の2種類は全く影響を与えなかった。LobohedleolideはNF- $\kappa$ B活性を阻害するが、IL-8のプロモーター活性を誘起することにより、IL-8の産生を増大させた。二重結合の立体の違い(lobohedleolideと(7Z)-lobohedleolide)がこれらの活性に大きな影響を与えていることが明らかである。一方、LPS刺激したTHP-1細胞におけるIL-8産生では、lobohedleolideは弱い誘導活性しか示さなかった。

#### (4) 群体ボヤ *Leptoclinides dubius*

各種クロマトグラフィーを繰り返すにより、このボヤから3種類のアルカロイドを単離した。スペクトルデータの解析と化学反応による誘導体の作製、あるいは分解反応により、各化合物の構造を決定した結果、2種類が新規化合物であったので、leptoclinidamideおよび(-)-leptoclinidamine B(図3)と命名した。生物活性の詳細については現在検討中である。

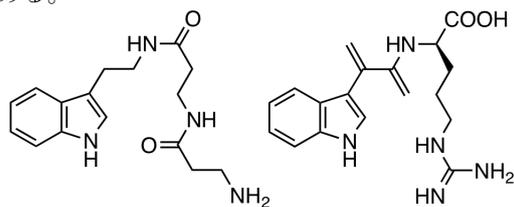


図3. leptoclinidamideと(-)-leptoclinidamine Bの構造

#### (5) 海綿 *Haliclona* sp.

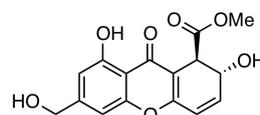
この海綿の粗抽出物から、HPLCによる分取を繰り返すことにより、培養ヒト癌細胞株の増殖を強く阻害するアルカロイド2種類を単離した。これらの成分以外のフラクションには同様の活性は検出されなかったため、これら2種類の化合物が粗抽出物の活性を表している。残念ながら両化合物は既に報告されていたpapuamineとhaliclonadamineに一致したが、培養ヒト癌細胞の増殖を抑制する活性の報告は初めてである。これらの化合物は、乳癌MCF-7、肝細胞癌Huh-7、前立腺癌PC-3、大腸癌HCT-15、白血病細胞U937およびJurkat細胞の増殖を同程度の強さ(0.89~2.51  $\mu$ M)で抑制した。また、これらの化合物を単独投与してU937細胞を培養したところ、sub-G<sub>1</sub>期の細胞が蓄積し、クロマチンの凝縮と核の断片化が観察された。よって、これらの化合物は、ヒト癌細胞のアポトーシスを誘導していると考えられる。アポトーシス誘導の詳細なメカニズムについては現在検討中である。

(6) 炎症性サイトカイン産生系に影響を示すその他の海洋天然物

本研究課題を継続中にホヤ、海綿、ソフトコーラル、海洋糸状菌から単離した上記以外の化合物のうち、これまでに13種類についてV79細胞のコロニー形成阻害活性を検討した結果、7種類がEC<sub>50</sub> = 20  $\mu$ g/mL以下で活性を示した。これら7化合物についてさらに、LPS刺激したRAW264.7細胞およびTHP-1細胞による炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ とIL-8)の産生に対する影響を調べたところ、以下の2化合物が非常に特徴的な活性をもつことが分かった。

#### ① AGI-B4

インドネシアで採集した海洋糸状菌から単離した化合物で、V79アッセイにおいてEC<sub>50</sub> = 1.3  $\mu$ g/mLを示した。構造は既に報告されているAGI-B4と一致した。

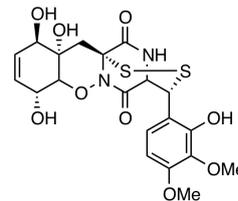


AGI-B4

この化合物は、LPS刺激したRAW264.7細胞から産生されるTNF- $\alpha$ に対して産生抑制効果を示した。一方、LPS刺激したTHP-1細胞からのIL-8の産生に対しては増強傾向が認められた。

#### ② Pretridhoderamide

パラオで採集した海洋糸状菌から単離した化合物で、V79アッセイにおいてEC<sub>50</sub> = 0.6  $\mu$ g/mLという比較的強い活性を示した。構造は既に報告されているpretridhoderamideと一致した。



Pretridhoderamide

この化合物は、LPS刺激したRAW264.7細胞からのTNF- $\alpha$ 産生を誘導する効果を示したが、LPS刺激したTHP-1細胞においてはIL-8の産生を抑制した。

③ LPSで刺激して炎症性サイトカインの産生を誘導したRAW264.7細胞およびTHP-1細胞に対して、異なる作用を示す化合物はこれまでも見いだしているが、今回の実験で発見したpretridhoderamideが示す効果をもった化合物は今まで知られていなかった。よって、このような効果をもたらす活性発現メカニズムの解明は、今後の興味ある研究課題である。

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 8 件)

- ① H. Yamazaki, D. S. Wewengkang, S. Kanno, M. Ishikawa, Henki Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, M. Namikoshi. Papuamine and haliclonadiamine, obtained from an Indonesian sponge *Haliclona* sp., inhibited cell proliferation of human cancer cell lines. *Nat. Prod. Res.*, **2012**, in press (査読有). DOI: 10.1080/14786419.2012.688050
- ② H. Yamazaki, D. S. Wewengkang, T. Nishikawa, H. Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, M. Namikoshi. Two New Tryptamine Derivatives, Leptoclinidamide and (-)-Leptoclinidamine B, from an Indonesian Ascidian *Leptoclinides dubius*. *Mar. Drugs*, **2012**, *10*, 349-357 (査読有). DOI: 10.3390/md10020349
- ③ T. Oda, D. S. Wewengkang, M. M. Kapojos, R. E. P. Mangindaan, J.-S. Lee, M. Namikoshi. Lobohedleolide induces interleukin-8 production in LPS-stimulated human monocytic cell line THP-1. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, **2011**, *4*, 16-21 (査読有). <http://www.doaj.org/>
- ④ M. M. Kapojos, J.-S. Lee, T. Oda, T. Nakazawa, O. Takahashi, K. Ukai, R. E. P. Mangindaan, H. Rotinsulu, D. S. Wewengkang, S. Tsukamoto, H. Kobayashi, M. Namikoshi. Two unprecedented cembrane-type terpenes from an Indonesian soft coral *Sarcophyton* sp. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 641-645.
- ⑤ W. Wang, O. Takahashi, T. Oda, T. Nakazawa, K. Ukai, R. E. P. Mangindaan, H. Rotinsulu, D. S. Wewengkang, H. Kobayashi, S. Tsukamoto, M. Namikoshi. Lissoclibadins 8-14, polysulfur dopamine-derived alkaloids from the colonial ascidian *Lissoclinum* cf. *badium*. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 9598-9603 (査読有). DOI: 10.1016/j.tet.2009.09.056
- ⑥ T. Oda, J.-S. Lee, Y. Sato, S. Sakamoto, H. Handa, R. E. P. Mangindaan, M. Namikoshi. Inhibitory Effect of *N,N*-Didesmethylgrosularine-1 on Inflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 Cells. *Mar. Drugs*, **2009**, *7*, 589-599 (査読有). DOI: 10.3390/md7040589

[学会発表] (計 13 件)

- ① 山崎寛之、D.S. Wewengkang、西川輝昭、H. Rotinsulu、R.E.P. Mangindaan、浪越通夫、インドネシア産群体ボヤから単離した新規インドールアルカロイドの構造、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、札幌
- ② 小田泰子、北村美里、山崎寛之、R.E.P. Mangindaan、浪越通夫、海洋天然物 13 種の V79 細胞に対する細胞障害性について、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
- ③ 山崎寛之、菅野秀一、D.S. Wewengkang、石川正明、H. Rotinsulu、R.E.P. Mangindaan、浪越通夫、インドネシア産海綿から単離した papuamine 類のアポトーシス誘導作用、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日、札幌
- ④ 小田泰子、北村美里、山崎寛之、R.E.P. Mangindaan、浪越通夫、炎症性サイトカイン産生系に効果を示す海洋天然物の探索、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、札幌
- ⑤ H. Yamazaki、D.S. Wewengkang、S. Kanno、T. Nishikawa、H. Rotinsulu、M. Ishikawa、R.E.P. Mangindaan、M. Namikoshi. Bioactive Compounds from Indonesian Ascidian *Leptoclinides dubius* and Marine Sponge *Haliclona* sp. The 6th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, 2012 年 1 月 27 日、札幌
- ⑥ 山崎寛之、D. S. Wewengkang、H. Rotinsulu、R. E. P. Mangindaan、塚本佐知子、浪越通夫、インドネシア産単体ボヤから単離した新規化合物の構造、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- ⑦ 小田泰子、北村美里、中澤孝浩、浪越通夫、LPS 刺激した RAW 264.7 細胞による炎症性サイトカインの産生への magnolol の影響、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡
- ⑧ T. Oda, M. Namikoshi. Regulation of inflammatory cytokine production by lobohedleolide. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 2010 年 8 月 26 日、神戸
- ⑨ 小田泰子、澤井太郎、浪越通夫、中澤孝浩、鶴飼和代、小林久芳、Remy E. P. Mangindaan、単球系細胞株から産生誘導されるインターロイキン 8 への Lissoclibadin 1~7 の影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山
- ⑩ 浪越通夫、小田泰子、澤井太郎、中澤孝浩、鶴飼和代、小林久芳、R. E. P. Mangindaan、炎症性サイトカイン産生への lobohedleolide の影響、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浪越 通夫 (NAMIKOSHI MICHIO)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30189196

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

中沢 孝浩 (NAKAZAWA TAKAHIRO)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60296019

鵜飼 和代 (UKAI KAZUYO)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：60433512

山崎 寛之 (YAMAZAKI HIROYUKI)

東北薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：7052344