

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06625

研究課題名(和文)新規メカニズムを有する抗癌剤創薬を指向した上皮間葉転換誘導細胞増殖阻害物質の創出

研究課題名(英文)The study on growth inhibitor of epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

松尾 洋孝 (Matsuo, Hirotaka)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 薬用植物資源研究センター・研究員

研究者番号：70613694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、上皮間葉転換(EMT)誘導細胞増殖阻害物質の探索系を確立し、活性物質を見出すことを目的にした。そこで、唯一EMT誘導細胞増殖阻害活性が知られている放線菌由来のnanaomycin Kの挙動を、MDCK細胞を用いて解析した。その結果、EMT誘導細胞およびEMT阻害細胞で活性を比較することにより、目的物質が得られることを確認した。約13,000種の植物エキスをスクリーニングした結果、活性を示すエキスを見出し、数種の活性物質を得た。既知物質1種については、作用機序解析をトランスクリプトーム解析を行い、活性に寄与していると思われる遺伝子の候補を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉転換(EMT)は、癌細胞では転移、浸潤の初期ステップとしてEMTが関与していることが分かっている。また、癌の治療抵抗性や、治療後の再発の原因として考えられている癌幹細胞(cancer stem cells; CSCs)や血中循環癌細胞(circulating tumor cells; CTCs)とEMTの関連も報告されており、EMTの制御に着目した新たな癌治療の戦略が期待されている。本研究の成果は、EMTに着目したこれまでにない新しいタイプの抗癌剤の開発に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish a search system for epithelial-mesenchymal transition (EMT)-inducing cell proliferation inhibitors and to find active substances. Therefore, we analyzed the behavior of nanaomycin K, derived from actinomycetes, which is the only substance known to have EMT-inducing cell proliferation inhibitory activity, using MDCK cells. As a result, we confirmed that the target substance could be obtained by comparing the activity in EMT-inducing cells and EMT-inhibiting cells. As a result of screening approximately 13,000 types of plant extracts, we found extracts that showed activity and obtained several active substances. For one known substance, we performed a mechanism of action analysis and transcriptome analysis, and found several genes that are thought to contribute to the activity.

研究分野：天然物化学、生薬学

キーワード：上皮間葉転換 抗癌剤 天然物 植物 スクリーニング

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内における癌患者数は99万人を超え、依然、死亡率の第一位を独走している^[1]。癌の薬物治療は、パクリタキセルやメトトレキサートなどをはじめ、近年では分子標的薬も主力となり、例えば非小細胞肺癌患者では3年生存率が約20%増加した^[2]。また、外来での薬物治療も増えてきており、在宅治療による患者のQOL向上にもつながっている。しかしながら、強い副作用や非常に高額な薬価など、未だ多数の問題点も残されており、薬物療法を含め新たな治療法の開発が急務である。

上皮間葉転換 (EMT) は、1980年代に提唱された、上皮様細胞が間葉系細胞へと形質変化する現象で、初期胚の発生、臓器形成、組織修復時などで見られる^[3]。とりわけ、癌細胞では転移、浸潤の初期ステップとしてEMTが関与していることが分かっている^[4]。また、癌の治療抵抗性や、治療後の再発の原因として考えられている癌幹細胞 (cancer stem cells ; CSCs) や血中循環癌細胞 (circulating tumor cells ; CTCs) と EMT の関連も報告されており^[5]、EMT の制御に着目した新たな癌治療の戦略が期待されている。

[1] 厚生労働省「全国がん登録の概要」、[2] Reck, M. et al. *N. Engl. J. Med.*, 375, 1823-1833, 2016., [3] Klymkowsky, M. W., et al., *Am. J. Patholol.*, 1588-1593, 2009., [4] Marcucci, F. et al., *Nat. Rev.*, 15, 311-325, 2016., [5] Ksiazkiewicz, M. et al., *Pathobiology*, 79, 195-208, 2012.

2. 研究の目的

本研究では、当センターで独自に構築した薬用植物エキスイブラリーを用い、これまでにない新しいタイプの EMT 制御物質の探索およびそのメカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

MDCK細胞を20,000 cells/wellおよび2,000 cells/wellで播種した96 well plateをそれぞれ1枚ずつ調製した。細胞の接着を確認後、各well (100 μ L) に植物エキスを終濃度が50 μ g/mLになるよう2枚の96 well plateに同様に添加して24時間インキュベートし、生細胞数定量キット (WST-8) により細胞生存率を算出した。EMT誘導細胞増殖阻害活性の指標は、細胞密度が高いとき (20,000 cells/well) には毒性を示さず、低いとき (2,000 cells/well) に細胞生存率が概ね50%以下となるような植物エキスを陽性とした (1次スクリーニング)。MDCK細胞を 1×10^6 cellsに調製したシャーレに、EMT誘導剤のTGF- β を10 ng/mLになるよう添加した。同様にして、EMT阻害剤のSB431542を10 μ Mになるよう添加したシャーレ、TGF- β とSB431542の両薬剤を添加したシャーレ、DMSO (control) を添加したシャーレを調製した (以下まとめて4条件細胞と記載する)。72時間インキュベート後、4条件細胞をそれぞれ20,000 cells/wellおよび2,000 cells/wellの濃度になるように96ウェルプレートに播種した。一晚細胞の接着を行い、各濃度に調製した被験化合物を添加した。24時間インキュベート後、WST-8を添加して20,000 cells/wellのプレートは2時間、2,000 cells/wellのプレートは4時間インキュベートした後、450 nmの吸光度を測定した。細胞生存率はDMSOコントロールの生存率を100%としたときの値で示した。

2次スクリーニングにより活性を示した植物エキスは、順次各種クロマトグラフィーを用いて活性物質の取得をした。得られた活性物質は、質量分析 (LC/MS) や核磁気共鳴装置 (NMR) などにより構造を解明した。また、SAS細胞やA549細胞など、ヒト癌細胞を用いてEMT誘導細胞増殖阻害活性の評価をした。

メカニズム解析に関しては、スクリーニングにより見出された活性の強い物質を用いて行った。化合物添加した細胞としていない細胞のRNAを抽出し、トランスクリプトソーム解析を行い、作用メカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

・EMT誘導細胞における各種薬剤の細胞増殖阻害活性の検討

濃度調製したMDCK細胞をシャーレに播種し、TGF- β (10 ng/mL)、SB431542 (10 μ M)、TGF- β + SB431542、DMSOをそれぞれ添加した4つの条件を作成し、72時間インキュベートした。これら各種条件の細胞を20,000 cells/wellおよび2,000 cells/wellに調製して96ウェルプレートに播種し、nanaomycin Kの増殖阻害活性の比較を行った結果、nanaomycin Kの活性はTGF- β により増強され、SB431542によって阻害されることが明らかになった (図1)。また、同様の試験を既存の抗癌剤3種で行った。その結果、cisplatinでは一部の濃度 (20,000 cells, 100 μ M) でその活性がTGF- β により増強され、SB431542によって阻害される現象が認められたものの、ほとんどの薬剤および細胞濃度ではnanaomycin Kのような変化は認められなかった (図2)。

以上の結果より、細胞密度を変えた細胞増殖阻害活性の評価と、TGF- β やSB431542添加細胞における増殖阻害活性の評価を組み合わせることで、EMT誘導細胞増殖阻害活性物質の

【 1 研究目的、研究方法など (つづき)】

探索系を構築することができた。

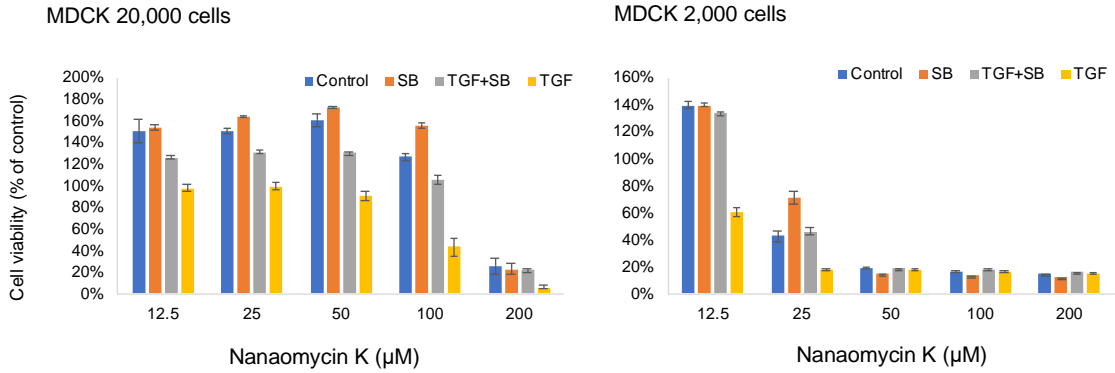


図1. 各種条件におけるnanaomycin Kの増殖阻害活性の比較

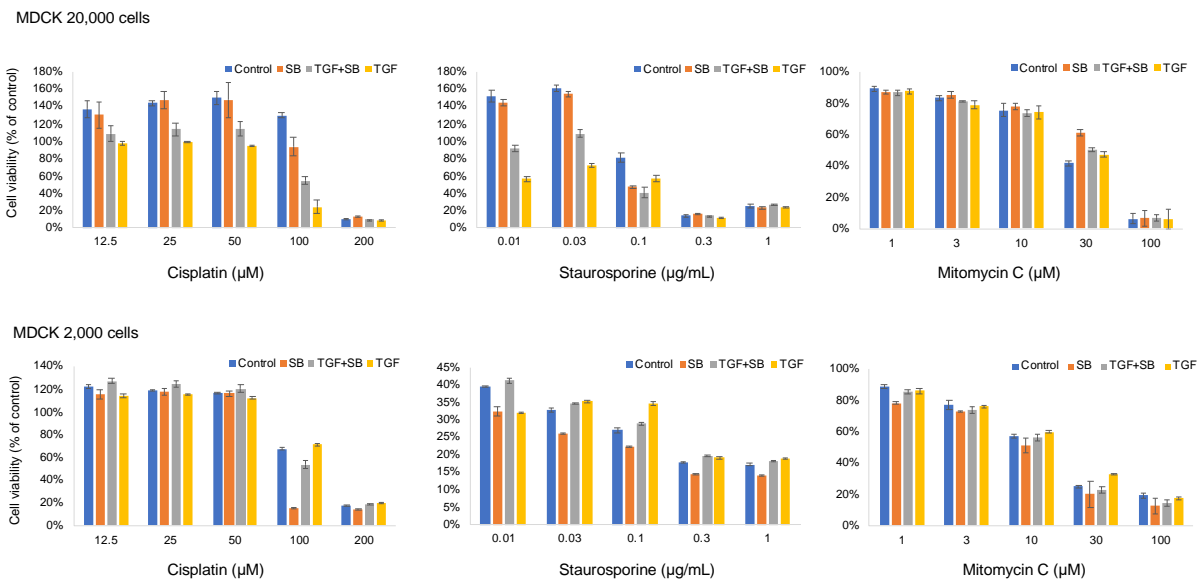


図2. 既存の抗癌剤の各種条件における増殖阻害活性の比較

・エキストラライブラリーのスクリーニング

13427エキスをスクリーニングし、222エキスが1次スクリーニングを通過した。1次スクリーニング通過率は1.5%であった。1次スクリーニングを通過したエキスの一部で、再現性を示した59サンプルに関して2次スクリーニングを行った結果、27サンプルがヒットした

・ヒットエキスからの活性物質探索

1. MPSC-0663キンマ葉エキス

キンマエキスを、活性を指標に分画した結果、9.7 mgの目的物質 (HM-PB0001) を取得した。1D、2D NMR 解析の結果、hydroxychavicol であることが分かった (図 3,4)

最終的に、hydroxychavicol を用いて 4 条件細胞における活性を評価した結果、2,000 cells の 25 μg/mL のみで活性が認められた (図 5)

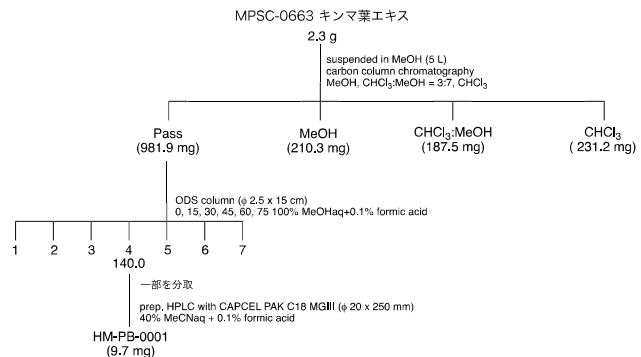
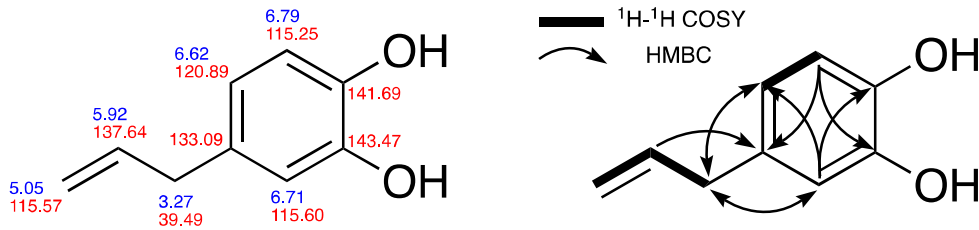


図 3. MPSC-0663 エキスからの活性物質精製スキーム

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】



HM-PB0001 (hydroxychavicol)

図 4. Hydroxychavicol の構造解析結果

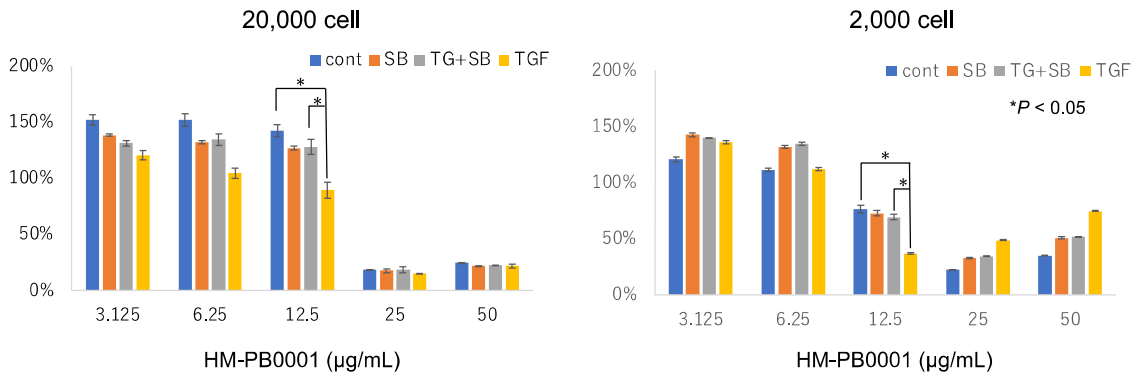


図 5. 活性物質 HM-PB0001 の 4 条件細胞における活性 (* $P < 0.05$, ANOVA/Tukey's test). Cont: control, SB: SB431543, TG+SB: TGF- β +SB431542, TG: TGF- β

2. MPSC-2120 タケニグサ完熟果実エキス

タケニグサには主要成分として、sanguinarine、chelerythrine が報告されている。そこで、まずはその 2 種 (sanguinarine、chelerythrine : 図 6) について活性を評価した。その結果、活性が認められた (図 7)。次に、これら 2 種の化合物を除いたエキスで活性を評価したところ、ほとんど活性は認められなかったため、タケニグサの活性成分は上記 2 種であると考えられた。

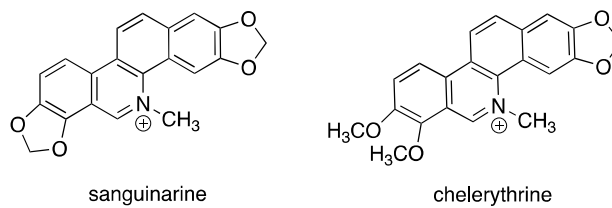


図 6. Sanguinarine と chelerythrine の構造

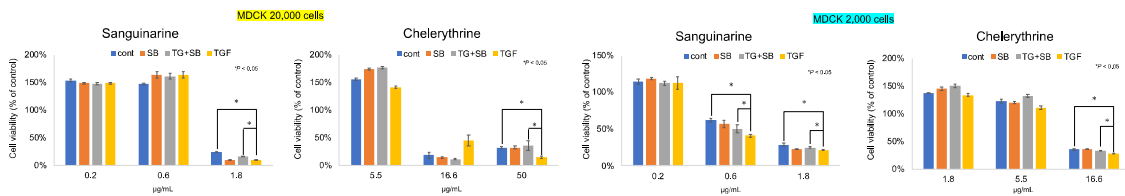


図 7. Sanguinarine と chelerythrine の活性

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

・ヨツバヒヨドリ由来化合物 X の作用機序解析

EMT 誘導細胞増殖阻害作用のメカニズム解析について、活性が強く、数種類のヒト癌細胞に対しても安定的に活性を示したヨツバヒヨドリから取得した化合物 X についてトランスクリプトーム解析を行った。

6 well plate で control (DMSO 処理) EMT 誘導細胞 (TGF-β処理) をそれぞれ播種し、化合物は 2.4 μg/mL の濃度で添加した。24 時間培養し、total RNA を抽出して AZENTA 社へ RNA を送付し、トランスクリプトーム解析を行った。解析は図 8 に示した 4 通りについて解析した。

	TGF-β	化合物	条件
Control (-)	-	-	比較① Control (-) vs EMT細胞 (-)
Control (+)	-	+	比較② Control (-) vs Control (+)
EMT細胞 (-)	+	-	比較③ Control (+) vs EMT細胞 (+)
EMT細胞 (+)	+	+	比較④ EMT細胞 (-) vs EMT細胞 (+)

図 8. サンプル条件と解析の比較条件

解析の結果、表 1 および 2 に示す遺伝子について、作用機序に寄与している可能性が示唆された。

表 1. EMT 細胞 (-) vs EMT 細胞 (+) で化合物添加後に発現量が 200 以上となった遺伝子 (up)

Control (-) vs Control (+)	geneID	EMT細胞 (-)-1	EMT細胞 (-)-2	EMT細胞 (-)-3	EMT細胞 (+)-1	EMT細胞 (+)-2	EMT細胞 (+)-3	foldchange
con-con-con-eupで2.56倍	gene-TXN	802.7	792.1	801.8	1540.48	1516.93	1753.53	2.06827065
con-con-con-eupで2.87倍	gene-ACTB	504.92	555.2	468.39	1097.14	1106.96	1181.81	2.26144436
con-con-con-eupで2.96倍	gene-PTGR1	349.66	372.92	335.86	1070.32	1056.28	1124.47	3.30468926
con-con-con-eupで2.79倍	gene-CCN1	344.07	355.3	343.06	859.66	877.44	869.69	2.57092906
con-con-con-eupで25.6倍	gene-CDKN1A	28.83	26.38	28.62	653.69	632.87	663.08	23.9092201
con-con-con-eupで4.36倍	gene-TIMP3	130.78	107.67	115.49	649.18	610.63	536.53	5.22752693
con-con-con-eupで3.07倍	gene-TNAGL1	142.05	132.57	127.43	602.52	610.44	644.95	4.7618022
con-con-con-eupで3.51倍	gene-HSP90AA1	301.28	295.17	295	584.58	579.41	607.55	2.08740654
con-con-con-eupで2.85倍	gene-NOO1	111.03	112	116.83	469.68	453.4	482.21	4.28173591
con-con-con-eupで3.03倍	gene-SLC20A1	129.55	126.2	119.41	430.39	423.52	454.41	3.59372193
con-con-con-eupで3.03倍	gene-HER3	108.83	111.46	101.47	373.65	380.41	414.21	3.74557119
con-con-con-eupで2.29倍	gene-EMP1	185.77	174.67	182.2	361.6	351.18	354.77	2.02622594
con-con-con-eupで2.29倍	gene-ITGA3	130.87	129.89	128.42	350.93	350.2	340.99	2.75882708
con-con-con-eupで2.56倍	gene-PLAU	166.88	162.88	160.38	339.05	332.22	332.85	2.10198003
con-con-con-eupで3.69倍	gene-RGS2	32.74	27.88	31.37	325.27	322.95	331.83	10.0222537
con-con-con-eupで2.61倍	gene-TNS4	64.44	61.98	59.21	312.55	306.55	277.21	4.5699786
con-con-con-eupで4.05倍	gene-WCP	134.58	136.87	133.43	302.82	307.7	309.65	3.24207982
con-con-con-eupで4.97倍	gene-PHLDA2	78.29	78.83	69.06	299.28	300.29	323.02	4.21794183
con-con-con-eupで2.10倍	gene-F3	56.61	52.19	54.58	293.97	286.84	308.5	5.60341588
con-con-con-eupで11.2倍	gene-PSMD2	121.99	119.94	120.98	285.78	291.74	301.08	2.49445414
con-con-con-eupで6.05倍	gene-SERPINE1	75.3	70.1	71.11	277	266.01	256.86	12.7339776
con-con-con-eupで2.00倍	gene-PSM1	137.43	139.4	143.85	275.76	284.47	301.85	3.06839185
con-con-con-eupで2.36倍	gene-PRDX6	143.63	143.06	138.9	272.92	272.49	303.56	2.05849601
con-con-con-eupで4.77倍	gene-ATP5V0C	143.88	151.59	142.01	269.63	279.32	300.74	2.00331456
con-con-con-eupで5.81倍	gene-CCTS6	136.57	136.53	138.09	266.58	274.22	291.18	2.07481777
con-con-con-eupで3.29倍	gene-TNFRSF12A	127.44	111.74	118.29	260.35	263.51	293.71	2.35332773
con-con-con-eupで2.00倍	gene-MYC	57.85	52.08	50.71	237.16	230.85	232.49	4.49273882
con-con-con-eupで2.00倍	gene-PSMA2	117.25	116.86	115.4	230.43	231.11	260.51	3.28377616
con-con-con-eupで2.36倍	gene-PSMA3	116.25	116.95	119.42	223.55	222.91	241.9	2.01035872
con-con-con-eupで2.36倍	gene-TUBB6	110.92	106.93	103.78	219.49	222.71	236.79	2.12593786
con-con-con-eupで2.36倍	gene-BLVRB	88.49	84.48	85.21	215.8	205.47	222.6	2.56858
con-con-con-eupで4.77倍	gene-PSMD8	104.16	111.63	107.39	214.53	215.35	231.74	2.11106087
con-con-con-eupで5.81倍	gene-MDM2	53.09	53.08	52.88	208.4	205.47	202.3	3.99109679
con-con-con-eupで5.81倍	gene-SFN	48.32	51.77	48.67	208.29	217.05	227.85	4.53276448
con-con-con-eupで5.81倍	gene-SERPINE6	105.51	107.32	109.5	206.15	211.74	236.19	2.07713314

表 2. EMT 細胞 (-) vs EMT 細胞 (+) で化合物添加前に発現量が 100 以上の遺伝子 (down)

Control (-) vs Control (+)	geneID	EMT細胞 (-)-1	EMT細胞 (-)-2	EMT細胞 (-)-3	EMT細胞 (+)-1	EMT細胞 (+)-2	EMT細胞 (+)-3	foldchange
con-con-con-eupで0.37倍	gene-CLU	10196.78	10954.01	10908.8	4811.31	4817.35	5124.09	0.47409415
con-con-con-eupで0.36倍	gene-WFDC2	1909.63	2164.4	2034.48	900.2	875.6	939.96	0.45810868
con-con-con-eupで0.48倍	gene-B2M	1426.82	1451.33	1548.57	645.82	650.07	704.24	0.46558778
con-con-con-eupで0.31倍	gene-CD74	1125.36	1225.69	1182.71	474.41	480.6	502.71	0.42505016
con-con-con-eupで0.31倍	gene-DLA-DRA	443.75	456.89	454.37	102	93.53	101.27	0.22544278
con-con-con-eupで0.27倍	gene-HLA-DRB1	292.98	317.1	303.4	72	73.05	82.24	0.25670977
con-con-con-eupで0.27倍	gene-H1-10	257.46	298.77	274.3	78.7	80.9	82.66	0.30082252
con-con-con-eupで0.43倍	gene-LOC482176	221.57	210.7	229.09	91.82	89.03	85.94	0.41543122
con-con-con-eupで0.40倍	gene-ELF3	198.33	206.45	206.21	91.18	88.53	94.68	0.46273309
con-con-con-eupで0.16倍	gene-RRM2	190.73	199.66	197.88	28.12	31.2	28.07	0.15320386
con-con-con-eupで0.16倍	gene-NUPR1	172.4	187.78	194.13	37.52	42.31	41.8	0.22669075
con-con-con-eupで0.41倍	gene-HMGN2	171.78	162.38	182.32	56.62	54.41	59.89	0.3407278
con-con-con-eupで0.26倍	gene-IGFBP4	166.46	180.48	173.95	58.73	55.64	60.06	0.34501482
con-con-con-eupで0.10倍	gene-DEK	166.11	157.63	164.34	75.37	75.14	81.13	0.48909073
con-con-con-eupで0.34倍	gene-CYS1	164.46	179.09	185.24	21.44	21.68	21.03	0.1249505
con-con-con-eupで0.44倍	gene-AKAP12	156.73	147.9	154.05	65.04	66.39	56.31	0.42159453
con-con-con-eupで0.76倍	gene-LYE	150.38	148.44	151.91	69.43	70.3	75.61	0.49233959
con-con-con-eupで0.76倍	gene-HMGB2	148.33	144.57	145.58	28.77	27.53	30.76	0.20460464
con-con-con-eupで0.31倍	gene-LOC119876668	145.56	146.19	150.81	67.79	67.45	70.82	0.47971659
con-con-con-eupで0.28倍	gene-ALDH1A1	139.51	151.16	154.01	46.13	48.12	48.47	0.33089692
con-con-con-eupで0.41倍	gene-DIA-DQA1	130.36	119.78	128.04	25.78	26.8	24.29	0.20920983
con-con-con-eupで0.48倍	gene-UBE2L6	124.92	136.78	135.01	63.97	60.74	67.48	0.49927265
con-con-con-eupで0.48倍	gene-PFKL	122.32	125.87	122.82	58.9	59.38	56.73	0.48595775
con-con-con-eupで0.38倍	gene-UBALD2	117.89	112.73	115.91	51.3	51.45	56.03	0.47229247
con-con-con-eupで0.28倍	gene-BST2	109.5	113.48	111.49	51.38	56.32	48.69	0.48196864
con-con-con-eupで0.28倍	gene-CA2	107.65	111.39	115.65	24.78	26.45	30.33	0.25174285
con-con-con-eupで0.08倍	gene-SCARA3	107.05	110.11	109.89	37.78	36.72	38.29	0.35527208
con-con-con-eupで0.08倍	gene-DAO	106.22	112.79	116.69	10.77	10.57	10.28	0.09690201
con-con-con-eupで0.27倍	gene-ANLN	102.55	90.35	94.87	41.9	42.9	40.18	0.44729762
con-con-con-eupで0.27倍	gene-DCDC2	100.24	99.15	102.15	29.56	29.15	27.65	0.29487771

以上のように、Control (-) vs Control (+) と EMT 細胞 (-) vs EMT 細胞 (+) の遺伝子発現をトランスクリプトームで解析することにより、なぜ EMT を誘導した細胞で化合物 X の細胞増殖阻害活性が増強されるのか、その作用メカニズムを解析する上でキーとなる候補遺伝子をいくつかを得ることができた。

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 Hiroataka, Kawakami Hitomi, Anjiki Naoko, Kawano Noriaki, Fuchino Hiroyuki, Kawahara Nobuo, Yoshimatsu Kayo	4. 巻 -
2. 論文標題 Screening of growth inhibitors for epithelial-mesenchymal transition-induced cells by TGF- from plant-based sources identified the active compound hydroxychavicol from Piper bitle	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	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） 10.1007/s11418-024-01785-3	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾洋孝、河上仁美、河野徳昭、淵野裕之、吉松嘉代
2. 発表標題 タケニグサ（ <i>Macleaya cordata</i> ）由来上皮間葉転換誘導細胞増殖阻害物質に関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会第69回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾洋孝、河上仁美、河野徳昭、淵野裕之、吉松嘉代
2. 発表標題 ガンクビソウ（ <i>Carpesium divaricatum</i> ）より単離された上皮間葉転換誘導細胞増殖阻害物質に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第144回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松尾 洋孝、河上 仁美、河野徳昭、淵野 裕之、吉松 嘉代
2. 発表標題 ウコンを探索源とした上皮間葉転換誘導細胞増殖阻害物質の探索
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松尾 洋孝、河上 仁美、安食 菜穂子、河野 徳昭、淵野 裕之、吉松 嘉代
2. 発表標題 上皮間葉転換誘導細胞増殖阻害物質探索系の構築
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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