

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25年5月30日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590098

研究課題名（和文） 和漢薬“牛蒡子”成分アルクチゲニンから新規膵臓がん治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of a new pancreatic cancer curative medicine from arctigenin, an ingredient of Wakan-yaku “Burdock Fruit (Seeds of *Arctium lappa*)”

研究代表者

手塚 康弘 (TEZUKA YASUHIRO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：70236975

研究成果の概要（和文）：和漢薬“牛蒡子 (*Arctium lappa*)”，漢薬リョウカオウ (*Wikstroemia indica*)，漢薬テイカカズラ (*Trachelospermum asiaticum*) から (-)-アルクチゲニン類縁化合物を単離し，栄養飢餓選択的細胞毒性を測定した。さらに，そこで得られた知見を基に，一連の (-)-アルクチゲニン類縁体を合成し，トリエトキシ体がイン・ビトロ及びイン・ビボの系において (-)-アルクチゲニンに匹敵する活性を示す事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：From *Arctium lappa*, *Wikstroemia indica*, and *Trachelospermum asiaticum*, we obtained the (-)-arctigenin-relating compounds and measured their preferential cytotoxicity under nutrient-deprived conditions. Based on the preferential cytotoxicity, we have synthesized the (-)-arctigenin derivatives and clarified that the triethoxy derivative shows the important *in vitro* and *in vivo* activity identical with those of (-)-arctigenin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は化学療法剤や放射線治療に対して抵抗性を示し，有効な治療法が存在しない癌の一種である。正常組織は，血流によって供給される酸素や栄養を利用して生存・増殖しているため，酸素や栄養の供給が悪い状態では生存できない。それに対し，膵臓がんを含

む等のがん細胞は，栄養飢餓状態下でも特殊なエネルギー代謝を行う事で生存が可能になっている。我々は，この栄養飢餓耐性を解除する薬物を，がん組織特異的な治療薬の候補化合物として和漢薬を主とする伝統薬物の中に求め，漢方薬“牛蒡子”から「アルクチゲニン」を，“独活”から「エンジェルマ

リン」を活性成分として単離・同定すると共に、ミャンマー産薬用植物 *Boesenbergia pandurata* 及びプロボリスから多数の活性成分を見出した。これらの活性化化合物の中で、「アルクチゲニン」は強い活性を示し、ヌードマウスのゼノグラフト膵臓がんモデルにおいて、膵臓癌の大きさを三分の一に縮小する効果を示し、安全性も確認された。

2. 研究の目的

アルクチゲニン含有植物 (*Wikstroemia indica*, *Libocedrus yateensis*, *Taxus wallichiana*, *Anthriscus nemerosa*, *Trachelospermum asiaticum* var. *intermedium*, *Chaerophyllum maculatum* など) からのアルクチゲニン類縁体の単離、アルクチゲニン及びアルクチゲニン誘導体の合成、アルクチゲニン代謝物の単離・同定などを通して、種々のアルクチゲニン類縁体入手し、それらの栄養飢餓選択的毒性を測定し、構造活性相関を検討する事で、栄養飢餓選択的毒性に必要な構造要因を明らかにし、それらの知見に基づいてより有効な膵臓がん治療薬を設計・合成する。

3. 研究の方法

(1) 牛蒡子エキスについて、常法に従い、カラムクロマトグラフィ、HPLC、pTLC等を組み合わせて、アルクチゲニン類縁化合物を単離し、核磁気共鳴 (NMR)、質量分析 (MS) などのスペクトルデータに基づいて構造を決定する。得られたアルクチゲニン類縁化合物について、栄養飢餓選択的細胞毒性を測定し、構造活性に関する知見を得る。

(2) アルクチゲニン含有植物 *Wikstroemia indica* から文献記載の方法も参考にしてアルクチゲニン類縁化合物を単離する。単離したアルクチゲニン類縁化合物について、栄養飢餓選択的細胞毒性を測定し、構造活性に関する知見を得る。

(3) アルクチゲニンからの変換

アルクチゲニンのフェノール性水酸基を保護した後、他の位置のメチル基を外し、生じたフェノール基に種々の置換基を導入する。これにより、ベンゼン環状の置換基を異にする種々のアルクチゲニン類縁化合物を合成し、構造活性相関を検討する。

(4) 種々の置換基を有する2種のベンジル誘導体を求核剤若しくは親電子剤に変換し、 α , β 不飽和ブチロラクトンと縮合させる事で、アルクチゲニン及びアルクチゲニン類縁体を合成する。得られた化合物について、栄養飢餓選択的細胞毒性を測定する。

(5) 栄養飢餓選択的細胞毒性は、従来から用いている富栄養培地 (DMEM 培地) と栄養欠乏培地 (グルコース、アミノ酸、血清等の栄養分を除いた NDM 培地) における細胞毒性を比較し、栄養欠乏培地でのみ毒性を示すものを選択的毒性化合物とする。強い活性を示した化合物については、常法に従ってアポトーシス誘起の有無等の検討を行うと共に、ヌードマウスのゼノグラフト膵臓がんモデルなどを用いてイン・ビボ系での有効性を検討する。

4. 研究成果

(1) 和漢薬“牛蒡子”のエキスの成分を精査し、アルクチゲニン及び(-)-アルクチゲニンの他に、chlorogenic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, (-)-matairesinol, isolappaol A, lappaol F, lappaol B, 及び isolappaol C と lappaol C の 1:1 混合物, arctignan D と arctignan E の 1:1 混合物, isolappaol A と lappaol A の 1:1 混合物を単離した。これらの化合物の栄養飢餓耐性解除活性を、富栄養培地では (DMEM 培地) では細胞毒性を示さず、栄養欠乏培地 (NDM 培地) でのみ示される選択的細胞毒性で評価した。その結果、アルクチゲニン, matairesinol, lappaol B が PC₅₀ 値で 1.75 μ M, 31.1 μ M, 30.9 μ M の栄養飢餓耐性解除活性を示す事が明らかになった (図 1)。更に、これら活性を示した化合物の活性値と構造を活性を示さなかった化合物の構造と比較する事で、1) γ -ブチロラクトン環, 2) γ -ブチロラクトン環 2 位の 3-hydroxy-4-methoxyphenyl 基, 3) γ -ブチロラクトン環 3 位の低極性置換基, が活性発現にとって重要である事を明らかにした。

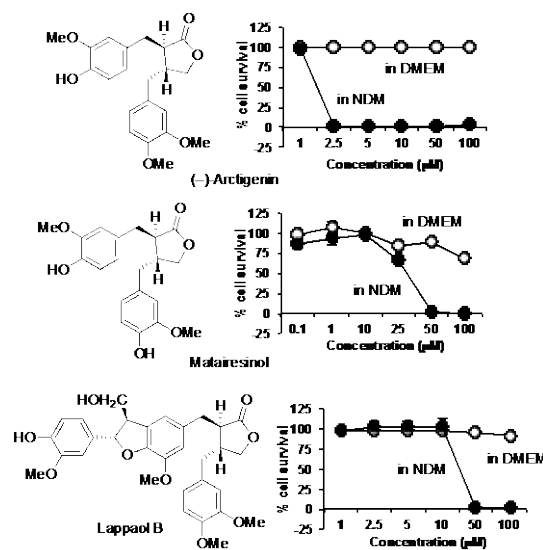


図 1 (-)-アルクチゲニン, matairesinol, rappaol B の栄養飢餓耐性解除活性

(2) 漢薬リョウカオウ (*Wikstroemia indica*) の成分検索を行い、アルクチゲニン類縁化合物の (+)-アルクチゲニン, (+)-matairesinol, (+)-trachelogenin, (+)-nortrachelogenin, (+)-hinokinin, (+)-kusunokinin を新グアイアン型セスキテルペン (4,10,11-guaia-trien-3-one-14-oic acid) 及び既知化合物 7 種 (oleodaphnal, 7-methoxycoumarin, 7-hydroxycoumarin (umbelliferone), daphnogitin, daphnoretin, salicifoliol, (-)-pinoresinol) と共に得た。一方、漢薬テイカズラ (*Trachelospermum asiaticum*) から (-)-アルクチゲニン及び (-)-matairesinol, (-)-trachelogenin を単離した。これらの化合物の栄養飢餓耐性解除活性を、富栄養培地 (DMEM培地) では細胞毒性を示さず、栄養欠乏培地 (NDM培地) でのみ示される選択的細胞毒性で評価した。その結果、*Trachelospermum asiaticum* から単離した (-)-アルクチゲニン, (-)-matairesinol, (-)-trachelogenin は PC_{50} 値で $0.54 \mu\text{M}$, $6.82 \mu\text{M}$, $5.85 \mu\text{M}$ の選択的細胞毒性を示すのに対し、*Wikstroemia indica* から単離した (+)-体は殆ど細胞毒性を示さなかった (図 2)。これらのことより、(-)-アルクチゲニンが示す強力な選択的細胞毒性において、ラクトン部の絶対配置が重要であることが明らかとなった。

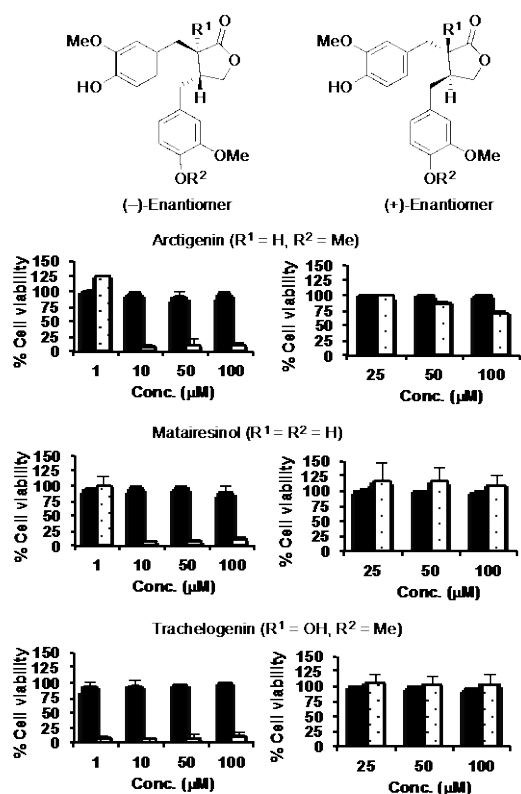


図 2 (-)-Enantiomer 及び (+)-Enantiomer の栄養飢餓選択的細胞毒性

(3) (-)-アルクチゲニンの水酸基に隣接するメトキシ基の選択的脱メチル, パラ位の水酸基のベンジル保護, 水酸基のアルキル化, 脱ベンジル保護を経て, (-)-アルクチゲニンの水酸基に隣接するメトキシ基をエトキシ基, *n*-プロポキシ基, *i*-プロポキシ基, ブチロキシ基, ヘキシルオキシ基に代えた化合物を合成した (図 3)。

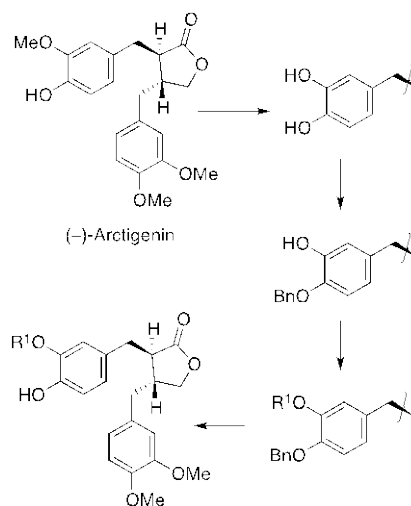


図 3 (-)-アルクチゲニンからの誘導体合成

これら化合物の栄養飢餓耐性解除活性を、富栄養培地 (DMEM培地) では細胞毒性を示さず、栄養欠乏培地 (NDM培地) でのみ示される選択的細胞毒性で評価した。その結果、メトキシ体 ($R^1 = \text{Me}$, アルクチゲニン, $PC_{50} = 0.80 \mu\text{M}$), エトキシ体 ($R^1 = \text{Et}$, $PC_{50} = 3.74 \mu\text{M}$), *n*-プロポキシ体 ($R^1 = n\text{-Pr}$, $PC_{50} = 3.74 \mu\text{M}$), *i*-プロポキシ体 ($R^1 = i\text{-Pr}$, $PC_{50} = 4.16 \mu\text{M}$), *n*-ブチロキシ体 ($R^1 = n\text{-Bu}$, $PC_{50} = 7.14 \mu\text{M}$) の順に活性が弱まった。従って、4'位の水酸基が活性発現に重要と考えられた。

(4) 次に、3,4-dihydroxybenzaldehyde から合成される光学活性 γ -ブチロラクトン (図 4 (A)) を共通鍵中間体とし、同じく 3,4-dihydroxybenzaldehyde から合成可能な種々の置換基を有するベンジルハライド (図 4 (B)) を導入するアルクチゲニン誘導体の合成経路 (図 4) を確立した。この手法を用いて合成した一連の (-)-アルクチゲニン類縁体について、イン・ビトロの系における栄養飢餓耐性解除活性を測定した結果、モノエトキシ体 ($R^2 = \text{Et}$, $R^3 = R^4 = \text{Me}$, $PC_{50} = 0.49 \mu\text{M}$), ジエトキシ体 ($R^2 = R^4 = \text{Et}$, $R^3 = \text{Me}$, $PC_{50} = 0.66 \mu\text{M}$), トリエトキシ体 ($R^2 = R^3 = R^4 = \text{Et}$, $PC_{50} = 0.78 \mu\text{M}$) の 3 化合物が (-)-アルクチゲニン ($R^2 = R^3 = R^4 = \text{Me}$, $PC_{50} = 0.80 \mu\text{M}$) に匹敵する活性を示す事が明らかになった (図 5)。

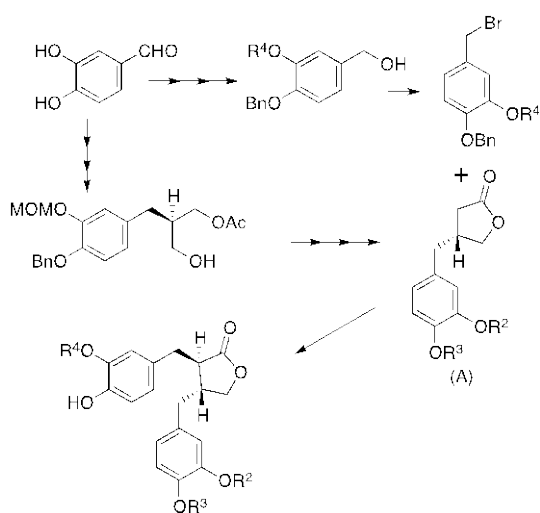


図4 光学活性アルクチゲニン類縁体の合成経路

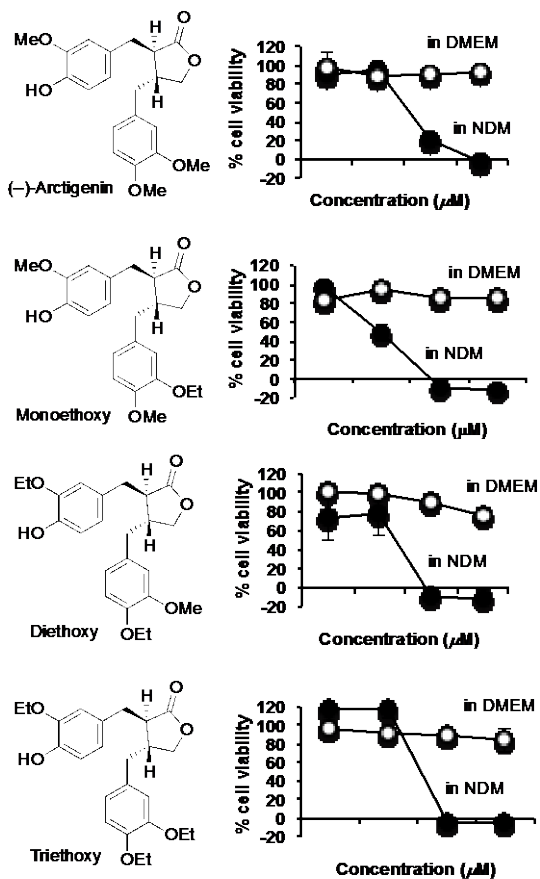


図5 モノエトキシ体, ジエトキシ体, トリエトキシ体の栄養飢餓選択的細胞毒性

さらに、代謝による脱メトキシ反応を考慮して、トリエトキシ体を選択し、ヌードマウスのゼノグラフト腫瘍がんモデルを用いるイン・ビボ系での活性を測定した。その結果、トリエトキシ体は(-)-アルクチゲニンと同様に、マウスの体重には影響を及ぼさず (図6 A)、腫瘍サイズを縮小し (図6 B)、腫瘍重

量の増加を抑制した (図6 C)。その事は、コントロール群 (図6 D)、(-)-アルクチゲニン群 (図6 E)、トリエトキシ体群 (図6 F) の腫瘍写真を比較する事でも明らかである。これらの結果から、トリエトキシ体は(-)-アルクチゲニンに匹敵する活性を示す化合物である事が明らかとなった。

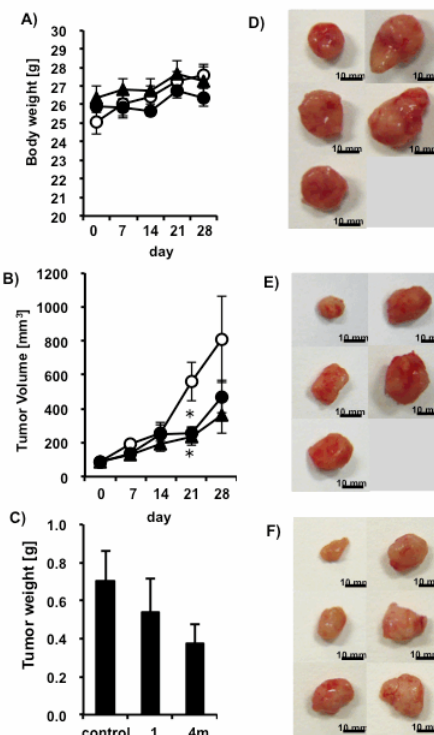


図6 マウスゼノグラフトモデルによるトリエトキシ体の抗腫瘍活性

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2件)

- ① Tezuka Y., Yamamoto K., Awale S., Li F., Yomoda S., and Kadota S.: Anti-austeric Activity of Phenolic Constituents of Seeds of *Arctium lappa*. *Nat. Prod. Commun.*, 8(4), 463-466 (2013). 査読あり <http://www.naturalproduct.us/>
- ② Kudou N., Taniguchi A., Sugimoto A., Matsuya Y., Kawasaki M., Toyooka N., Miyoshi C., Awale S., Dibwe D.F., Esumi H., Kadota S., and Tezuka Y.: Synthesis and antitumor evaluation of arctigenin derivatives based on antiausterity strategy. *Eur. J. Med. Chem.*, 60, 76-88 (2013). 査読あり
DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.11.031

〔学会発表〕(計2件)

- ① 谷口 瑛, 工藤直紀, 松谷裕二, 杉本健士, 友廣岳則, 畑中保丸, 川崎正志, Suresh Awale, 李 峰, 手塚康弘, 門田重利, 三好千香, 江角浩安, 豊岡尚樹: 栄養飢餓耐性解除に基づく新規膵臓がん治療薬の開発研究. 第42回複素環化学討論会, 2012, 10/11-13, 京都.
- ② 谷口 瑛, 工藤直紀, 松谷裕二, 杉本健士, 川崎正志, Suresh Awale, 手塚康弘, 門田重利, 三好千香, 江角浩安, 豊岡尚樹: 栄養飢餓耐性解除に基づく新規膵臓がん治療薬の開発研究. 平成23年度有機合成化学北陸セミナー, 2011, 10/7-8, 福井県坂井市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 康弘 (TEZUKA YASUHIRO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 70236975

(2) 研究分担者

豊岡 尚樹 (TOYOOKA NAOKI)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号: 10217565

Suresh Awale (SURESH AWALE)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号: 00377243