

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：25503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20720

研究課題名（和文）熱ショックタンパク質の制御に基づく天然由来医薬シーズの探索とがん再発予防への応用

研究課題名（英文）Investigation of the novel cancer treatment drug seeds based on the regulation of heat shock proteins

研究代表者

今堀 大輔 (Imahori, Daisuke)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：10963556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：オオハマボウ、カノコソウ、カボス、エビスグサについて含有成分の探索を行い、8種の新規成分を単離し、構造決定するとともに、seguinoside Kなどの既知成分を同定することができた。また、seguinoside Kが、化合物単独ではがん細胞の細胞増殖および細胞形態に影響を与えず、抗がん剤の感受性増強作用を示すことが明らかになった。加えて、がん幹細胞毒性評価を行ったところ、valerianalignan IおよびIIは、がん細胞およびがん幹細胞に対して有意な毒性を示すことが明らかになった。新規成分であるsphaerocarpain および は、がん細胞に対して有意な毒性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤感受性増強作用評価を行うことで、化合物単独ではがん細胞の細胞増殖および細胞形態に影響を与えず、抗がん剤の感受性増強作用を示すseguinoside Kを見出すことができた。また、抗がん剤抵抗性の原因のひとつとして考えられているがん幹細胞に対して毒性作用を示すvalerianalignans I および IIを見出すことができた。これらの化合物について継続して作用メカニズムの解明を行い、その有用性を明らかにすることで、がん再発予防に貢献できる化合物の開発につながる可能性がある。また、本研究では、今後天然由来医薬シーズの探索を進めるうえで有用な化合物ライブラリーを構築した。

研究成果の概要（英文）：To investigate the novel cancer treatment drug of natural products derived from plant materials, we isolated 38 compounds, including 8 new compounds. The cell death-inducing activity of isolated compounds alone or combination with Adriamycin (ADR) were observed by time-lapse cell imaging. Although the isolated compounds did not affect the number of mitotic entry cells and dead cells alone, seguinoside K significantly increased the number of dead cells on ADR treated human cervical cancer cells. Among the isolated compounds, valerianalignans I and II exerted anti-proliferative activity against human glioblastoma cells (U-251 MG) and their cancer stem cells (U-251 MG CSCs). Interestingly, valerianalignans I and II notably exerted anti-proliferative activities at lower concentrations against CSCs than non-CSCs. In addition, sphaerocarpain I and II showed cytotoxic activity against both U-251 MG and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y).

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 がん予防 がん細胞毒性 Hibiscus tiliaceus Citrus sphaerocarpa

1. 研究開始当初の背景

がん治療において従来から広く用いられてきた細胞障害性抗がん剤は、その細胞増殖抑制および細胞死誘導作用によって、がん治療効果を示す。しかしながら、これらの薬剤に抵抗性を有するがん細胞の存在により、がんの再発が起こる。抗がん剤抵抗性の原因として、様々のがんにおいて高発現している熱ショックタンパク質 (HSP) が挙げられる。これまでに、HSP 70 や HSP 90 が有するがんの増殖や生存因子を制御機能に着目した阻害剤の研究が行われてきた。しかしながら、HSP 90 阻害剤は、HSP70 の誘導により、がん細胞のストレス抵抗性を亢進させる。一方、HSP 105 は単独では毒性を示さないことから有用性が低く見積もられてきたが、siRNA を用いたノックダウンによる腫瘍形成抑制が報告されており、有望な標的分子と考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗がん剤抵抗性の原因分子の一つである HSP を標的とする天然由来医薬シーズの探索およびがん再発予防薬の提案である。HPS は様々のがんにおいて高発現しており、抗がん剤によるアポトーシスを抑制することで抗がん剤抵抗性に関与していると考えられている。そのため様々な阻害剤が開発されてきたが、がん細胞増殖抑制試験において単独では毒性を示さない HSP105 阻害剤の開発研究は、ほとんどおこなわれていない。そこで、本研究では既存の抗がん剤との併用による抗がん剤感受性増強作用を指標とした活性評価を実施し、高活性成分の探索を行う。加えて、抗がん剤抵抗性の原因のひとつとして考えられているがん幹細胞に対する毒性作用を評価することで、がん再発予防に貢献できる化合物の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) オオハマボウ (*Hibiscus tiliaceus*)、カノコソウ (*Valeriana fauriei*)、カボス (*Citrus sphaerocarpa*)、エビスグサ (*Cassia obtusifolia*) 含有成分の単離および構造解析

研究素材として、活性を示したオオハマボウ (*Hibiscus tiliaceus*) 幹および枝部、カノコソウ (*Valeriana fauriei*) 根、カボス (*Citrus sphaerocarpa*) 果皮、エビスグサ (*Cassia obtusifolia*) 全草を用いた。単離、精製した成分の化学構造は、NMR および MS をはじめとする各種物理化学的データの解析により決定した。また、新規化合物の絶対立体配置は ECD スペクトルの解析により決定した。

(2) 抗がん剤感受性増強作用評価

単離した成分の抗がん剤感受性増強作用は、観察した Adriamycin (ADR) によるアポトーシス様細胞死を指標とし、24 時間ライブセルイメージング解析を用いて評価した。ADR は低濃度処理において細胞増殖抑制作用を示した一方で、細胞死は引き起こされない。このことから、ADR 単独処理群と ADR 低濃度処理併用群における死細胞数を比較検討した。

(3) がん細胞およびがん幹細胞毒性作用評価

単離した成分のがん細胞およびがん幹細胞毒性作用は、がん細胞およびスフィア形成法により作製したがん幹細胞を用いて、細胞生存率を評価した。

4. 研究成果

(1) オオハマボウ (*Hibiscus tiliaceus*)、カノコソウ (*Valeriana fauriei*)、カボス (*Citrus sphaerocarpa*)、エビスグサ (*Cassia obtusifolia*) 含有成分の単離および構造解析

オオハマボウ (*H. tiliaceus*) 幹および枝部含有成分の探索の結果、hibiscuscoumarin (1) と命名した 1 種の新規クマリン配糖体を単離、構造決定するとともに、seguinoside K (7) を含む 10 種の既知成分を単離、同定した (図 1)。

カノコソウ (*V. fauriei*) 根含有成分の探索の結果、valerianaterpenes IV および V (12 および 13)、valerianalignans I-III (14-16) と命名した新規セスキテルペノイドおよび新規リグナンを単離、構造決定するとともに、1 種の既知成分を単離、同定した (図 2)。

カボス (*C. sphaerocarpa*) 果皮含有成分の探索の結果、sphaerocarpain I および II (18 および 22) と命名した新規リモノイドを単離、構造決定するとともに、5 種の既知成分を単離、同定した (図 2)。

エビスグサ (*C. obtusifolia*) 全草含有成分の探索の結果、emodin を含む 13 種の既知成分を単離、同定した。

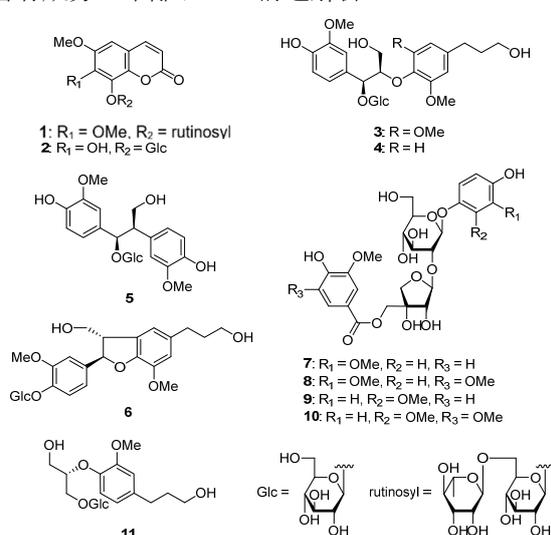


図 1 オオハマボウより得られた成分の化学構造 (1-11)

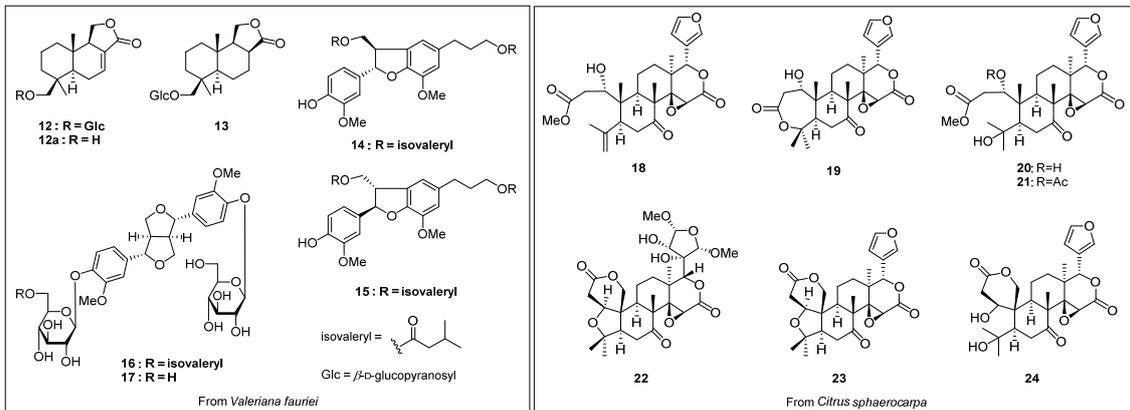


図2 カノコソウおよびカボスより得られた成分の化学構造 (12-24)

(2) オオハマボウ含有成分の抗がん剤感受性増強作用評価

オオハマボウ幹および枝部より得られた、計 11 種の成分について、被験成分単独および ADR との併用下でヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に与える影響を評価した。被験化合物処理後 (30 μ M)、24 時間ライブセルイメージング解析を行い、細胞増殖および細胞死に伴う形態変化を観察することで、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合を計測した。その結果、seguinoside K (7) が単独では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えず、ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった (図 3)。

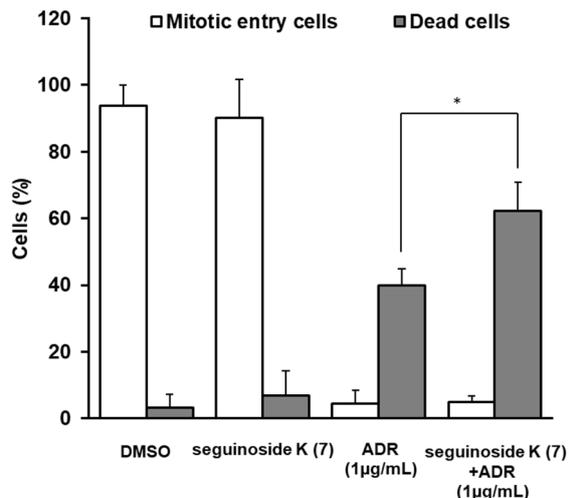


図3 seguinoside K (7)の抗がん剤感受性増強作用

(3) カノコソウおよびカボス含有成分のがん細胞およびがん幹細胞毒性作用評価

カノコソウ根より得られた計 7 種の成分について、ヒト神経膠芽腫 U-251 MG 細胞 (U-251 MG non-CSCs) およびスフィア形成法により作製した U-251 MG CSCs に対する細胞生存率を評価した。その結果、valerianalignans I および II (14 および 15) が non-CSCs および CSCs 双方に対し、細胞毒性作用を示すことが明らかになった (図 4)。

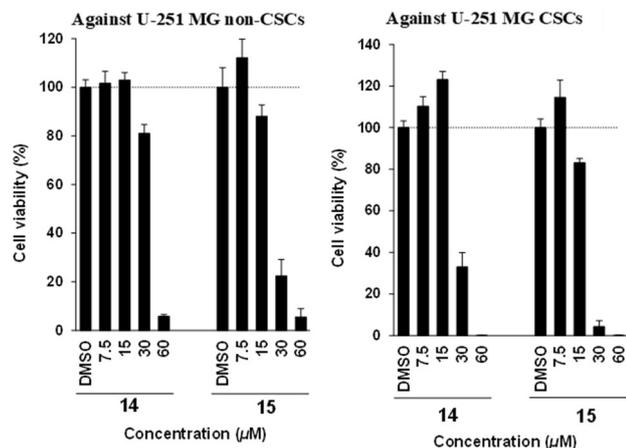


図4 Valerianalignans I および II (14 および 15) のがん細胞およびがん幹細胞毒性

カボス果皮より得られた計 7 種の成分について、U-251MG 細胞およびヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対して WST-8 assay によって、細胞生存率を評価した。その結果、両細胞において、sphaerocarpain I、methyl deacetylnomilate、sphaerocarpain II および ichangin (18、20、22、24) は細胞増殖率を有意に低下させ、U-251 MG 細胞における細胞増殖率はそれぞれ、75.3% (18)、80.4% (20)、81.0% (22)、66.4% (24)、SH-SY5Y 細胞における細胞増殖率は 70.6% (18)、81.9% (20)、76.2% (22)、67.0% (24) であった。また 21 および 23 は SH-SY5Y 細胞のみ有意に細胞増殖率を低下させた (図 5)。

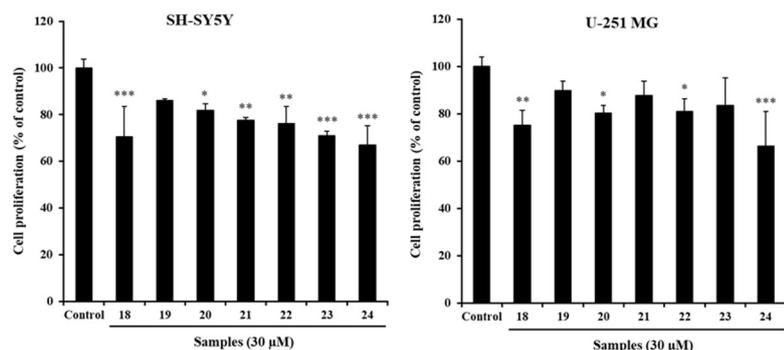


図5 カボス果皮より得られた成分 (18-24) のがん細胞毒性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Muraoka Takuya, Imahori Daisuke, Miyagi Rina, Shinohara Naoki, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Simultaneous high performance liquid chromatography analysis of anthraquinones in sicklepod sprouts with glucosidase inhibitory activity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Phytochemical Analysis	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） 10.1002/pca.3353	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 -
1. 著者名 Noguchi Kanta, Imahori Daisuke, Nishiura Riko, Nuntawong Poomraphie, Putalun Waraporn, Tanaka Hiroyuki, Morimoto Satoshi, Sakamoto Seiichi	4. 巻 174
2. 論文標題 Advanced quality assessment of Sanshishi (<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis) and Kampo medicines using a monoclonal antibody against geniposide	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 105829 ~ 105829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.fitote.2024.105829	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 -
1. 著者名 Muraoka Takuya, Imahori Daisuke, Miyagi Rina, Ohta Tomoe, Yoshida Tatsusada, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 106
2. 論文標題 Chemical Structures and Cytotoxic Activities of the Constituents Isolated from <i>Citrus sphaerocarpa</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 2094 ~ 2094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/COM-23-14924	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 -
1. 著者名 Matsumoto Takahiro, Yoshikawa Hayato, Kitagawa Takahiro, Imahori Daisuke, Ohta Tomoe, Yoshida Tatsusada, Watanabe Tetsushi	4. 巻 71
2. 論文標題 Chemical Structures and Anti-proliferative Effects of <i>Valeriana fauriei</i> Constituents on Cancer Stem Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 495 ~ 501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c21-00832	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 -

1. 著者名 Noguchi Kanta, Imahori Daisuke, Kido Yusuke, Nuntawong Poomraphie, Tanaka Hiroyuki, Morimoto Satoshi, Sakamoto Seiichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Quality assessment method for Chinpi, dried <i>Citrus</i> spp. peel and its derived Kampo medicines using specific monoclonal antibody against hesperidin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytochemical Analysis	6. 最初と最後の頁 652 ~ 660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pca.3255	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 -

1. 著者名 Matsumoto Takahiro, Kitagawa Takahiro, Imahori Daisuke, Watanabe Tetsushi	4. 巻 104
2. 論文標題 Chemical Structures and Cell Death Inducing Activities of Constituents Isolated from <i>Hibiscus tiliaceus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1477 ~ 1477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-22-14679	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今堀 大輔, 村岡 卓和, 宮城 里奈, 田中 宏幸
2. 発表標題 カボス (<i>Citrus sphaerocarpa</i>) 果皮からの新規機能性成分の探索
3. 学会等名 フォーラム2023衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村岡 卓和, 今堀 大輔, 宮城 里奈, 田中 宏幸
2. 発表標題 ハッサク (<i>Citrus hassaku</i>) 果皮からの新規機能成分の探索
3. 学会等名 フォーラム2023衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今堀 大輔, 村岡 卓和, 宮城 里奈, 田中 宏幸
2. 発表標題 カボス (Citrus sphaerocarpa)果皮より得られた成分の化学構造およびがん細胞毒性活性
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 村岡 卓和, 今堀 大輔, 宮城 里奈, 田中 宏幸
2. 発表標題 ハッサク (Citrus hassaku) 果皮より得られた成分の化学構造及びがん細胞毒性活性
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 梅田 智史, 今堀 大輔, 宮城 里奈, 村岡 卓和, 田中 宏幸, 尾家 重治
2. 発表標題 長門ユズキチ (Citrus Nagato-yuzukichi) 精油成分の同定および抗菌活性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------