

機関番号：21102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650463

研究課題名（和文）

カスパーゼ阻害活性を応用した食品成分の生理機能の解明

研究課題名（英文）

Physiological study of Food factor with caspase inhibitory activity

研究代表者

松江 一 (Matsue Hajime)

研究者番号：30106843

研究成果の概要（和文）：

イボタケ属のきのこから、多数の

-テレフェニル骨格を有する新規物質が単離・同定されているが、ヒト肝ガン細胞HepG2を目安にした抗腫瘍活性物質探索は無く、我々はVialinin A(VAと省略)を単離構造決定した。今年度我々はボタニイボタケからVAよりメチレン基が一個少ない新規物質Thelephantin-O(TOと省略)を単離し、LC-MS/MS分析、<sup>13</sup>C-NMRの化学シフトに及ぼす同位体効果分析により化学構造を同定した。TOとVAは、*p*-テレフェニル骨格の中央ベンゼン環に2つの水酸基がシス位で置換する特徴的構造を有しており、HepG2やCaco2の悪性腫瘍細胞の増殖を抑えるが、対応する正常細胞には何ら影響を与えない選択性を示した。さらに抗腫瘍機構解明のため、HepG2細胞に幾つかの濃度の活性物質を添加、48時間本培養を行い、細胞ライセートのカスパーゼ3/7活性を測定したところ、活性物質10 μg/mlでカスパーゼ3/7活性をほぼ100%阻害することが明らかとなった。この結果はこれらの化合物の選択的抗腫瘍活性は、アポトーシスが原因ではなく、他の径路に起因するものであることを示していた（現在論文投稿中）。

VAは強力な抗酸化性とヒト肝ガン細胞HepG2へのカスパーゼ阻害活性を併せ持つ生理作用を有することを明らかとしており、アルコールの慢性的な消費によって生じる金属の攪乱や酸化ストレスの増大が引き金となって引き起こされる肝障害を改善する生理効果がVAに期待されたため、慢性アルコール性肝障害モデルラットにVAを投与する動物実験を行った。VAをラットに投与する動物実験は本研究が世界で初めてであり、2010年ノーベル賞を受賞した鈴木宮浦のクロスカップリング反応を応用した合成法を用いてVAを大量に化学合成し天然物と一致することを確認後、それを用いて慢性的な過剰飲酒モデル動物への経口投与を行った。5週齢Wister系雄ラットを使用し、液体飼料であるLieber-DeCarli dietsのPFC比のC：47.5%のコントロール群と、C比の36%をアルコールに置換したアルコール投与群、さらにアルコール投与群と同じ食餌組成にVAを0.0002% (w/v)または0.001% (w/v) に調製した群の4群に分けた。アルコール投与群の食餌量を基準として、8週間pair-feedingを行った。VAの投与により肝臓や腎臓に毒性を示すような生化学的な異常、また体重や各臓器の増加、飼育期間中に異常がみられなかったが、VA投与群においては肝臓の酸化ストレスマーカーMDA値が減少する傾向がみられた。現在、VAの経口投与量を検討中である。

研究成果の概要（英文）：

*Thelephora aurantiotincta* belonging to the genus *Thelephora*, grows in symbiosis with pine trees. Several phytochemical investigations have revealed that the genus *Thelephora* is an abundant source of *p*-terphenyl derivatives with anti-oxidative and -allergic activities. However, in screening for natural materials with anticancer activity for human hepatocellular carcinoma cells (HepG2), we isolated and identified a new *p*-terphenyl derivative, thelephantin-O (TO), and a known compound, vialinin-A (VA), as the principal bioactive components using LC-MS/MS and 2-D NMR analysis of deuterium isotope effects on <sup>13</sup>C chemical shifts. These compounds with adjacent *cis*-phenolic dihydroxyl group decreased cell

viability in HepG2 and human colonic carcinoma cells (Caco2), but not in corresponding to noncancerous human cells. And we investigate its selective biological action mechanism and caspase 3/7 activities, as the results, 10 µg/mL of these compounds inhibited completely their activities. These results showed that anticancer activities of these compounds were not caused by apoptosis and were needed another pathway (will be published somewhere).

Judging from strong anti-oxidative and high caspase inhibitory activity of these compounds, we intended to examine the effects of these compounds on hepatic cirrhosis inflammation occurred with active-oxygen, caused by chronic alcohol consumption. At first, we chemically synthesized VA according to the method of Suzuki-Miyaura novel prize coupling for obtaining need for first trial animal experimental trial. Adult male Wistar rats were fed with a 36% Lieber-DeCarli ethanol-containing liquid diet or pair-fed control diet with or without 0.0002% and 0.001% VA (w/v) for 8 weeks. As the results, administration of VA did not show any toxicity and abnormal biochemical parameters, and any difference of food take and body weight provided by pair feeding between ethanol- and VA-fed rats during the study period. However, the TBARS levels were inclined to be higher in the chronic ethanol-fed group than VA-fed group. At present we try to adjust the amounts of oral dose VA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

### 1. 研究開始当初の背景

青森県は、全国4位の121%（カロリーベース H21年度）の食料自給率を有するが、経済的基盤は脆弱である。そのため、全国有数の農林水産資源に新たな機能性成分を見だし、県産食材に付加価値を与え、経済の発展、振興、さらには地産地消を促進する研究が望まれている。

青森県はキノコの宝庫であり、青森でも多量に収穫されるイボタケ属のキノコから、これまで多数の *p*-テレファニル骨格を有する新規物質が単離・同定されているが、ヒト肝ガン細胞 HepG2 を目安にした抗腫瘍活性物質探索は無かった。

### 2. 研究の目的

我々はボタニイボタケから Vialinin A (VA と省略) とは異なる新規物質 Thelephantin-O (TO と省略) を単離したので、その構造決定をすること。抗腫瘍活性機構の解明の一端として Caspase3/7 活性を測定すること。VA の動物試験用に化学合成により一定量の試料を確保すること。抗腫瘍活性において対応する正常細胞への効果を見ること。VA の動物試験として、慢性アルコール飲用による肝硬変モデルラットに対する効果を見ること。

### 3. 研究の方法

抗腫瘍活性物質 VA および TO の分離精製後、JMS-SX 102A (JEOL 社製) を使用した高分解能質量分析、TSKge1 ODS-80TsQA を用いた

LC-MS/MS 分析、alpha-400 spectrometer (JEOL 社製) を用いた <sup>1</sup>H=400 MHz、<sup>13</sup>C=100 MHz NMR 分析およびメタノール D<sub>4</sub> とメタノール D<sub>3</sub> を用いて <sup>13</sup>C NMR のケミカルシフトの重水素効果を評価した。抗がん作用の評価をヒトがん HepG2 および Caco2 細胞と対応する正常細胞の生存数を用いて抗がん作用を評価した。Caspase 3/7 Assay Kit, Homogeneous, Rh110, SensoLyte (ANA SPEC 社製) を用いて HepG2 および Caco2 細胞のカスパーゼ活性の測定を行った。

### 4. 研究成果

ボタニイボタケから Sep-Pak C<sub>18</sub> Vac、順相カラムおよび HPLC で HPLC 分析 (UV<sub>280 nm</sub>) 上シングルピークの VA と VO をそれぞれ 0.05 mg 及び 1mg 得、その構造を以下のように決定した (図 1)。

VA と VO の HepG2 と Caco2 の二つの

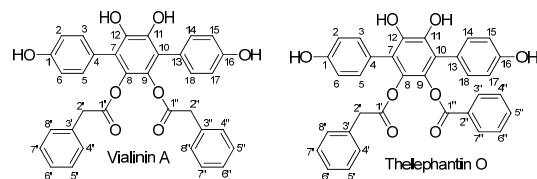


図1 VA と VO の構造式

腫瘍細胞と対応する正常細胞への作用は高い選択性を示した、即ち、腫瘍細胞抑制す

るが正常細胞には影響が無かった (表 1)。さらに VA と VO は強い Caspase3/7 阻害活性を示した (図 2)。

表 1 がん細胞と正常細胞に対する細胞毒性

	concn ( $\mu$ M)	cell viability (%)		
		HepG2	Caco2	hepatocytes
control	0	100.00 $\pm$ 4.61	100.00 $\pm$ 3.57	100.00 $\pm$ 3.42
vialinin A (isolated)	2	98.92 $\pm$ 5.14	88.78 $\pm$ 2.50**	96.79 $\pm$ 2.53
	4	77.98 $\pm$ 4.12**	80.36 $\pm$ 2.50**	99.19 $\pm$ 2.11
	8	38.85 $\pm$ 5.14**	55.41 $\pm$ 0.92**	97.18 $\pm$ 2.94
thelephantin O (isolated)	2	99.71 $\pm$ 1.95	103.45 $\pm$ 2.08	96.79 $\pm$ 2.53
	4	87.96 $\pm$ 0.68**	82.54 $\pm$ 6.39**	99.19 $\pm$ 2.11
	8	53.91 $\pm$ 3.34**	67.74 $\pm$ 2.34**	97.18 $\pm$ 2.94

<sup>a</sup> Cells were treated with 0–8  $\mu$ M vialinin A and thelephantin O for 48 h. Values are expressed as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Data were analyzed by ANOVA, followed by Tukey, to compare each group with the control. The differences between the means were significant at \*,  $p < 0.05$ , and \*\*,  $p < 0.01$ .

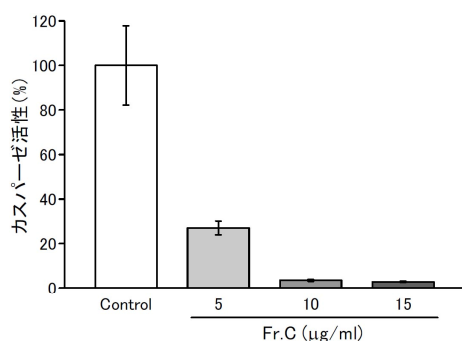


図 2 VA の Caspase3/7 阻害活性

VA と VO の強力な抗酸化性とヒトガン細胞 HepG2 および Caco2 へのカスパーゼ阻害活性から、アルコールの慢性的な消費によって生じる、活性酸素の増大や金属の攪乱によって起こる酸化ストレス性のアルコール性肝硬変を改善する生理的効果が VA と VO に期待された。

VA や VO をラットに投与する動物実験は本研究が世界で初めてであり、まず最初に 2010 年ノーベル賞を受賞した鈴木-宮浦のクロスカップリング反応を応用した合成法を用いて VA を大量に化学合成し天然物と一致することを確認後、それを用いて慢性的な過剰飲酒モデル動物への経口投与を行った。5 週齢 Wister 系雄ラットを使用し、液体飼料である Lieber-DeCarli diets の PFC 比の C : 47.5% のコントロール群と、C 比の 36% をアルコールに置換したアルコール投与群、さらにアルコール投与群と同じ食餌組成に VA を 0.0002% (w/v) または 0.001% (w/v) に調製した群の 4 群に分けた。アルコール投与群の食餌量を基準として、8 週間 pair-feeding を行った。

VA の投与により肝臓や腎臓に毒性を示すような生化学的な異常、また体重や各臓

器の増加、飼育期間中に異常がみられなかったが (表 2)、VA 投与群においては肝臓の酸化ストレスマーカー MDA 値が減少する傾向がみられた。現在、VA の経口投与量を検討中である

表 2 慢性アルコール飲用ラットの体重と臓器重量、体重に対する肝臓の割合に及ぼす VA の影響

		コントロール群		アルコール群		アルコール+VA0.0002%群		アルコール+VA0.001%群	
		平均 $\pm$ SE	平均 $\pm$ SE	平均 $\pm$ SE	平均 $\pm$ SE	平均 $\pm$ SE	平均 $\pm$ SE		
体重	(g)	446.7 $\pm$ 6.2	410.5 $\pm$ 12.7	395.8* $\pm$ 4	385.2** $\pm$ 15.9				
肝臓	(g)	11.1 $\pm$ 0.3	13.8* $\pm$ 0.4	14.1 $\pm$ 0.7	13.6 $\pm$ 1.2				
体重に対する肝臓の割合 (%)		2.5 $\pm$ 0.1	3.4* $\pm$ 0.1	3.6 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2				
腎臓	(g)	2.5 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1				

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs コントロール群 スチューデント検定 平均  $\pm$  SE

## 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 1 件)

T. Norikura, K. Fujiwara, Y. Morinaga and H. Matsue et. al.; Anticancer activities of thelephantin O and vialinin-A isolated from *Thelephora aurantincta*. *J. Agric., Food Chem.*, **59** (13), 6974-9, 2011.

[学会発表] (計 1 件)

T. Norikura, K. Fujiwara, Y. Morinaga and H. Matsue et. al.; Isolation and Identification of Thelephantin O and Vialinin-A with Anticancer Activity from *Thelephora aurantincta*. ICoFF 2011 (Poster award 受賞), Nov. 2011. Taipei, Taiwan.

乗鞍敏夫、藤原憲秀、松江一 他 1 名; ボタンイボタケの抗がん作用を示す生理活性物質の単離・同定, 2010 年度青森県保健医療福祉研究発表会, Jun. 2011. 青森市.

乗鞍敏夫、藤原憲秀、松江一 他 3 名; ボタンイボタケの抗がん作用の解明, 2011 年度日本農芸化学会大会, Mar. 2011. 京都市.

乗鞍敏夫、松江一; Thelephantin-O の抗がん作用における作用メカニズムの解明, 2011 年度青森県保健医療福祉研究発表会, Jun. 2011. 青森市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗腫瘍剤、カスパーゼ阻害剤、イボタケ属担子菌抽出物およびその製造方法

発明者: 乗鞍敏夫、松江一他 3 名

権利者: 公立大学法人青森県立保健大学

種類: 特願

番号: 2010-179878

出願年月日: 2010 年 08 月 10 日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松江 一(Matsue Hajime)

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：30106843

### (2) 研究分担者

藤原 憲秀(Fujiwara Kenshu)

青森県立保健大学・健康科学部・教授

研究者番号：20222268

乗鞍 敏夫(Norikura Toshio)

青森県立保健大学・健康科学部・助教

研究者番号：40468111

森永 八江(Morinaga Yae)

青森県立保健大学・健康科学部・助手

研究者番号：40404818

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：