

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710249

 研究課題名（和文）漢方処方からの腫瘍選択的アポトーシス誘導化合物の探索と
その作用機序の解析

 研究課題名（英文）Exploration of bioactive natural products which induce
selective apoptosis in tumor cells from Kampo formulas

研究代表者

當銘 一文（TOUME KAZUFUMI）

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80563981

研究成果の概要（和文）：

本研究では漢方処方等の天然素材について、腫瘍選択的アポトーシス誘導作用を指標としたスクリーニングを行い、それらから腫瘍細胞に選択的なアポトーシスを誘導することのできる低分子化合物の探索を行った。その結果、数種の活性化合物を得ることに成功し、その構造決定を行った。また、一部の化合物については、その作用機序に関する解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined extracts of natural resources including Kampo formulas for bioactive natural products which induce selective apoptosis in tumor cells. As a result of this screening study we have isolated several active compounds. The mode of action for isolated compounds was also investigated.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然物化学，TRAIL，アポトーシス，生物活性天然物

1. 研究開始当初の背景

Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)は、抗腫瘍性リガンドとして知られ、その受容体である Death Receptor (DR)を介したシグナル経路により細胞にアポトーシスを誘導する。DR4 および DR5 は細胞にアポトーシスを誘導できる。一方、正常細胞にはアポトーシスを誘導することができない（おとり）の受容体であるデコイレセプターがより多く存在することから、TRAILは腫瘍選択的にアポトーシスを誘導することができる。従って、このTRAIL経路を活性化することができれば、正常細胞に影響を与えることなくがん選択的に作用するがん治療の開発に貢献できると考えられる。このような背景のもと、TRAIL経路を活性化する天然化合物の発見をめざ

し、天然資源からのスクリーニング、探索を行った。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍選択的にアポトーシスを誘導することのできる TRAIL シグナル経路を活性化する天然化合物の発見を目的とした。また、見出した天然化合物の作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）収集した漢方処方エキスを含む天然資源エキスイブラリを探索源に TRAIL 経路活性化作用を指標としたスクリーニングを行った。スクリーニング試験には当研究室にてすでに構築している培養細胞を用いた下記の試験系を用いた。

TRAIL 耐性克服作用試験：TRAIL 耐性細胞であるヒト胃癌細胞 AGS 細胞株を用いる細胞生存率を指標とした試験系。TRAIL のみの処理では、細胞がもつ TRAIL 耐性のため、細胞生存率は変化しないが、TRAIL の感受性を上昇させる化合物すなわち TRAIL 耐性克服作用をもつ化合物を TRAIL と併用した場合、細胞生存率が低下する。

DR5 誘導作用試験：TRAIL の受容体である DR5 の発現を、DR5 プロモーターおよびルシフェラーゼレポーター遺伝子が発現している細胞 DLD1/SacI 細胞を用いたアッセイにより評価した。TRAIL 耐性克服作用をもつ化合物のいくつかは DR5 の誘導作用が知られている。

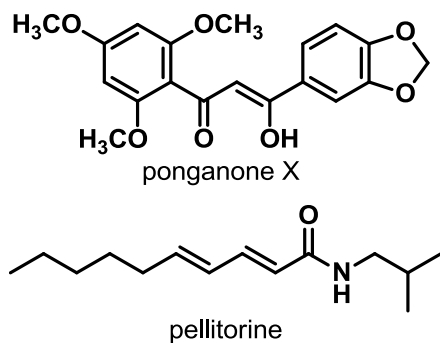
(2) 上記生物活性スクリーニング試験により選別したエキスについて、活性を指標とした成分の分画を行った。分画には、溶媒分配、各種カラムクロマトグラフィー（シリカゲル、ODS、Sephadex LH-20、ODS HPLC）を用いた。単離した化合物については NMR、MS などを中心としたスペクトルデータ解析による構造解析を行った。

(3) 得られた活性化合物の活性発現機構の解明を目指し、種々の生化学的手法（Western blotting 法、リアルタイム PCR 法など）を用いた TRAIL シグナル伝達関連因子の発現解析を行った。

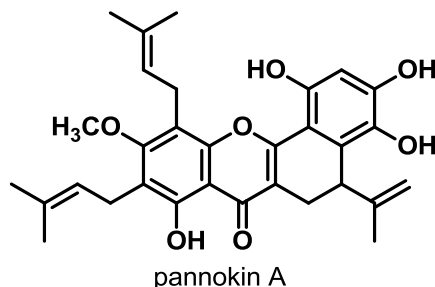
4. 研究成果

まず、漢方処方などの天然素材について DR5 誘導作用を指標としたスクリーニングを行ったところ、数種の試料に活性が認められた。

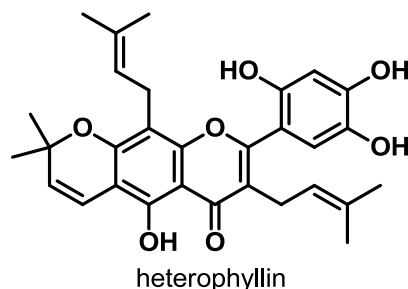
顕著な DR5 の誘導作用を示すことが判明した *Derris indica*, *Piper chaba* について成分探索を行ったところ、活性化合物として ponganone X などのフラボノイド誘導体 5 種、pellitorine などのアルカロイド類 4 種を単離し、その構造決定を行った。そのうち ponganone X, pellitorine は TRAIL 耐性 AGS 細胞において TRAIL 耐性克服作用をもつことが判明した。



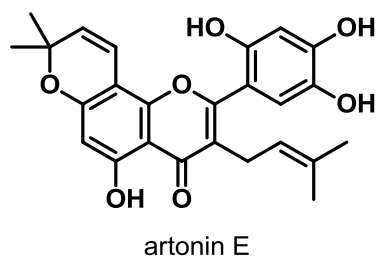
AGS 細胞において TRAIL 耐性克服作用を示した *Artocarpus communis*, *Artocarpus champeden* メタノール抽出物からは、活性成分として pannokin A-C などの新規化合物 5 種を含むプレニルフラボノイド類 18 種を単離した。（論文投稿中）



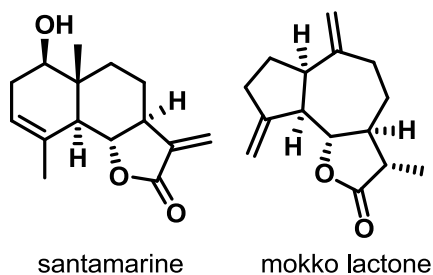
このうち、強力な活性を示した heterophyllin についてその TRAIL 耐性克服作用発現機構についてリアルタイム PCR、ウェスタンブロットにより解析を行った。その結果、本化合物は、デス受容体である DR4, 5 の発現を誘導し、カスパーゼの活性化を誘導することで、AGS 細胞において細胞死を誘導することが判明した。



本研究で最も強力な TRAIL 耐性克服作用を示した Artonin E は、がん細胞である AGS 細胞においては TRAIL 耐性克服作用を示したが、がん細胞由来ではないヒト胚性腎由来細胞 293T 細胞においては作用を示さなかったことから、本化合物はがん細胞に選択的に作用する可能性が示唆された。artoinin E の活性発現機構の解明を目的に検討を進めた結果、カスパーゼの関与が示唆された。



Saussurea hypoleuca からは活性成分として santamarine, mokko lactone などのセスキテルペン類 4 種を得た。



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 15 件) すべて査読有

1. Park, H.-Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "β-sitosterol and flavonoids isolated from *Bauhinia malabarica* found in a screening program for Wnt signal inhibitory activity" *J. Nat. Med.* in press (DOI: 10.1007/s11418-013-0762-3)
2. Minakawa, T.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Eudesmane-type Sesquiterpenoid and Guaianolides from *Kandelia candel* in a Screening Program for Compounds to Overcome TRAIL-resistance" *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1431-1435.
3. Tamai, Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. "Griseoviridin and cyclic hydroxamates found in a screening program for Wnt signal inhibitor" *Heterocycles* **2012**, 86, 1517-1524.
4. Toume, K.; Nakazawa, T.; Tahmina, H.; Ohtsuki, T.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "Cycloartane triterpenes and ingol diterpenes isolated from *Euphorbia neriifolia* in a screening program for death-receptor expression-enhancing activity" *Planta medica* **2012**, 78, 1370-1377.
5. Abdelfattah, M. S.; Toume, K.; Arai, M. A.; Masu, H.; Ishibashi, M. "Katorazone, a novel yellow pigment with 2-azaquinone-phenylhydrazone structure produced by *Streptomyces* sp. IFM 11307" *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 3346-3348.
6. Abdelfattah, M. S.; Toume, K.; Ishibashi, M. "Yoropyrazone, a new naphthopyridazone alkaloid isolated from *Streptomyces* sp. IFM 11307 and evaluation of its TRAIL resistance-overcoming activity" *J. Antibiot.* **2012**, 65, 245-248.
7. Yamaguchi, T.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ahmed, F.; Sadhu, S. K.; Ishibashi, M. "Phorbol esters with Wnt signal-augmenting effects isolated from *Excoecaria indica*" *Nat. Prod. Commun.* **2012**, 7, 475-477.
8. Tamai, Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Hayashida, A.; Kato, H.; Shizuri, Y.; Tsukamoto, S.; Ishibashi, M. "Nonactin and related compounds found in a screening program for Wnt signal inhibitory activity" *Heterocycles* **2012**, 84, 1245-1250.
9. Abdelfattah, M. S.; Toume, K.; Ishibashi, M. "New pyranonaphthoquinones and phenazine alkaloid isolated from *Streptomyces* sp. IFM 11307 with TRAIL resistance-overcoming activity" *J. Antibiot.* **2011**, 64, 729-734.
10. Abdelfattah, M. S.; Toume, K.; Ishibashi, M. "Izumiphenazine D, new phenazoquinoline N-oxide from *Streptomyces* sp. IFM 11204" *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 508-510.
11. Toume, K.; Nakazawa, T.; Ohtsuki, T.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "Cycloartane triterpenes isolated from *Combretum quadrangulare* in a screening program for death-receptor expression enhancing activity" *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 249-255.
12. Abdelfattah, M. S.; Toume, K.; Ishibashi, M. "Isolation and structure elucidation of izuminosides A-C: a rare phenazine glycosides from *Streptomyces* sp. IFM 11260" *J. Antibiot.* **2011**, 64, 271-275.
13. Ippongi, Y.; Ohtsuki, T.; Toume, K.; Arai, M. A.; Yamamoto, Y.; Ishibashi, M. "Tubiferic acid, a new 9,10-secocycloartane triterpenoid acid isolated from the myxomycete *Tubulifera arachnoidea*" *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 59, 279-281.
14. Mori, N.; Toume, K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "2-Methoxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Impatiens balsamina* in a screening program for activity to inhibit Wnt signaling" *J. Nat. Med.* **2011**, 65, 234-236.
15. Ahmed, F.; Toume, K.; Ohtsuki, T.; Rahman, M.; Sadhu, S. K.; Ishibashi, M. "Cryptolepine, isolated from *Sida acuta*, sensitizes human gastric adenocarcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis" *Phytotherapy Research* **2011**, 25, 147-150.

[学会発表] (計 25 件)

1. 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea からの Wnt シグナル阻害作用をもつカルデノリド" 第 19 回天然薬物の開発と

- 応用シンポジウム講演要旨集 88-90 (2012.11.2) 大阪
2. 神谷謙太郎, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Xylocarpus granatum からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然化合物の探索" 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム講演要旨集 85-87 (2012.11.2) 大阪
 3. 皆川朋皓, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "TRAIL 耐性克服作用をもつ天然物の探索: *Artocarpus champeden* のプレニルフラボン成分", 第 56 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨集 331-333 (2012.10.28) 鹿児島
 4. M. Abdelfattah, 當銘一文, 荒井緑, 石橋正己, "千葉産放線菌由来新規生物活性芳香族複素環化合物", 第 54 回天然有機化合物討論会講演要旨集 43-48 (2012.9.18) 東京
 5. 塚原健太郎, 當銘一文, 石橋正己, "細胞毒性を有する放線菌由来マクロラクタム", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 233 (2012.9.18) 千葉
 6. 神谷謙太郎, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Xylocarpus granatum 由来の Wnt シグナル阻害作用をもつ新規リモノイド", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 222 (2012.9.18) 千葉
 7. R. G. Fuentes, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "Search for bioactive natural products from *Curcuma comosa* with Wnt signal inhibitory activity", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 221 (2012.9.18) 千葉
 8. 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Calotropis gigantea* 由来の Wnt シグナル阻害するカルデノライド", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 220 (2012.9.18) 千葉
 9. 土生理, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Artocarpus communis* 等からの TRAIL 耐性克服作用を有する天然物の探索", 日本生薬学会第 59 年会講演要旨集 155 (2012.9.17) 千葉
 10. 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Cardenolides Isolated from *Calotropis gigantea* with Wnt Signaling Inhibitory Activity", The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy, 330, (2012.8.24-25) Seoul, Korea
 11. 石橋正己, 荒井緑, 當銘一文, "疾患および再生シグナルに作用する天然物の探索", 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第 2 回公開シンポジウム講演要旨集 17-18 (2012.6.18) 東京
 12. 神谷謙太郎, 當銘一文, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 荒井緑, 石橋正己, "Wnt シグナル阻害作用をもつ *Xylocarpus granatum* 由来の新規リモノイド", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.31) 札幌
 13. M. Abdelfattah, 當銘一文, 石橋正己, "*Streptomyces* sp. IFM11307 から単離した TRAIL 耐性克服作用をもつグリセウシン類エナンチオマー", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.31) 札幌
 14. 皆川朋皓, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "*Artocarpus champeden* からの TRAIL 耐性克服作用を有する天然物の探索", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.31) 札幌
 15. 土生理, 當銘一文, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "*Artocarpus communis* からの TRAIL 耐性克服作用を有する天然物の探索", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.31) 札幌
 16. T. Hoque, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Derris indica* 等からのデス受容体誘導作用をもつ天然物の探索", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.31) 札幌
 17. 塚原健太郎, 當銘一文, 石橋正己, "海洋放線菌から単離した TRAIL 耐性克服作用をもつクロモマイシン類", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.30) 札幌
 18. 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Calotropis gigantea* からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然物の探索", 日本薬学会第 132 年会 (2012.3.29) 札幌
 19. 石橋正己, 新谷彰教, 當銘一文, 荒井緑, "ピロン環およびビスインドール骨格を含む変形菌の化学成分", 第 41 回複素環化学討論会講演要旨集 356-357 (2011.10.25) 熊本
 20. 皆川朋皓, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Kandelia candel* からの TRAIL 耐性克服作用を有する天然物の探索", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 139 (2011.9.28) 東京
 21. 神谷謙太郎, 森直美, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Xylocarpus granatum* からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然物の探索", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 138 (2011.9.28) 東京
 22. Hoque Tahmina, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Search for bioactive constituents from *Derris indica* with DR5 promoter activity", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 217 (2011.9.27)

- 東京
23. 朴賢英, 當銘一文, 荒井緑, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "Calotropis gigantea からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然物の探索", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 216 (2011.9.27) 東京
 24. 玉井佑弥, 當銘一文, 荒井緑, 石橋正己, "放線菌からの Wnt シグナル阻害作用をもつ天然物の探索", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 215 (2011.9.27) 東京
 25. **【招待講演】** 當銘一文, 荒井緑, 石橋正己, "ウィントシグナルを制御する天然物の探索", 日本生薬学会第 58 年会講演要旨集 39-40 (2011.9.27) 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「エルモニン」

発明者: 石橋正己・塚原健太郎・當銘一文

権利者: 千葉大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-068062

出願年月日: 2013 年 3 月 28 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/kouzou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

當銘 一文 (TOUME KAZUFUMI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 80563981