

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510314

研究課題名(和文) 栄養飢餓耐性を有する膵臓がん細胞の代謝学的特徴および耐性関連バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for the antiausterity agents induced metabolomic biomarkers associated with the tolerance of nutrition starvation in pancreatic cancer

研究代表者

Suresh Awale (Awale, Suresh)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：00377243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PANC-1のようなヒト膵臓癌細胞は正常細胞と異なる代謝様式を持っていて、極端な栄養飢餓条件に耐えて生き残れる。癌細胞の栄養飢餓条件下の生存力を抑える候補薬物に注目する探索は「抗緊縮戦略」という抗がん剤探索領域での新規方法である。我々は、Uvaria dac, Caesalpinia sappan, Artocarpus altilisなどの薬用植物を検討し、合計32個の新規化合物を単離した。抗緊縮活性を示した単離化合物の作用機序はプロテオミクスとメタボロミクス分析により検討した。

研究成果の概要(英文)：Human pancreatic cancer cell lines, such as PANC-1 have altered metabolism, which enables them to tolerate and survive under the extreme nutrient starvation condition. Search for candidates that inhibit their viability during nutrition starvation represents a novel anti-austerity strategy in anticancer drug discovery. We investigated selected medicinal plants such as Uvaria dac, Caesalpinia sappan, Artocarpus altilis as a potential source for anti-austerity agents. A total of thirty-two new compounds were isolated. The mechanism of action of selected active anti-austerity agents was investigated by proteomic and metabolomic analysis.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：Pancreatic cancer PANC-1 Antiausterity strategy metabolomics Biomarker Drug Discovery

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は一般的に無秩序かつ急速に増殖できる特性をもつですが、形成された腫瘍血管系が脆弱かつ不規則であるため、栄養や酸素の欠乏した環境に晒されることになる。しかしながら、がん細胞は低栄養・低酸素といった極限状態におかれると、エネルギー代謝を変えることで生存する特有の耐性機構を示す。特に、PANC-1のようなヒト膵臓がん細胞はこのような耐性を獲得しており、低栄養・低酸素といった厳しい環境下においても長期間の生存が可能となっている。従って、がん細胞の栄養飢餓耐性を解除する化合物 (antiausterity agent) は新たな抗がん剤探索の標的と考えられる。ほとんどの膵臓がん患者は速やかに転移を起こし、短期間で死に至る。これまで膵臓がんに対する有効な薬はなく、従来の抗がん剤に対しては耐性を示す。それゆえ、栄養飢餓耐性を標的とする天然抗がん物質の探索は、治療戦略において重要な研究課題の一つであると考えられる。

今まで、我々は見つけたブチロラクトンリグナンアルクチゲニン (Arctigenin) という化合物は栄養飢餓条件下数種のヒト膵臓癌細胞株に対する選択的な細胞毒性を示す、但し通常栄養条件下その毒性を示さないことを発見した。漢方由来かつヒト膵臓癌細胞株に選択的な細胞毒性を示す化合物の発見は初めてであった。Arctigenin は $1\mu\text{M}$ の微濃度でも栄養飢餓条件下の膵臓癌細胞を選択的に 100% 殺すことができる。更に、異種移植モデルでの *in vivo* 実験を行い、結果として、Arctigenin は膵臓腫瘍の増殖を強力的に抑制し、優れた安全性プロファイルを示した。このエキサイティングな発見より、Arctigenin は抗膵臓癌剤として選ばれ、国立がんセンター東病院にてヒト臨床試験を行った。結果として、Arctigenin は膵臓癌患者に対して優れた臨床効果と生存率を示し、非常に有望な抗膵臓癌剤であることを確認できた。従って、抗緊縮薬の発見に努力することは継続すべきである。重要なことは、現状では、プロテオミクスまたはメタボロミクスレベルにおいて抗緊縮薬の作用機序はまた十分に解明されていないことである。抗緊縮薬の主要な作用標的を発見することは、膵臓癌の治療に新たな視点を提供できると考えられる。

2. 研究の目的

本プロジェクトは、抗緊縮スクリーニング方法を用いて、薬用植物から新規抗膵臓がん剤を発見することを目的とした。更に、がん細胞プロテオミクスおよびメタボローム分析を使用し選択された抗緊縮剤の作用機序を解明した。

3. 研究の方法

広範な分光技術を用いて、活性薬用植物から抗がん化合物の単離と同定を行った。まずは、

MPLC、HPLC などを含む最先端のクロマトグラフィ技術を使用し、選択された薬用植物から活性成分を精製した。その次は、広範な分光分析 [NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC, and ROESY), MS, UV, IR, CD, X-ray] を使用し化合物を同定した。抗緊縮薬の作用標的を解明するため、ウエスタンブロット法および蛍光顕微鏡法を用いて、活性化合物の選択的細胞毒性を評価し作用機序を検討した。ヒト膵臓 PANC-1 細胞における選択された抗緊縮剤によって誘発された代謝変化は FT-NMR 分光分析データにより解明した。

4. 研究成果

I. *Uvaria dac* 由来の抗緊縮薬の発見及び (+)-Grandifloracin 作用機序の研究

Uvaria dac 茎のジクロロメタン抽出物は、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で栄養欠乏条件下の PANC-1 ヒト膵臓癌細胞の生存を選択的に阻害する作用を示した。当該生物活性抽出物から、4 つのヒト膵臓癌細胞株 PANC-1 (PC_{50} , $14.5\mu\text{M}$), PSN-1 (PC_{50} , $32.6\mu\text{M}$), MIA PaCa-2 (PC_{50} , $17.5\mu\text{M}$), 及び KLM-1 ($32.7\mu\text{M}$) に対して強力な抗緊縮活性を有する化合物 (+)-grandifloracin を発見した。(+)-grandifloracin の絶対立体化学は、単結晶 X 線結晶解析および円偏光二色性分光分析により解明した。更には、11 種の新規高酸素化シクロヘキセン誘導体、すなわち、uvaridacanes A (1) and B (2), uvaridacols A-H (3, 4, 6-11), and uvaridapoxide A (5) も単離し、構造を解明した (図-1)。

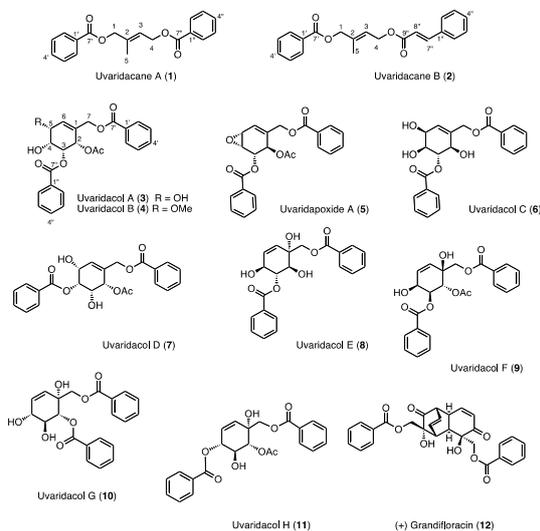


図-1. *Uvaria dac* から単離された化合物の構造

単離された化合物の中に、grandifloracin (GF) は癌細胞の栄養飢餓耐性を濃度依存的に著しく低下した。栄養欠乏培地 (NDM) において、 $25\mu\text{M}$ の GF に曝露された細胞は、 $14.5\mu\text{M}$ の PC_{50} 値で 24 時間以内に細胞死 100% となった。一方、栄養豊富培地 (DMEM) における癌細胞に

対して、GF は毒性を示しなかった (図-2A)。更に、アミノ酸の有無に関わらず、GF はグルコース或いは血清欠乏時の癌細胞に対して有毒であることを発見した (図-2B)。栄養欠乏培地において GF により誘導された細胞死のタイプを研究するために、細胞形態を検討した。PANC-1 細胞の形態は 25 μ M の GF の添加によって著しく変化された。蛍光色素標識 annexin V (AV) と propidium iodide (PI) 試薬でこれらの細胞の染色により、AV と PI 陽性の細胞数が著しく増加したため、細胞死は壊死 (ネクローシス) であることが考えられる (図-2C)。

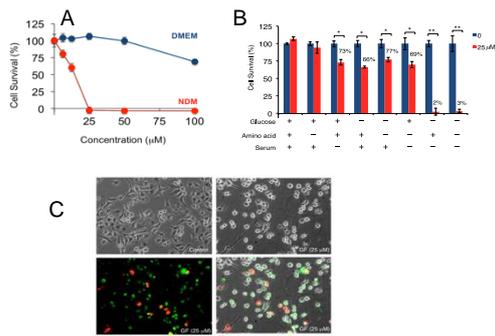


図-2. 栄養欠乏培地 (NDM) と栄養豊富培地 (DMEM) における PANC-1 細胞の 24 時間生存率に対する (+)-grandifloracin (GF) の効果 (図 A)。多様な栄養条件下の GF の細胞毒性 (図 B)。GF (25 μ M) の 8 時間処理によって誘導された PANC-1 細胞の形態学的変化。

栄養欠乏培地 (NDM) と栄養豊富培地 (DMEM) に増殖する PANC-1 細胞を用いて、細胞に対する選択的毒性について GF と従来の抗がん剤 (ゲムシタビン、5-FU、2-DG、パクリタキセル、カンプトテシン、およびポドフィロトキシンなど) を比較した (図-3)。

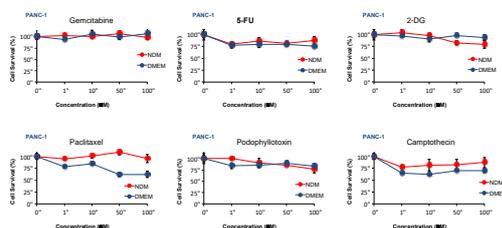


図-3. 栄養欠乏培地 (NDM) と栄養豊富培地 (DMEM) における PANC-1 細胞の 24 時間生存率に対する従来の抗がん剤の効果

AKT は、大多数の腫瘍において活性化される生存促進因子であり、細胞周期の進行、細胞遊走・浸潤、及び血管新生などの細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。Akt の高活性化は栄養飢餓に対する耐性と緊縮環境における生存性を示すマーカーである。本研究では、栄養欠乏培地 (NDM) に増殖する癌細胞の Akt における Ser473 のリン酸化は GF によ

って濃度依存的に且つ時間依存的に完全に阻害されることを発見した。栄養欠乏環境下の癌細胞は、生存し続けるためオートファジー (自食反応、緊縮のバイオマーカーである) を誘導するなどの対策を生み出すことができる。従って、オートファジーのマーカーである LC3、[LC3-I (16 kDa) と LC3-II (14 kDa)] の発現をウエスタンブロット法によって測定した。図-4 に示すように、LC3-I と LC3-II の両方の発現は、GF の処理によって濃度依存的に且つ時間依存的に増加した。栄養欠乏培地 (NDM) において、GF 処理 2 時間、3.5 時間、6 時間後の LC3-I の発現は、コントロールと比較してそれぞれ 8 倍、13 倍、22 倍に漸増した。同様に、GF 処理 2 時間、3.5 時間、6 時間後の LC3-II の発現は、コントロールと比較してそれぞれ 141 倍、146 倍、659 倍に漸増した (図-4)。この結果から、GF は、オートファジーのマーカーを過剰に活性化させることにより PANC-1 細胞死を誘導した (細胞を自殺させた) と考えられる。従って、オートファジーを過剰に活性化させることは抗緊縮剤作用の新たなメカニズムであることを発見した。

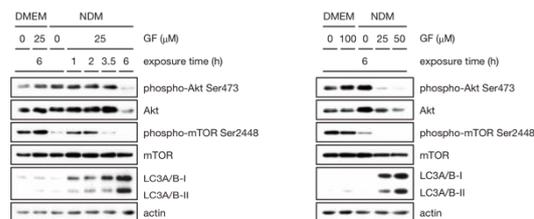


図-4. 重要なタンパク質 Akt、mTOR、LC3A/B I と II に対する (+)-grandifloracin (GF) の影響

癌細胞は緊縮状態に陥ると、エネルギー代謝を変化することにより栄養飢餓に対する耐性の獲得ができる。抗緊縮剤によって誘導された癌細胞代謝変化を判明するため、抗緊縮剤処理後の癌細胞培地の FT-NMR プロファイルを検討した。抗緊縮剤と PANC-1 ヒト膵臓癌細胞株を培養後、培地中に放出された代謝物の水性相抽出物の代表的な 1 H-NMR スペクトル、及び識別された代謝物は、図-5 に示されている。抗緊縮剤による処理は、特にコリンおよび乳酸代謝に関連する 2 つの主要な細胞代謝物を変調した。Arctigenin、grandifloracin 及び抗緊縮活性を示したプロポリス抽出物は、PANC-1 細胞中の乳酸の産生を大幅に阻害した。癌細胞は、好氣的解糖を行うことによって、癌細胞の制御できない増殖にエネルギーを供給することが知られている (ワールブルグ効果)。好氣的解糖過程では、グルコースは優先的に異化 (分解) されて乳酸に代謝され、それと伴って ATP は急速に生成される。乳酸は腫瘍環境の酸性化、炎症反応の誘発、及び腫瘍細胞の増殖や転移の促進に働きしており、乳酸生成レベルの上昇は、膵臓癌を含む大部分の腫瘍にとってメタボロームのマーカーにな

る。本研究では、試験抗緊縮剤の処理により乳酸の生成は著しく低下し、この低下は細胞死につながると考えられる。

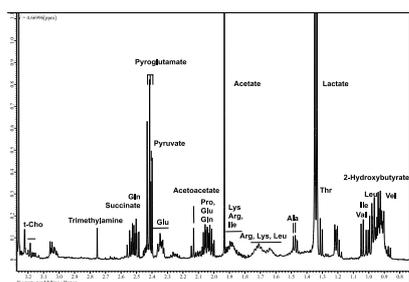


図-5. PANC-1 細胞の培地に放出された代表的な代謝物

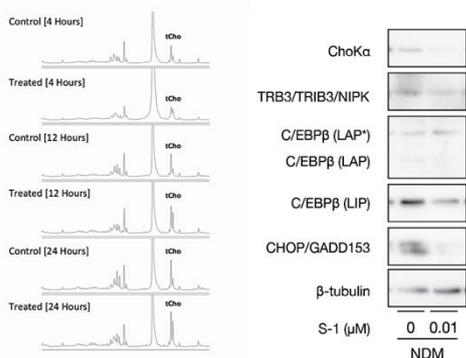


図-6. コリン代謝物の変動

II. スオウ種子の酢酸エチル抽出物は、栄養欠乏培地中の PANC-1 ヒト膵臓癌細胞に対して選択的な細胞毒性を示し、 PC_{50} 値 (PC_{50} は濃度のことであり、この濃度で栄養欠乏培地における細胞の 50% は選択的に殺されるが、栄養豊富培地における細胞は殺されないである。) は $43.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった。植物化学物質の検討により、3 個の生物遺伝的に排他的 cleistanthane 型の新規 diterpenes (tomocinon, tomocinol A, and tomocinol B)、9 個の新規 cassane diterpenes (tomocin A-I)、3 個の既知化合物を単離出来た。Cleistanthane diterpenes は、栄養欠乏培地における PANC-1 ヒト膵臓癌細胞株に対して選択的な細胞毒性を示し、 PC_{50} 値はそれぞれ $34.7 \mu\text{M}$, $42.4 \mu\text{M}$ と $39.4 \mu\text{M}$ であった。 $50 \mu\text{M}$ の tomocinon の存在により、PANC-1 細胞の形態が大幅に変化され、EB/AO 染色後完全な赤蛍光が観察された。この結果から、100% の細胞死が示唆されている。Cleistanthane diterpenes は、抗膵臓癌剤の研究開発において主導目標になれる可能性のある新規抗緊縮剤クラスを表す。

III. パンノキ属の *Artocarpus altilis* (クワ科) の葉のメタノール抽出物は $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ で栄養欠乏状態下の PANC-1 細胞に対して選択的な細胞毒性 100% を示した。この抽出物のさらなる植物化学研究から、sakinAH (1-8) という名付けの 8 個の新規 dihydrochalcones と 4 個の既知化合物が単離できた (図-7)。

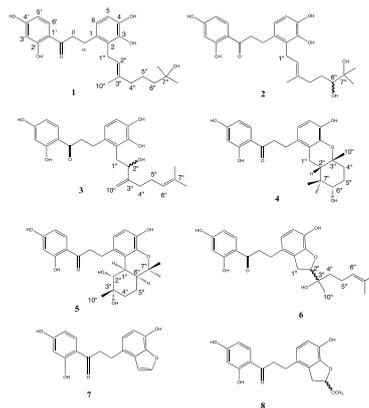


図-7. *Artocarpus altilis* から単離した化合物の構造

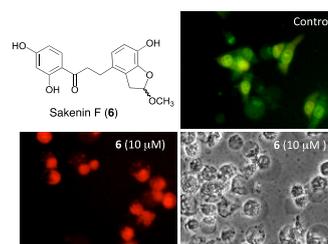


図-8. Sakenin F (6) に誘発された PANC-1 細胞の形態の変化

単離した化合物を用いて、antiausterity スクリーニング方法を利用し、栄養欠乏培地 (NDM) と栄養豊富培地 (DMEM) における PANC-1 ヒト膵臓癌細胞に対する細胞毒性について検討した。検討した全ての dihydrochalcones は、栄養豊富状態下の細胞に明らかな毒性を示しなかったが、栄養欠乏状態下の細胞に選択的な細胞毒性を示した。

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 9 件)

(1) Nguyen H. X., Nguyen N. T., Dang P. H., Thi P. H., Nguyen M. T. T., Can M. V., Dibwe D. F., Ueda J., Awale S. Cassane diterpenes from the seed kernels of *Caesalpinia sappan*. *Phytochemistry*, 122: 286-293 (2016).

(2) Farley C. M., Dibwe D. F., Ueda J., Hall E. A., Awale S., Magolan J. Evaluation of Synthetic Coumarins for Antiausterity Cytotoxicity against Pancreatic Cancers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26: 1471-1474 (2016).

(3) Nguyen M. T. T., Nguyen N. T., Awale S. Prenylated Dihydrochalcones from *Artocarpus altilis* as Antiausterity Agents. *The Enzymes*, 37: 95-110 (2015).

(4) Ueda J., Athikomkulchai S., Miyatake R., Saiki I., Esumi H., Awale S. (+)-Grandifloracin, a novel Antiausterity Agent, Induces Autophagic PANC-1 Pancreatic Cancer Cell Death. *Drug Des. Dev. Ther.*, 8: 39-47 (2014).

(5) Nguyen M.T.T., Nguyen N.T., Nguyen K.D.H., Dau H.T.T., Nguyen H.X., Dang P.H., Le T.M., Phan T.H.N., Tran A.H., Nguyen B.D., Ueda J., Awale S. Geranyl dihydrochalcones from *Artocarpus altilis* and their antiausteric activity. *Planta Med.*, 80: 193-200 (2014).

(6) Shakya B., Yadav P.N., Ueda J., Awale S. Discovery of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones as potent antiausterity agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24: 458-461(2014).

(7) Nguyen H.X., Nguyen M.T.T., Nguyen T.A., Nguyen N.Y.T., Phan D.A.T., Ho P.T., Phan T.H.N., Dang P.H., Nguyen N.T., Ueda J., Awale S. Cleistanthane Diterpenes from the Seed of *Caesalpinia sappan* and their antiausteric activity against PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *Fitoterapia*, 91: 148-153 (2013).

(8) Awale S., Ueda J., Athikomkulchai S., Dibwe D.F., Abdelhamed S., Yokoyama S., Saiki I., Miyatake R. Uvaridacols E-H, Highly Oxygenated Antiausterity Agents from *Uvaria dac.* *J. Nat. Prod.* 75: 1999-2002(2012).

(9) Awale S., Ueda J., Athikomkulchai S., Abdelhamed S., Yokoyama S., Saiki I., Miyatake R. Antiausterity Agents from *Uvaria dac* and Their Preferential Cytotoxic Activity against Human Pancreatic Cancer Cell Lines in a Nutrient-Deprived Condition. *J. Nat. Prod.*, 75: 1177-1183(2012).

[学会発表] (計 25 件)

(1) Suresh Awale, Jun-ya Ueda, Dya Fita Dibwe, Mai Thanh Thi Nguyen: Chemical constituents of *Artocarpus altilis* from Vietnam and their antiausterity activity. 日本薬学会第 135 年会, 2016, 横浜 .

(2) Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Drug discovery for pancreatic cancer: chemical constituents of *Uvaria dac* and their antiausterity activity against human pancreatic cancer cell lines. The 8th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences "Biomolecule-

Based Medicinal Science: Featuring Mid-Size Drugs" 2016, Osaka.

(3) Suresh Awale, Jun-ya Ueda, Bhushan Shakya, Paras Nath Yadav: Discovery of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones as potent antiausterity agents. 日本薬学会第 135 年会, 2015, 神戸.

(4) Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Anti-austeric constituents of Japanese Cypress *Chamaecyparis obtusa*. 日本薬学会第 135 年会, 2015, 神戸

(5) Jun-ya Ueda, Ahmed M. Tawila, Sirivan Athikomkulchai, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale: タイ産植物 *Uvaria dac* 葉部由来新規 tetrahydrobenzyl benzoate 誘導体の構造. 日本薬学会第 135 年会, 2015, 神戸.

(6) Dya Fita Dibwe, Suresh Awale: Hinoki (ヒノキ, 檜) from Toyama: A potential source for the novel anti-pancreatic cancer drug discovery. 平成 27 年度富山大学若手研究者等の学術交流・発表会、2015, 富山.

(7) Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Preferential cytotoxic activity of Brazilian green propolis and sesamin powder extracts against a panel of five human pancreatic cancer cell line 日本生薬学会第 62 回年会, 2015, 岐阜.

(8) Suresh Awale, Dya Fita Dibwe: Chemical constituents of the Japanese cypress "Hinoki" and their anti-austerity activity against human pancreatic cancer cell lines. 14th Annual Conference of Japan-China Joint Society for Clinical and Traditional Medicine, 2015, Toyama.

(9) Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Anti-austerity activity of Brazilian green propolis extract against human pancreatic cancer cell lines, 14th Annual Conference of Japan-China Joint Society for Clinical and Traditional Medicine, 2015, Toyama.

(10) Suresh Awale: Drug Discovery for Pancreatic Cancer: Strategies and Leads from Natural Medicine. National Chiayi University, 2015, Chiayi, Taiwan

(11) Suresh Awale: Discovery of Natural anti-cancer agents that Retard Cancer Cell's Tolerance to Nutrition Starvation. 富山発先端 ライフ サイエンス 若手育成拠

点 シンポジウム、2015、富山。

(12) Suresh Awale: Discovering the natural anticancer agents targeting cancer cells tolerance to nutrition starvation: Antiausterity strategy in anticancer drug discovery. The 8th International Symposium on Fermented Korean Medicines (ISOF2014) & International Conference of the Plant Resources Society of Korea, 2014, Jecheon, South Korea.

(13) Bhushan Shakya, Paras Nath Yadav, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Piperazine-1-carbonothiol picolinohydrazone amides and their preferential cytotoxicity against human pancreatic cancer cell lines. Second International Conference Kathmandu Autumn School on Chemistry and Chemical Technologies (KASChem-2014 Nano and Bio), 2014, Kathmandu, Nepal.

(14) Suresh Awale: Revisiting traditional medicines for drug discovery against pancreatic cancer. International Conference on Advanced Material and Nanotechnology (ICAMN-2014) for Sustainable Development, 2014, Kathmandu, Nepal.

(15) Jun-ya Ueda, Sirivan Athikomkulchai, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale: Drug discovery for pancreatic cancer: chemical constituents of *Uvaria dac* and their antiausterity activity against human pancreatic cancer cell lines. International Conference on Advanced Material and Nanotechnology (ICAMN-2014) for Sustainable Development, 2014, Kathmandu, Nepal.

(16) Bhushan Shakya, Paras Nath Yadav, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Discovery of 2-pyridineformamide thiosemicarbazones as potent antiausterity agents. International Conference on Advanced Material and Nanotechnology (ICAMN-2014) for Sustainable Development, 2014, Kathmandu, Nepal.

(17) Suresh Awale, Jun-ya Ueda, Xuan Hai Nguyen, Trung Nhan Nguyen, Thi Thanh Mai Nguyen : Novel cleistanthane-type diterpenes from the seed of *Caesalpinia sappan* and their antiausterity against PANC-1 human pancreatic cancer cell line. 日本薬学会第 134 年会, 2014, 熊本

(18) Suresh Awale: Drug discovery for

pancreatic cancer: Strategies and leads from natural medicine. 天然薬物研究方法論アカデミー第 17 回シンポジウム, 2014, 富山.

(19) Jun-ya Ueda, Ahmed M Tawila, Sirivan Athikomkulchai, Dya Fita Dibwe, Suresh Awale: *Uvaria dac* 葉部から単離した methylcyclohexane 誘導体. 日本生薬学会第 61 回年会, 2014, 福岡.

(20) Suresh Awale: Anti-austerity strategy based anticancer drug discovery, recent advances and future perspectives. 2013 International Symposium on Small Chemicals Structural Elucidation and Bioactivities and Applications, 2013, Chiayi, Taiwan.

(21) Jun-ya Ueda, Sirivan Athikomkulchai, Suresh Awale: (+)-Grandifloracin の栄養飢餓条件におけるヒト膵臓がん細胞 PANC-1 に対する細胞毒性活性. 日本生薬学会第 60 回年会, 2013, 北海道.

(22) Suresh Awale, Jun-ya Ueda, Sirivan Athikomkulchai: New Highly Oxygenated Antiausterity Agents from *Uvaria dac*. 日本薬学会第 133 年会, 2013, 横浜

(23) Suresh Awale: 天然物から創薬に向けて. フォーラム富山「創薬」第 38 回研究会, 2013, 富山.

(24) Bhushan Shakya, Paras Nath Yadav, Jun-ya Ueda, Suresh Awale: Synthesis of N(4) substituted 2-pyridineformamide thiosemicarbazones as potential anti-austerity agents that targets cancer cells tolerance to nutrition starvation. Bangladesh Chemical Congress 2012 (35th Annual Conference of Bangladesh Chemical Society), 2012, Dhaka, Bangladesh.

(25) Suresh Awale, Jun-ya Ueda, Sirivan Athikomkulchai: Highly oxygenated cyclohexene derivatives from *Uvaria dac* and their anti-austerity activity against human pancreatic cancer cell lines. 日本生薬学会第 59 回年会, 2012, 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Suresh Awale (SURESH AWALE)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
研究者番号: 00377243

(2) 連携研究者

江角 浩安 (ESUMI HIROYASU)
東京理科大学・生命医科学研究所・教授
研究者番号: 2070160364