

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590027

研究課題名(和文) ヤブコウジ属植物の選択的がん細胞毒性トリテルペノイドサポニンの探索と機能解明

研究課題名(英文) Investigation of triterpenoid saponins from Ardisia plants with selective anti-proliferative activities against liver cancer cells

研究代表者

小池 一男 (KOIKE, Kazuo)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：30130363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：より副作用の少ない新規抗がん剤シーズの発見を研究目標として、本研究では、UFLC-ESI-MS法によりヤブコウジ属薬用植物中のトリテルペノイドサポニン成分の迅速的分析法を確立し、さらに本分析法を新規微量成分の単離に適用した。これらアルジシアサポニンは、肝がん細胞に対して、優れた選択的毒性を示している一方、化学療法剤増感活性も示した。今後、これら化合物をリードとした新規抗がん剤への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of more effective drugs possessing high tumor-selective pro-apoptotic activity is critical. As part of our ongoing study on discovery of new anti-cancer drug seeds from natural resources, we paid attention to the possibility of triterpenoid saponins from Ardisia plants. A rapid and simple LC-MS analysis method was developed for identification and qualification of the triterpenoid saponins in Ardisia species, and the method was applied to the isolation of novel minor saponins from Ardisia plants. Biological study demonstrated the saponins from Ardisia plants showed potent and selective anti-proliferative activities and chemosensitizing activity against human liver cancer cell lines by modulating multiple molecules associated with cell cycle progression and apoptosis. These studies offer new insight into better understanding of triterpenoid saponins from Ardisia species for development of more specific and efficient anticancer agents.

研究分野：医歯薬学

キーワード：抗がん剤 天然物 創薬 ヤブコウジ サポニン

## 1. 研究開始当初の背景

世界においてがん疾患による死亡数は年々増加しており、国際がん研究機関 (IARC) は2008年がんによる死亡数は全体の13%を占める760万人であり、2030年に1100万人を超えると発表した。がん治療において重要な位置づけを有する化学療法には植物成分、抗生物質、分子標的薬、アルキル化剤など抗がん剤が使用されているが、がん細胞だけでなく正常細胞にも障害を与えることにより引き起こした副作用と毒性が依然に大きな課題として残されているため、がんの治癒率は未だ飛躍的な向上がみられない。そこで、がん細胞を選択的に作用し、より副作用の少ない新規抗がん剤の創製が社会から求められている。

天然化合物をリードとした医薬品の創製はこれまで多くの成果があげられてきた。イリノテカン、パクリタキセル、エトポシド、ビンブラスチンなど多くの天然由来の抗がん剤が既に臨床で使用されている。多彩な化学構造と生物機能を有する天然化合物から更なる新しい抗がん剤シーズの発見が期待されている。

一方、ヤブコウジ属は約500種の植物が含まれており、主に熱帯あるいは亜熱帯地区に分布している。そのうち、ヤブコウジ (*Ardisia japonica*)、カラタチバナ (*A. crispa*)、マンリョウ (*A. crenata*) の3種が日本にも広く分布し栽培されている。ヤブコウジ属植物は多くの種が解毒、利尿などの効能で伝統医薬に使用され、がんの治療にも用いられている。ヤブコウジ属植物の主成分であるトリテルペノイドサポニン (以下アルジシアサポニンと略す) は構造的に極めて多様性を有しており、1990年代からヤブコウジ属植物から既に50種以上の新規成分が報告されている。これら化合物に関する生物活性は *in vitro* のがん細胞毒性および *in vivo* での抗腫瘍活性が中心に報告されたが、作用機序はまだ未明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、より副作用の少ない新規抗がん剤シーズの発見を研究目標として、ヤブコウジ属薬用植物由来のトリテルペノイドサポニン成分について、植物化学および分析化学の手法により、がん細胞に対する選択的毒性活性を有する成分を明らかにする。さらにケミカルバイオロジー、分子生物学の手法により活性成分の作用機序、構造活性相関を解明することを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ヤブコウジ属植物の系統的・網羅的分析法の確立および成分研究

ヤブコウジ属植物ヤブコウジ (*A. japonica*) およびマンリョウ (*A. crenata*) について、これまでの成分研究より単離したアルジシアサポニンを標準品として、UFLC-ESI-MS 法より化学成分の系統的・網羅的分析法の確立を行った。

LC-MS 分析より、マンリョウからこれまで単離されていなかったサポニン成分が検出できたため、その単離を行った。マンリョウをメタノールで抽出し、さらに各種クロマトグラフィーおよび分取 HPLC にて単離精製を行い、その化学構造は NMR など機器分析により行った。

### (2) アルジシアサポニン化合物ライブラリーを用いる選択的がん細胞毒性の評価と作用機序解析

アルジシアサポニン化合物ライブラリーを用いて、肝がん細胞と肝臓正常細胞に対する細胞毒性を MTT 法により評価した。

選択的がん細胞毒性を示した活性化合物の作用機序は、正常細胞とがん細胞において、Flow cytometry 法によりアポトーシスおよび細胞周期における影響、さらに、細胞周期関与タンパク (Cyclin B, CDK1, CDK2, CDC25c, P21, p27 など) および細胞増殖シグナル因子に対する作用を調べ、作用機序の解析を行った。

アルジシアサポニンの化学療法剤増感活性はヒト肝がん細胞株 Bel-7402 および HepG2 細胞において化学療法剤 5-fluorouracil (5-Fu)、cisplatin (DDP) および epirubicin (EPI) に対して評価した。

#### 4. 研究成果

ヤブコウジ (*A. japonica*) 由来の 13,28-エポキシトリテルペノイドサポニンより構築された化合物ライブラリーを用いて、MTT 法によりヒト肝がん細胞および肝正常細胞に対する毒性を評価した。その結果、サポニン 2 と 3 は濃度と時間依存的に肝がん細胞に対して強い毒性を示した一方、肝正常細胞に対して毒性を示さなかった。構造活性相関を解析した結果、サポゲニン部および糖鎖構造は共にこの活性に関与し、13,28-epoxy および 16-hydroxy は活性発現に不可欠な官能基である。サポニン 2 と 3 は肝がん細胞に対して G1 と G2/M 期の細胞周期停止およびアポトーシスを誘導したが、正常細胞においては同様な作用は示さなかった。更に、化合物は肝がん細胞と正常細胞において mRNA レベルでの細胞周期制御因子 CDKs および cyclins に対して相違な作用を示した一方、肝がん細胞においてアポトーシス促進タンパク質 caspase-8 の発現と活性化を促進し、抗アポトーシス細胞周期調節因子 Cdc25A の転写と翻訳レベルを減少させた。

アルジシアサポニン化合物ライブラリーのヒト肝がん細胞における化学療法増感活性を評価したところ、ヤブコウジから単離されたサポニン cyclamin はヒト肝がん細胞株 Bel-7402 および HepG2 細胞において化学療法剤 5-fluorouracil (5-Fu)、cisplatin (DDP) および epirubicin (EPI) に対して強い化学療法増感活性を示した。しかし、非腫瘍性細胞株 HL-7702 においては化学療法剤の毒性の増加は認められなかった。更に、cyclamin は相乗的に 5-FU のアポトーシスおよび細胞周期停止の誘導効果を高めた。乳酸

脱水素酵素 (LDH) 放出アッセイにおいては cyclamin が Bel-7402 細胞の膜透過性を増加し、癌細胞への薬物の浸透を促進したことを示唆した。これら知見により cyclamin の化学療法増感剤としての利用が期待される。

一方、マンリョウ (*A. crenata*) 根のサポニン成分について、LC-MS を用いた定性定量分析法の検討を行った。その結果、20 分以内の分析時間で計 24 種のアルジシアサポニンを検出し、これら成分の化学構造を HPLC における保持挙動および MS データの解析より推定した。更に、マンリョウ根中の 6 種のサポニン成分について絶対定量分析法および相対定量分析法を確立した。各成分の検出限界濃度は 0.2-1.5ng/mL であった。本法を市販生薬の分析に適用試験に適用したところ、効率的にアルジシアサポニンの分析が可能であった。

ヤブコウジの主要アルジシアサポニンは超高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析 (UFLC-ESI-MS) 法を用いて系統的分析法を確立した。分析条件を最適化し、ヤブコウジに含まれる 6 種の主要アルジシアサポニンを 20 分以内の分析時間で定量法を確立した。

上記 LC-MS 分析を活用し、新規アルジシアサポニン 23 と 24 のターゲット単離及び構造決定を行った。UFLC-ESI-MS 法でマンリョウから検出したアルジシアサポニン 23 と 24 は保持挙動および MS データの解析により、既知のアルジシアサポニンと構造が異なる新規成分であると推定した。そこで、化合物 23 と 24 の化学構造を明らかにするため、その単離精製を行った。マンリョウ根をメタノールにて抽出し、酢酸エチルと水で分配操作を行った。水層画分について順次 Diaion HP-20 カラムおよび ODS カラムクロマトグラフィーで分離し、UFLC-ESI-MS 法で 23 と 24 が検出された分画について分取 HPLC にて化合物 23 と 24 を単離した。アル

ジシアサポニン 23 と 24 は各種 NMR スペクトル解析により構造を決定した。アグリコン部に 12 -水酸基を有するアルジシアサポニンは今回初めての単離例である。

#### 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3件)

- (1) Ling Ma, Wei Li, Hanqing Wang, Xinzhu Kuang, Yanghua Liu, Qin Li, Yinghua Wang, Peng Xie, Kazuo Koike: A simple and rapid method to identify and quantitatively analyze triterpenoid saponins in *Ardisia crenata* using ultrafast liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 400–408 (2015). DOI: 10.1016/j.jpba.2014.10.013 査読有 .
- (2) Qin Li, Lin Deng, Wei Li, Kazuo Koike: Cyclamin, a natural 13,28-epoxy triterpenoid saponin, synergistically enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human liver cancer cells but not non-neoplastic liver cells. *Planta Medica*, 80, 409-414 (2014). DOI: 10.1055/s-0034-1368198 査読有 .
- (3) Qin Li, Wei Li, Lin-Ping Hui, Chen-Yang Zhao, Lin He, Kazuo Koike: 13,28-Epoxy triterpenoid saponins from *Ardisia japonica* selectively inhibit proliferation of liver cancer cells without affecting normal liver cells. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22, 6120–6125 (2012). DOI:

10.1016/j.bmcl.2012.08.027 査読有 .

[学会発表](計5件)

- (1) 李巍, Li Qin, 小池一男: ヒト肝がん細胞におけるアルジシアサポニンと化学療法剤の併用効果. 日本薬学会第 134 年会. 熊本大学黒髪キャンパス(熊本県・熊本市). 2014 年 03 月 28 日 .
- (2) 劉洋華, 李巍, 匡薪竹, 馬玲, 小池一男: LC-MS 分析を活用したマンリョウ *Ardisia crenata* 根の新規微量トリテルペノイドサポニンの探索研究. 日本薬学会第 133 年会. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市). 2013 年 03 月 28 日 .
- (3) 李巍, Li Qin, 馬玲, 小池一男: ヤブコウジ属薬用植物のトリテルペノイドサポニン成分解析および選択的肝がん細胞毒性. 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム. 大阪大学会館(大阪府・豊中市). 2012 年 11 月 01 日 .
- (4) 李巍, 小池一男, Li Qin: ヤブコウジ由来の 13,28-エポキシトリテルペノイドサポニンの肝がん細胞毒性について. 日本生薬学会第 59 回年会. かずさアカデミアパーク(千葉県・木更津市). 2012 年 09 月 18 日 .
- (5) Wei Li, Qin Li, Kazuo Koike: 13,28-Epoxy triterpenoid saponins from *Ardisia japonica* and their selective antiproliferative activity on human liver cancer cells. The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy. ソウル(韓国). 2012 年 08 月 24 日 .

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

小池 一男 (KOIKE, Kazuo)

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号 : 3 0 1 3 0 3 6 3

(2)研究分担者

李 巍 (LI, Wei)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：90328633