

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460051

研究課題名(和文) 抗腫瘍活性物質のハイスループットスクリーニング法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of high-throughput screening method of anti-tumor activity substance

研究代表者

松永 久美 (Matsunaga, Hisami)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70271418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショックタンパク質(Hsp90)をN-およびC-末端を介してアミノプロピルシリカに固定化したカラムを調製した。これらのカラムを組合わせ、天然物中より微量の抗腫瘍活性物質のハイスループットスクリーニングへの適用を試みたところ、cepharanthine, isotetrandrine, berbamine, cycleanine, quercetin, wogonin, chrysin, rutin がHsp90 阻害剤である可能性が示唆され、glycyrrhizin, baicalin, baicalein, ginsenoside, curcumin は Hsp90 阻害剤ではないことが推測された。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 90 (Hsp90) immobilized on aminopropyl silica gels was prepared via the N- or C-terminal, which was termed Hsp90-NT or -CT, respectively. Also, the Control-NT column was prepared similarly to the procedure above, with the exception of the addition of Hsp90. Binding interactions of biscoclaurine alkaloids (BCAs) with Hsp90 were examined using the Hsp90-NT or -CT columns by frontal and zonal chromatography. The retention times of natural products, which anticancer activities are reported, on Hsp90-NT and Control-NT columns was plotted. The plots of BCAs, quercetin and wogonin are at the upper left, while curcumin, glycyrrhizin, baicalin and ginsenoside are at the bottom right or on the straight line. These results suggest that BCAs, quercetin and wogonin could be Hsp90 inhibitors, which interact with the C-terminal or middle domain of Hsp90. Furthermore, the Hsp90-NT column was applied for throughput screening of natural Hsp90 inhibitors by zonal chromatography.

研究分野：分析化学

キーワード：抗腫瘍活性物質 ハイスループットスクリーニング 熱ショックタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、天然あるいは人工の高分子をアフィニティリガンドとして用い、医薬品、生体関連物質あるいは環境汚染物質の特異的分子認識とその応用に関する研究を行ってきた。前者では、卵白中より新たに糖タンパク質を単離し、ニワトリ  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質と命名し、シリカゲルに固定化し、医薬品の光学認識に適用した。後者では、テンプレート分子に対する特異的認識部位を得る方法である、分子インプリントポリマーに着目し、医薬品、生体関連物質あるいは環境汚染物質の特異的認識とそれらの高選択分析法の開発を行ってきた。これまでの研究の成果を踏まえ、標的タンパク質を固定化したアフィニティ基材を用いて抗腫瘍活性物質をハイスループットスクリーニングするという本研究の着想に至った。Irving W. Wainerらは、レセプターあるいはトランスポーターを固定化した基材を調製し、その薬理活性とともに結合能を評価し、生体試料あるいは化学試料中からリード化合物を単離・同定できる可能性を示唆している。しかしながら、標的タンパク質を固定化したアフィニティ基材を用いて、化合物ライブラリーおよび天然物から抗腫瘍活性物質をハイスループットスクリーニングするという試みは国内外ではじめてである。熱ショックタンパク質 (Hsp90) は癌の進展との関連が深く、Hsp90 阻害剤は抗がん剤として期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、1) 標的タンパク質 (レセプター、酵素など) を固定化したアフィニティ基材を調製し、2) アフィニティ基材と高分離能カラムを組み合わせることにより、化合物ライブラリー、漢方薬などの植物由来の天然物、かびなどの生物由来の天然物中より微量の抗腫瘍活性物質をハイスループットスクリーニングし、3) 質量分析法を用

いることにより、オンラインで微量の抗腫瘍活性物質の構造情報を得、その目的を達成することができる。

## 3. 研究の方法

1) Hsp90 を N-末端を介して固定化した充填剤 (Hsp90-NT) の調製: 50 mg APS ゲルをピリジンと HCl の混合液 (pH 6.0) 10 mL 中に加えて懸濁し、5 % グルタルアルデヒドを加えて 3 時間攪拌した。活性化した APS ゲルを洗浄後、200  $\mu$ g の Hsp90 を含むピリジン溶液に加え 4 時間、24 時間反応させた。さらに、グルタミン酸でブロッキングを行った。得られた Hsp90-NT 充填剤は、NaCl, bovine serum albumin (BSA), ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) およびアジ化ナトリウムを含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、調製した。

2) Hsp90 を C-末端を介して固定化した充填剤 (Hsp90-CT) の調製: 100 mg の APS ゲルを NaCl を含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.5) で洗浄した。400  $\mu$ g の Hsp90 を NaCl を含むリン酸カリウム緩衝液 (pH 5.5) を加えて溶かし、1-ethyl-3-(3-methylamino propyl)carbodiimide および N-hydroxy sulfosuccinimide で活性化した後、100 mg の APS ゲルに加えた。反応液は pH 5.0 に調整し、4 時間、24 時間攪拌反応させた。さらに、グルタミン酸でブロッキングを行った。Hsp90-CT 充填剤は、NaCl, BSA, EDTA およびアジ化ナトリウムを含む Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し、調製した。

3) Control 充填剤 (Control-NT) の調製: APS ゲルをグルタルアルデヒドで活性化後、グルタミン酸でブロッキングを行い、Hsp90-NT と同様に洗浄し、調製した。

4) 評価: 得られたそれぞれの Hsp90 固定化アミノプロピルシリカゲル (Hsp90-NT, Hsp90-CT および Control-NT 充填剤) を内径 2.1 mm、長さ 50 mm のステンレスカラムに

充填し、移動相に 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いてフロンタル・アフィニティー・クロマトグラフィー (FAC) によりビスコクラウリン型アルカロイド (cepharanthine, isotetrandrine, berbamine および cycleanine) の解離定数 ( $K_d$ ) を評価した。また、Hsp90-NT および Control-NT カラムにおけるビスコクラウリン型アルカロイド、quercetin, chrysin, rutin, glycyrrhizin, curcumin, wogonin, baicalin, baicalein および ginsenoside など生薬成分の保持時間 ( $t_R$ ) および保持係数 ( $k$ ) を Hsp90-NT および Control-NT カラムを用いて測定した。

5) 槐花 (マメ科 Leguminosae 槐 *Sophora japonica* L. (エンジュ) の花蕾を乾燥したものである) から微量の rutin の抽出を試みる。抽出物を Hsp90 カラムおよびコントロールカラムに注入し、Hsp90 カラムに保持された Hsp 阻害剤すなわち抗腫瘍活性物質に相当する成分を、微粒子充填型逆相系カラム等の高分離能カラムにより分離し、抗腫瘍活性物質をハイスループットスクリーニングする。

#### 4. 研究成果

調製した Hsp90-NT, Hsp90-CT および Control-NT 充填剤をそれぞれステンレス製カラム (内径 2.1 mm、長さ 50 mm) に充填し、移動相に 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いて FAC によりビスコクラウリン型アルカロイドの  $K_d$  を評価した。また、Hsp90-NT および Control-NT カラムにおけるビスコクラウリン型アルカロイドの保持時間 ( $t_R$ ) および保持係数 ( $k$ ) も併せて測定した。ビスコクラウリン型アルカロイドの Hsp90-NT および Hsp90-CT カラムにおける  $K_d$ ,  $t_R$  および  $k$  値は以下のようになった。Hsp90-NT column での  $K_d$ ,  $t_R$  および  $k$  値が cepharanthine では  $5.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ , 34.5 min, 26.6, isotetrandrine では  $46.3 \pm 15 \mu\text{M}$ , 22.6 min, 11.7, berbamine では  $18.6 \pm 3.8 \mu\text{M}$ ,

33.0 min, 17.5 および cycleanine では  $159 \pm 23 \mu\text{M}$ , 13.9 min, 6.8 であった。また、Hsp90-CT column での  $K_d$ ,  $t_R$  および  $k$  値が cepharanthine では  $6.3 \pm 1.7 \mu\text{M}$ , 44.0 min, 26.1, isotetrandrine では  $29.9 \pm 8.4 \mu\text{M}$ , 25.7 min, 13.0, berbamine では  $18.0 \pm 4.9 \mu\text{M}$ , 30.0 min, 15.3 および cycleanine では  $143 \pm 37 \mu\text{M}$ , 17.3 min, 8.4 であった。その結果、ビスコクラウリン型アルカロイドと Hsp90 との相互作用の大きさは、cepharanthine > berbamine > isotetrandrine > cycleanine の順であり、いずれのビスコクラウリン型アルカロイドも Hsp90-NT および Hsp90-CT カラムでほぼ同等の  $K_d$  値を示し、ビスコクラウリン型アルカロイドの  $K_d$  値と  $t_R$  あるいは  $k$  値との間には負の相関が認められた。これは、溶質の  $t_R$  を測定することにより、溶質と Hsp90 との相互作用を評価できることを示唆している。

そこで、生薬成分の  $t_R$  を Hsp90-NT および Control-NT カラムを用いて測定した。また、横軸に Control-NT カラムでの  $t_R$  を、縦軸に Hsp90-NT カラムでの  $t_R$  をプロットした。生薬成分として、標準品のビスコクラウリン型アルカロイドと quercetin, chrysin, rutin, glycyrrhizin, curcumin, wogonin, baicalin, baicalein および ginsenoside を用い、 $t_R$  をプロットした。その図中に傾き 1 の直線を書いた場合、この直線よりも左上に位置する生薬成分が、Control-NT よりも Hsp90-NT カラムで保持が大きく、Hsp90 阻害剤 (抗癌活性を有する) である可能性を示唆している。その結果、ビスコクラウリン型アルカロイドである cepharanthine, isotetrandrine, berbamine, cycleanine と生薬成分である quercetin, wogonin, chrysin, rutin が、傾き 1 の直線よりも左上に位置しており、これらは Hsp90 阻害剤である可能性が示唆された。また、glycyrrhizin, baicalin, baicalein, ginsenoside, curcumin は、傾き 1 の直線上あるいは右下に位置しているため、Hsp90 阻害剤ではない

と推測された。また、Cinobufagin、paeonol、magnolol および shikonin ついて検討している。次いで、生薬成分抽出への適用として、粉碎した槐花 1 g に水 30 mL を加えて煮沸し、熱時濾過後冷却して rutin の結晶を得た。濾液を濃縮し、残りの rutin を得て、熱湯から再結晶し、淡黄色の針状結晶を得た。メタノール (1.1% のリン酸を 1% 含有) を加え粉碎した後、濾過後、ODS カラムにて HPLC (移動相には、メタノール:アセトニトリル:0.1% リン酸 = 50 : 35 : 15 を用い、UV 360 nm、1 mL/min) により分析し、生薬成分として適用することができた。

#### 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 7 件)

1. Noriko Funaya, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Preparation of Magnetic Molecularly Imprinted Polymer for Cyclobarbitol and Its Application to the Assay of Phenobarbitol in Human Serum.  
*Chromatography* 36 (2015) 39-44. 査読有  
DOI: 10.15583/jpchrom.2015.015
2. Chitose Miura, Hui Li, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Molecularly imprinted polymer for chlorogenic acid by modified precipitation polymerization and its application to extraction of chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* leaves.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 114 (2015) 139-144. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jpba.2015.04.038
3. Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Separation of enantiomers on chiral stationary phase based on chicken  $\alpha_1$ -acid glycoprotein: effect of silica particle diameters on column performance.  
*J. Chromatogr. A*, 1363 (2014) 96-100. 査読有  
DOI: 10.1016/j.chroma.2014.07.005
4. Chitose Miura, Noriko Funaya, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Monodisperse, molecularly imprinted polymers for creatinine by modified precipitation polymerization and their applications to creatinine assays for human serum and urine.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 85 (2013) 288-294. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.038
5. Tomoko Kitabatake, Hiromi Tabo, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Preparation of monodisperse curcumin-imprinted polymer by precipitation polymerization and its application for the extraction of curcuminoids from *Curcuma longa* L.  
*Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 6555-6561. 査読有  
DOI: 10.1007/s00216-013-7088-6
6. Jun Haginaka, Tomoko Kitabatake, Iyo Hirose, Hisami Matsunaga, Ruin Moaddel  
Interaction of cepharanthine with immobilized heat shock protein 90 $\alpha$  (Hsp90 $\alpha$ ) and screening of Hsp90 $\alpha$  inhibitors.  
*Anal. Biochem.*, 434 (2013) 202-206. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ab.2012.11.010
7. Yuma Hiratsuka, Noriko Funaya, Hisami Matsunaga, Jun Haginaka  
Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water.  
*J. Pharm. Biomed. Anal.* 75 (2013) 180-185. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

松永久美、萩中 淳

ヒト血清アルブミンを固定化した充填剤による光学分割：固定化法の光学認識能に対する影響

日本薬学会第 136 年会

平成 28 年 3 月 28 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

中村 有加里、松永久美、萩中 淳

安息香酸およびその置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価：置換基が分子認識能に与える影響

日本薬学会第 136 年会

平成 28 年 3 月 28 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

升本 志津香、中村 有加里、松永久美、萩中 淳

カフェイン酸フェネチルエステルに対する分子インプリントポリマーの調製と応用

日本薬学会第 136 年会

平成 28 年 3 月 28 日

パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

中村 有加里、松永久美、萩中 淳

安息香酸およびその塩素置換体に対する分子インプリントポリマーの調製と評価

日本分析化学会第 64 年会

平成 27 年 9 月 9 日

九州大学伊都キャンパス（福岡県福岡市）

松永久美、明石智子、萩中 淳

ニワトリ $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質を固定化した充填剤による光学分割：シリカ粒子とコアシェルシリカ粒子の比較

日本薬学会第 135 年会

平成 27 年 3 月 27 日

神戸サンボーホール（兵庫県神戸市）

升本 志津香、中村 有加里、松永久美、萩中 淳

ケルセチンに対する分子インプリントポ

リマーの調製と応用

日本薬学会第 135 年会

平成 27 年 3 月 27 日

神戸サンボーホール（兵庫県神戸市）

中村 有加里、松永久美、萩中 淳

ワルファリンに対する分子インプリントポリマーの調製と評価

日本薬学会第 135 年会

平成 27 年 3 月 27 日

神戸サンボーホール（兵庫県神戸市）

中村 有加里、松永久美、萩中 淳

還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と応用

日本分析化学会第 63 年会（広島）

平成 26 年 9 月 19 日

広島大学東広島キャンパス（広島県東広島市）

松永久美、萩中 淳

セロビオハイドロラーゼを固定化した充填剤による光学分割

モレキュラー・キラリティー 2014

仙台国際センター（宮城県仙台市）

平成 26 年 6 月 6 日～平成 26 年 6 月 7 日

松永久美、萩中 淳

ニワトリおよびヒト $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質を固定化した充填剤による光学分割：充填剤粒子径の光学認識能に対する影響

日本薬学会第 134 年会

平成 26 年 3 月 29 日

熊本市総合体育館（熊本県熊本市）

村上真愛、松永久美、萩中 淳

ヒト血清アルブミンを固定化した充填剤による光学分割：充填剤粒子径の光学認識能に対する影響

日本薬学会第 134 年会

平成 26 年 3 月 29 日

熊本市総合体育館（熊本県熊本市）

中村 有加里、松永久美、萩中 淳

沈殿重合法による還元型グルタチオンに対する分子インプリントポリマーの調製と評

価

日本薬学会第 134 年会

平成 26 年 3 月 29 日

熊本市総合体育館（熊本県熊本市）

三浦ちとせ、松永久美、萩中 淳

カフェイン酸に対する分子インプリントポリマーの調製と評価

第 24 回クロマトグラフィー科学会議

平成 25 年 11 月 11～12 日

東京大学本郷キャンパス（東京都文京区）

中村有加里、三浦ちとせ、松永久美、萩中 淳

ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製：沈殿重合法と多段階膨潤重合法の比較

第 24 回クロマトグラフィー科学会議

平成 25 年 11 月 11～12 日

東京大学本郷キャンパス（東京都文京区）

中村有加里、三浦ちとせ、松永久美、萩中 淳

ストリキニーネに対する分子インプリントポリマーの調製とその応用

日本分析化学会第 62 年会（大阪）

平成 25 年 9 月 12 日

近畿大学東大阪キャンパス（大阪府東大阪市）

松永久美、萩中 淳

$\alpha_1$ -酸性糖タンパク質を固定化した充填剤による光学分割：充填剤粒子径の光学認識能に対する影響

第 20 回記念シンポジウム モレキュラー・キラリティー 2013

平成 25 年 5 月 10～11 日

京都大学芝蘭会館（京都府京都市）

〔図書〕(計 1 件)

足立 茂、大高泰靖、片岡洋行、四宮一総、澁川明正、知久馬敏幸、萩中 淳、張替直輝、松田 明、松永久美、森本正太郎  
廣川書店

「薬学分析化学」

2015 年 p231-251、p268-270

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 久美 (Matsunaga Hisami)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：70271418

(2) 研究分担者

萩中 淳 (Haginaka Jun)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：20164759