

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：33304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460117

研究課題名(和文) 栄養飢餓耐性解除に基づく膵臓がん治療薬リード化合物の探索

研究課題名(英文) Search for a lead compound based on antiausteric activity

研究代表者

手塚 康弘 (Tezuka, Yasuhiro)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：70236975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：漢方生薬24種の栄養飢餓状態選択的細胞毒性を測定し、延命草、石松子、穿心蓮が栄養飢餓状態選択的に細胞死を引き起こすことを明らかにした。次いで、最も強い活性を示した「穿心蓮」の成分検索を行い、14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide が活性成分であり、アミノ酸または血清が欠乏した状態で、選択的にアポトーシス様の細胞死を引き起こすことを明らかにした。その他、石松子や延命草の成分についても一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Preferential cytotoxicity of 24 extracts was determined against PANC-1 and PSN-1 human pancreatic cancer cells and extracts of Andrographis Herba, Isodonis Herba, and Licopodium showed activities. Then, phytochemical investigation of the 70% EtOH extract of Andrographis Herba led to the isolation of 21 known compounds consisting of six labdane-type diterpenes, six flavones, three flavanones, two sterols, a fatty acid, a phthalate, a triterpene, and a monoterpene. Among them, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide displayed the most potent preferential cytotoxicity against PANC-1 and PSN-1 cells with PC50 values of 10.0 microM and 9.27 microM, respectively. Microscopical observation, double staining with ethidium bromide (EB) and acridine orange (AO), and flow cytometry with propidium iodide/annexin V double staining indicated that 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide triggered apoptosis-like cell death in NDM with an amino acids and/or serum-sensitive mode.

研究分野：天然物化学

キーワード：膵臓がん 栄養飢餓耐性解除 和漢薬 活性成分 抗がん剤 穿心蓮

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は化学療法剤や放射線治療に対して抵抗性を示し、有効な治療法が存在しない癌の一種である。正常組織は、酸素や栄養の供給が悪い状態では生存できないのに対し、膵臓がん等のがん細胞は、栄養飢餓状態下でも特殊なエネルギー代謝を行う事で生存が可能になっている。我々は、この栄養飢餓耐性を解除する薬物を、がん組織特異的な治療薬の候補化合物として和漢薬を主とする伝統薬物の中に求め、漢方薬“牛蒡子”から「アルクチゲニン」を、“独活”から「エンジェルマリン」を、“羌活”から「オストルチン」を、それぞれ活性成分として単離・同定した。さらに、ミャンマー産薬用植物 *Boesenbergia pandurata* 及び *Kayea assamica*, プロボリス, アフリカ・コンゴ民主共和国の薬用植物 *Garcinia huillensis* 及び *Securidaca longipedunculata* から多数の活性成分を見出した。これらの活性成分の中で、「アルクチゲニン」は強い活性を示し、ヌードマウスのゼノグラフト膵臓がんモデルにおいて、膵臓癌の大きさを三分の一に縮小する効果を示し、安全性も確認されていた。

2. 研究の目的

漢方薬および漢方方剤のエキスについて栄養飢餓選択的毒性を測定し、活性を示したエキスについてその活性成分を明らかにする事で、従来知られている活性成分とは異なるタイプの栄養飢餓選択的毒性成分を明らかにする。さらに、活性成分の類縁体の合成なども行い、一連の化合物について構造活性相関を検討する事で、より有効な膵臓がん治療薬につながるリード化合物を見出す。

3. 研究の方法

(1) 和漢薬および漢方方剤のエキス

以前の漢方生薬エキス約 500 種についての栄養飢餓選択的細胞毒性スクリーニングで活性が認められた生薬（既に活性成分の検索が終わっている牛蒡子、独活、松香、羌克を含む約 40 種の生薬）を当初の対象とする。常法に従い、70%エタノールエキスで抽出してエキスを作成し、栄養飢餓選択的細胞毒性を測定する。

(2) 和漢薬および漢方方剤のエキスの栄養飢餓選択的毒性スクリーニング

栄養飢餓選択的毒性は、従来から用いている富栄養培地 (DMEM 培地) と栄養欠乏培地 (グルコース, アミノ酸, 血清等の栄養分を除いた NDM 培地) における細胞毒性を比較し、栄養欠乏培地でのみ毒性を示すものを選択的毒性陽性とする。活性の強さは、NDM 培地中での IC₅₀ 値 (=PC₅₀ 値) で表し、強い活性を示したエキスについては、常法に従って、活性発現に必要な栄養条件やアポトーシス誘起の有無などの検討を行う。

(3) 活性エキスからの成分単離・同定

成分単離は、溶媒分配、各種カラムクロマトグラフィー (シリカゲル, アルミナ等), 中圧分取液体クロマトグラフィー, 逆相高速液体クロマトグラフィー, プレパラティブ TLC 等を組み合わせて行う。これらの各過程で得られるフラクションについて活性測定を行う事で活性成分の絞り込みを行い、単離した化合物の活性測定を行う事で活性成分の同定を行う。さらに、単離した各化合物について、各種スペクトルデータ (MS, IR, UV, NMR 等, 現有備品) を測定すると共に、必要に応じて化学反応を組み合わせる構造を明らかにする。

(4) 単離成分の栄養飢餓選択的毒性測定

上記のエキスのスクリーニングについて述べた方法により、単離成分の栄養飢餓選択的細胞毒性の強さ、活性発現に必要な栄養条件やアポトーシス誘起の有無などの検討を行い、類縁体合成の標的とする化合物 (リード化合物) を絞り込む。

4. 研究成果

(1) 以前の予備的な栄養飢餓選択的細胞毒性スクリーニングで活性を示した生薬の中から 24 生薬 [延命草 (エンメイソウ, No. 1), 黄柏 (オウバク, No. 2), 乾漆 (カンシツ, No. 3), 胡荽子 (コズイシ, No. 4), 牛蒡子 (ゴボウシ, No. 5), 胡麻子 (ゴマシ, No. 6), 益母草 (ヤクモソウ, No. 7), 紫苑 (シオン, No. 8), 紫河車 (シカシャ, No. 9), 地骨皮 (ジコッピ, No. 10), 蛇莓 (ジャバイ, No. 11), 松香 (ショウコウ, No. 12), 水紅花子 (スイコウカシ, No. 13), 水蛭 (スイテツ, No. 14), 石松子 (セキショウシ, No. 15), 仙鶴草 (センカクソウ, No. 16), 穿心蓮 (センシンレン, No. 17), 竹節人參 (チクセツニンジン, No. 18), 猪苓 (チョレイ, No. 19), 独活 (ドツカツ, No. 20), 半枝蓮 (ハンシレン, No. 21), 白朮 (ビャクジュツ, No. 22), 枇杷葉 (ピワヨウ, No. 23), 木通 (モクツウ, No. 24)] を選び、栄養飢餓選択的細胞毒性を測定した。

その結果、PANC-1 細胞に対しては「延命草 (No. 1)」「黄柏 (No. 2)」「石松子 (No. 15)」「仙鶴草 (No. 16)」「穿心蓮 (No. 17)」「竹節人參 (No. 18)」「猪苓 (No. 19)」が、強い栄養飢餓選択的細胞毒性成分 (アルクチゲニン) を含む「牛蒡子 (No. 5)」よりも強い栄養飢餓選択的細胞毒性を示した (表 1)。また、PSN-1 細胞に対しては、「延命草 (No. 1)」「黄柏 (No. 2)」「石松子 (No. 15)」「穿心蓮 (No. 17)」「竹節人參 (No. 18)」「猪苓 (No. 19)」が「牛蒡子 (No. 5)」よりも強い栄養飢餓選択的細胞毒性を示した (表 1)。これらの活性を示した生薬の中で、「穿心蓮 (No. 17)」が最も強い活性を示していた。

表1 生薬エキスの栄養飢餓選択的細胞毒性

Extract no.	PC ₅₀ (μg/mL)	
	PANC-1	PSN-1
1	35.1	37.1
2	38.1	41.6
3	80.5	83.6
5	71.7	78.1
7	97.1	>100
15	36.3	17.9
16	59.2	91.0
17	9.72	9.41
18	37.0	36.6
19	69.0	54.2
Arctigenin ^{a)}	0.29 μM	0.47 μM
Taxol ^{b)}	>100 μM	>100 μM

a) Positive control. b) Negative control.

(2) 「延命草 (No. 1)」 「黄柏 (No. 2)」 「石松子 (No. 15)」 「穿心蓮 (No. 17)」 「竹節人參 (No. 18)」 について、栄養飢餓選択的細胞毒性の濃度依存性及び時間依存性を検討した結果、5つ全てが依存性を示していた (図1)。

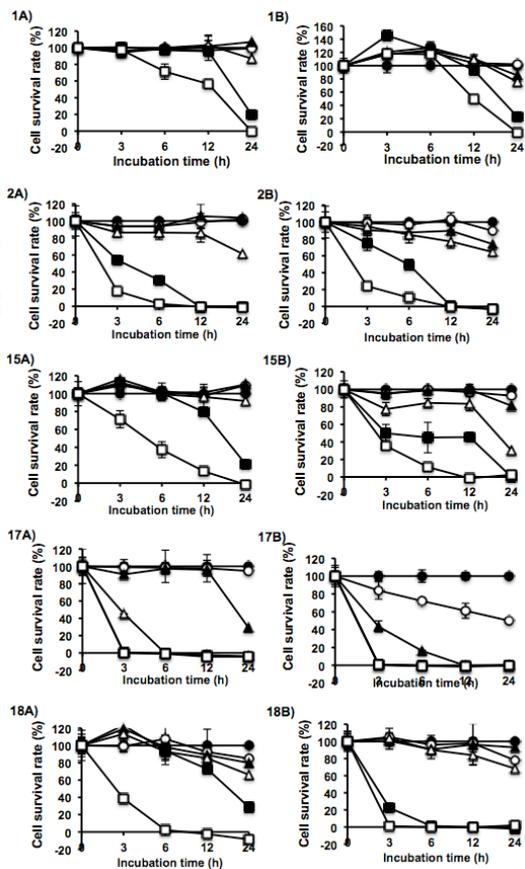


図1 活性生薬の濃度及び時間依存性
1, 2, 15, 17, 18 : 表1 のエキス番号, a, b : PANC-1 及び PSN-1 に対する作用, ●, ○, △, ▲, ■, □ : 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL.

次に、上記の生薬について、栄養飢餓状態選択性を調べたところ、「延命草 (No. 1)」 「石松子 (No. 15)」 「穿心蓮 (No. 17)」 「竹節人參 (No. 18)」 の4生薬は血清が存在しない状態

で活性が強くなった。一方、「黄柏 (No. 2)」 はグルコース欠乏で活性が強くなった。

最後に、細胞毒性の機構をエチジウムブロミド/アクリジンオレンジによる二重染色実験を行い、「延命草 (No. 1)」 「石松子 (No. 15)」 「竹節人參 (No. 18)」 がアポトーシス様の細胞死を引き起こし、「黄柏 (No. 2)」 「穿心蓮 (No. 17)」 がネクローシス様の細胞死を引き起こした事が明らかになった (図2)。

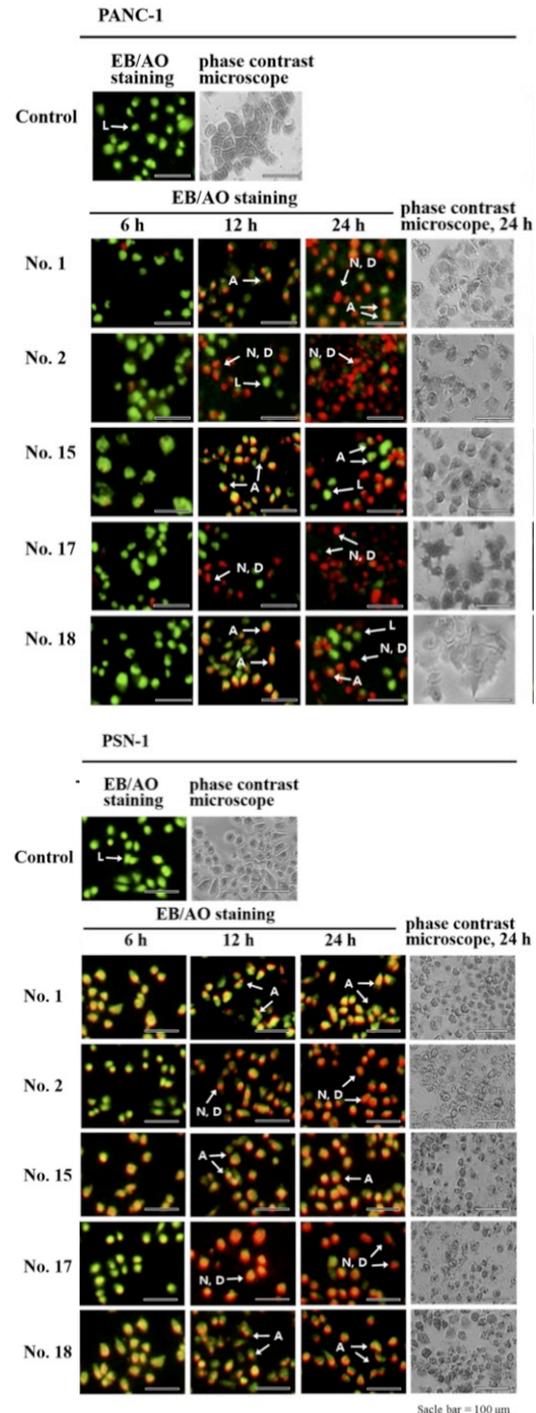


図2 エチジウムブロミド/アクリジンオレンジによる二重染色実験
A : アポトーシス細胞, D : 死細胞, L : 生細胞, N : ネクローシス細胞

(3) 最初に、上記の栄養飢餓状態選択的細胞毒性試験において最も強い選択的細胞毒性を示した「穿心蓮 (No. 17)」の活性成分の検討を行った。「穿心蓮 (No. 17)」の 70% エタノールエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーと分取プレパラティブ TLC を組み合わせ分画を行い、21 化合物を単離した。これら化合物の構造は、各種スペクトルデータ (MS, NMR 等) に基づいて、既知化合物の stearic acid (1), pinostrobin (2), β -sitosterol (3), bis(2-ethylhexyl) phthalate (4), 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone (5), pinocembrin (6), ermanin (7), ergosterol peroxide (8), oleanolic acid (9), 5,3',4'-trihydroxy-7-methoxyflavone (10), andrograpanin (11), skullcapflavone I (12), loliolide (13), 5-hydroxy-7,8,2',5'-tetramethoxyflavone (14), 3-oxo-*ent*-cleroda-8(17),11,13-trien-16,15-olide (15), 5,7,8-trimethoxyflavanone (16), 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17), isoandrographolide (18), andrographolide (19), apigenin (20), 14-deoxyandrographolide (21) (図 3) と決定した。また、各化合物の栄養飢餓状態選択的細胞毒性を測定することによって、活性成分を 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide (17) (PC₅₀ 値: PANC-1, 10.0 μ M; PSN-1, 9.27 μ M) と決定した (表 2)。

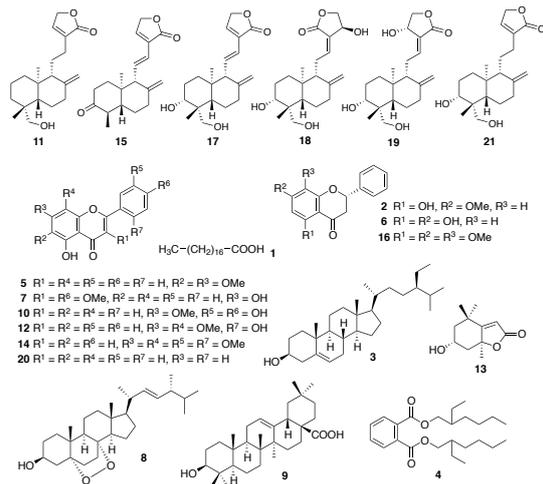


図 3 穿心蓮 (No. 17) から単離された化合物

表 2 単離成分の栄養飢餓状態選択的細胞毒性

Compds	PC ₅₀ , mM		Compds	PC ₅₀ , mM	
	PANC-1	PSN-1		PANC-1	PSN-1
8	60.5	79.2	17	10.0	9.27
9	40.4	58.6	19	34.3	48.3
11	46.0	43.9	Others	>100	>100
13	85.0	>100	Arctigenin ^a	0.48	0.68
14	74.9	74.1	Taxol ^b	>100	>100

^a) Positive control. ^b) Negative control.

活性成分 17 は濃度及び時間依存的に栄養飢餓状態選択的に細胞毒性を示したが、その選択的細胞毒性は PANC-1 細胞に対してはアミノ酸欠乏または血清欠乏状態において細胞毒性を示した (図 4)。一方、PSN-1 細胞に対しては、血清欠乏状態において選択的細胞毒性を示した (図 4)。

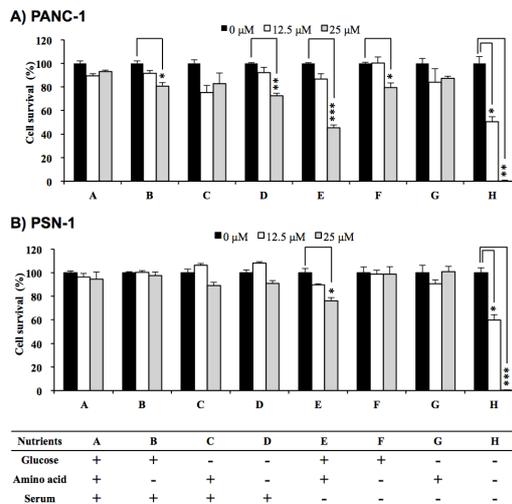


図 4 化合物 17 の細胞毒性に対する栄養飢餓状態選択性

さらに、エキスに対して行ったと同様に、活性成分 17 の存在下に細胞形態の観察 (図 5)、エチジウムブロミド/アクリジンオレンジによる二重染色実験 (図 6)、プロピジウムオレンジ/アネキシン V 二重染色によるフローサイトメトリー実験 (図 7) を行った結果から、活性成分 17 は栄養飢餓状態選択的にヒト膵臓がん細胞 PANC-1 及び PSN-1 に対してアポトーシス様の細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

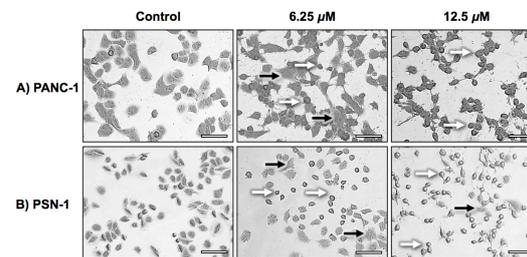


図 5 化合物 17 で処理した細胞の形態変化

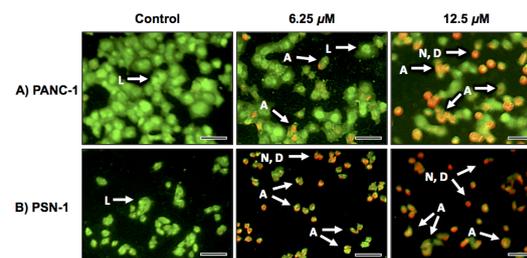


図 6 エチジウムブロミド/アクリジンオレンジによる二重染色実験

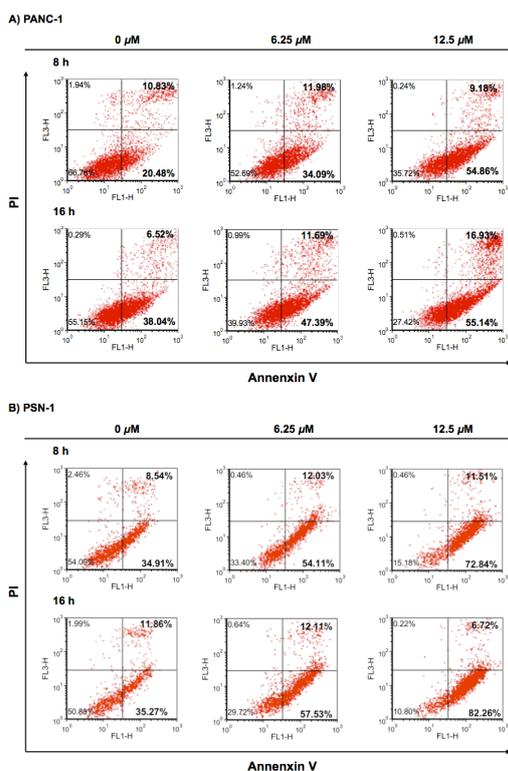


図7 プロピジウムオレンジ/アネキシンV二重染色によるフローサイトメトリー実験

(4) 栄養飢餓状態選択的細胞毒性を示した「石松子 (No.15)」(PC₅₀: PANC-1, 36.3 μg/mL; PSN-1, 17.9 μg/mL)の70%エタノールエキスについて、核磁気共鳴(NMR)スペクトルおよび赤外吸収(IR)スペクトルのデータを検討した結果、主成分が脂肪酸関連化合物であることを明らかにした。そこで、メチル化体及びTMS化体について、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC-MS)による解析を行い、炭素数16又は18で二重結合0-2個を有する脂肪酸の混合物であることが明らかになった。そこで、想定される脂肪酸の標品を入手し、脂肪酸分析に有効なカラムを用いるGC-MS分析を行った。その結果、含有される脂肪酸をヘキサデカン酸(=パルミチン酸), cis-9-ヘキサデセン酸(=パルミトレイン酸), cis-9-オクタデセン酸(=オレイン酸), 11-オクタデセン酸(=バクセン酸), cis,cis-9,12-オクタデカジエン酸(=パルミトレイン酸)と同定した。

(5) 栄養飢餓状態選択的細胞毒性を示した「延命草 (No.1)」(PC₅₀: PANC-1, 35.1 μg/mL; PSN-1, 43.0 μg/mL)の70%エタノールエキスの各種クロマトグラフィーによる分離を検討し、酢酸エチル可溶性分画から6化合物(イソチムシン, 4-ヒドロキシ安息香酸, ペダリチン, 3,4-ジヒドロキシ安息香酸, カフェー酸, ロスマリン酸)を、ブタノール可溶性分画から3化合物(3,4-ジヒドロキシ安息香酸, ロスマリン酸, スクテラレイン)を単離・同定した。

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2件)

① Lee S., Morita H., and Tezuka Y.: Preferentially Cytotoxic Constituents of *Andrographis paniculata* and their Preferential Cytotoxicity against Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Nat. Prod. Commun.*, **10**(7), 1153-1158 (2015). 査読あり

<http://www.naturalproduct.us/>

② Lee S., Dibwe D. F., Li F., Morita H., and Tezuka Y.: Preferential cytotoxicity of extracts used in Japanese Kampo medicines against human pancreatic cancer PANC-1 and PSN-1 cells. *Trad. & Kampo Med.*, **2**(2), 35-42 (2015). 査読あり

DOI: 10.1002/tkm2.1016

[学会発表] (計1件)

① 李 雪林, 森田洋行, 手塚康弘: 穿心蓮中の栄養飢餓状態選択的な殺細胞活性成分. 日本薬学会第135年会, 2015, 3/26-28, デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 康弘 (TEZUKA, Yasuhiro)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号: 70236975