

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460134

研究課題名(和文) PPAR- を標的とした抗腫瘍活性天然物の探索とその併用効果に関する研究

研究課題名(英文) Antitumor natural products targeting PPAR-gamma and their combination effect with clinically used anticancer agents

研究代表者

三巻 祥浩 (Mimaki, Yoshihiro)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90229790

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)：PPAR-gammaアゴニストであるマグノロールは、Santalum album材より単離された新規抗腫瘍活性セスキテルペンのHL-60白血病細胞に対する選択的腫瘍細胞毒性を100倍以上増強させた。また、カンゾウから単離されたプレニルイソフラボノイド誘導体およびビャクシから単離された新規クマリン誘導体は、PPAR-gammaアゴニスト活性を有し、シスプラチンのA549肺腺がん細胞に対する細胞毒性を増強させた。その他、神秘湯エキスおよびマオウエキスにPPAR-gammaアゴニスト活性を見出した。ハマボウフウからPPAR-gammaアゴニストとして、3種のプレニルフロクマリン誘導体を同定した。

研究成果の概要(英文)：Magnolol, a natural PPAR-gamma agonist, enhanced the tumor selective cytotoxic activity of a new sesquiterpene from Santalum album heart wood against HL-60 leukemia cells by more than 100 times. Furthermore, a prenylisoflavonoid derivative from Glycyrrhiza glabra roots and a new coumarin derivative from Angelica dahurica roots exhibited PPAR-gamma agonist activity and attenuated the cytotoxicity of etoposide, a clinically used anticancer agent, against A549 lung adenocarcinoma cells. The kampo prescription of Shimpito Extract and Ephedra Herb extract showed PPAR-gamma agonist activity. Three prenylfuranocoumarin derivatives were isolated from Glehnia littoralis roots and rhizomes as the PPAR-gamma agonists.

研究分野：薬用資源学

キーワード：PPAR-gamma Santalum album セスキテルペン 選択的腫瘍細胞毒性 カンゾウ プレニルイソフラボノイド誘導体 ビャクシ 新規クマリン誘導体

## 1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)- $\gamma$  は主に脂肪細胞中に発現しているリガンド応答性の核内レセプター型の転写因子であり、脂肪蓄積の主調節因子である。PPAR- $\gamma$  合成アゴニストであるピオグリタゾン<sup>®</sup>は、肥満を伴う2型糖尿病のインスリン抵抗性改善治療薬として使用されている。近年、種々のがん細胞において PPAR- $\gamma$  が高発現しており、PPAR- $\gamma$  アゴニストが細胞周期の停止や細胞分化、アポトーシス誘導といった抗腫瘍効果を示すことが報告されている。PPAR- $\gamma$  アゴニストによるアポトーシス誘導は、NF- $\kappa$ B や Bcl-2 の抑制、G1 arrest (G1 期停止) などがそのメカニズムと考えられている [Brockman, J. A. *et al.*, *Gastroenterology*, **115**, 1049-1055 (1998); Chen, G. C. *et al.*, *Life Sci.*, **70**, 2631-2646 (2002)]。また、PPAR- $\gamma$  アゴニストには、大腸において前がん病変である ACF (巨大な腺管の集族) を消失させ、大腸発がんを予防する [Takahashi, H. *et al.*, *Mebio*, **22**, 39-47 (2005); 日薬理誌, **128**, 231-234 (2006)]、卵巣がん皮下担がんマウス及びがん性腹膜炎マウスにおいて皮下腫瘍の発育を有意に抑制し、がん性腹膜炎マウスの生存期間を有意に延長する [Xin, B. *et al.*, *Cancer*, **110**, 791-800 (2007)]、腫瘍細胞内の COX-2 非依存的にプロスタグランジン E2 を減少させ血管新生を抑制し、また腫瘍細胞をアポトーシスに誘導する [Shigetou, T. *et al.*, *Oncol. Rep.*, **18**, 833-840 (2007)]、抗がん剤との併用により抗腫瘍活性を相乗的に増強させる [椿 正寛ら、日本がん分子標的治療学会 第 16 回学術集会、北九州市、2012] などの効果が報告されている。

したがって、PPAR- $\gamma$  は新規抗がん剤の標的として、また PPAR- $\gamma$  アゴニストは抗がん剤の有効性を高める多剤併用薬として期待できる。しかし、上記研究で用いられた PPAR- $\gamma$  アゴニストは主にピオグリタゾンである。ピオグリタゾンには、心不全や肝機能障害、低血糖症のような重大な副作用が発症する可能性があり、さらに手術前後は使用禁忌となっており、臨床応用は現実的には困難な薬剤である。申請者らは植物成分由来のメタボリックシンドローム治療改善薬の研究の過程で、プレニルフラボノイドをはじめとするフェノール性の化合物やテルペン類に PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性があることを見出した。本研究では、これらの化合物に加え新たに PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性物質を探索し、それらのアポトーシスもしくはオートファジー型細胞死誘導活性を評価する。さらに臨床応用への展開を目的に PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性物質と、抗腫瘍活性ステロイド配糖体や強心ステロイドなどとの併用効果を検討する。PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性に着目した抗がん剤の研究例は少なく、特に天然物を対象とした系統的かつ本格的な探索研究は申請者らの研究が初めての例となる。また、臨床応用へ

の展開を志向した、天然資源由来 PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性物質と抗腫瘍活性天然物との併用効果に関する研究例はない。以上、本研究は天然資源からの新規抗がん剤の探索研究として、新たな試みと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を介してアポトーシスもしくはオートファジー型細胞死を誘導する天然物を探索し、PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性物質と抗腫瘍活性天然物との併用効果を見出すことを目的とする。このように天然物を対象とし、PPAR- $\gamma$  アゴニストの抗腫瘍活性に着目した研究は、国内外を問わず皆無である。本課題は天然からの新規抗がん剤の探索研究としては新たな試みであり、新しい型の抗がん剤のシード化合物の発見に繋がるものと期待される。併用により投与量の大幅な減量が可能となれば、これら天然物の PPAR- $\gamma$  アゴニスト併用による臨床応用への展開が期待できる。

## 3. 研究の方法

### 1) 抽出・分離・精製

生薬、薬用植物、ハーブ抽出物について、多孔質ポリスチレン樹脂 (Diaion HP-20<sup>®</sup>)、シリカゲル、ODS を充填したカラムクロマト、分取 HPLC など、各種クロマトグラフィーを駆使して常法により活性成分を単離した。

### 2) 構造決定

高分解能 mass スペクトルにより分子式を決定した後、NMR スペクトルを中心としたスペクトル (<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、1D selective TOCSY、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HMQC、HMBC、HSQC-TOCSY、2D TOCSY、NOESY、ROESY など) 解析により、平面構造ならびに相対立体配置を明らかにした。さらに、既知化合物への誘導や改良 Mosher 法により、絶対立体配置を決定した。

### 3) PPAR- $\gamma$ アゴニスト活性の評価

PPAR- $\gamma$  アゴニストの活性評価には EnBio RCAS for PPAR- $\gamma$  (藤倉化成株式会社) を用いた。PPAR- $\gamma$  はアゴニストと結合することで立体構造が変化し、コアクチベーター (CBP) と結合して複合体を形成する。本キットでは、96 穴マイクロタイタープレート上に CBP を固相化し複合体の形成を検出する。すなわち、はじめに核内受容体結合領域を含む CBP ペプチドをプレート上に固相化させ、次に CBP を固相化したプレート内で組換えヒト PPAR- $\gamma$  とサンプルを反応させる。プレート洗浄後、HRP の基質であるテトラメチルベンジジン (TMB) を加えて酵素反応を行い、一定時間後反応を停止する。この溶液の吸光度を 450 nm で測定することにより、サンプルのアゴニスト作用を検出する。測定サンプルがアゴニスト様物質である場合、アゴニストと結合した PPAR- $\gamma$  は立体構造が変化し、プレートに固相化した CBP とさらに結合し複合体を形成するため、吸光度はアゴニスト用量依

的に上昇する。

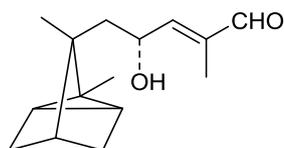
#### 4) 細胞毒性の評価

HL-60 ヒト白血病細胞や A549 ヒト肺腺がん細胞に対する細胞毒性および併用効果は、MTT 法や細胞の形態観察など、常法により評価した。

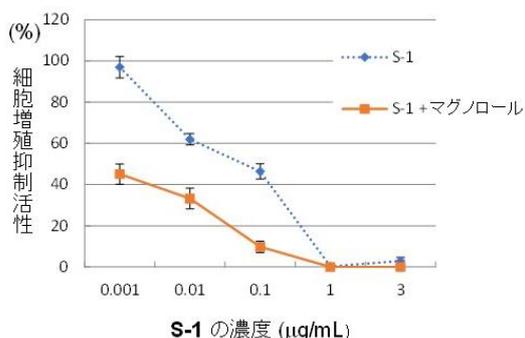
#### 4. 研究成果

##### 1) *Santalum album* 材から単離されたセスキテルペン類およびリグナン類の腫瘍細胞毒性とマグノロールとの併用効果

*Santalum album* 材のメタノール抽出エキスより単離した 24 種の化合物のうち、5 種のセスキテルペン類および 2 種のリグナン類は、HL-60 細胞や A549 細胞に対して選択的に細胞毒性を示した。これらの化合物と天然物由来の PPAR- $\gamma$  アゴニストであるマグノロールとの併用効果を検討した結果、濃度依存的に HL-60 細胞に対する毒性が増強した。特に、新規セスキテルペン (**S-1**) の細胞毒性は、マグノロールとの併用により 100 倍以上増強され、顕微鏡観察においてアポトーシス様の細胞死が確認された。なお、**S-1** とマグノロールとの併用により、TIG-3 ヒト正常線維芽細胞に対する細胞毒性が増強されることはなかった。



**S-1**



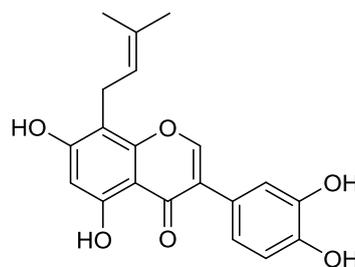
##### 2) 神秘湯の PPAR- $\gamma$ アゴニスト活性

漢方処方薬である神秘湯エキス (構成生薬: マオウ、キョウニン、コウボク、チンピ、カンゾウ、サイコ、ソヨウ) に PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性が認められたため、神秘湯の構成生薬を 1 つずつ抜いた「1 味抜き処方」を調製し、それらの PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を評価した。その結果、「神秘湯のマオウ抜き」エキスで活性が失われた。また、生薬マオウの抽出エキスに活性が認められたことから、マオウが神秘湯の PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性に関与していることが支持された。そこ

で、マオウのメタノール抽出エキスを Diaion HP-20<sup>®</sup> カラムクロマトに付し、順次極性を下げながら溶出させた。その結果、活性はエフェドリンアルカロイドを含まない低極性画分に集中した。低極性画分の成分探索を行ったところ、ステロール類、フラボノイド類、モノテルペン類が同定された。現在、これらステロール類、フラボノイド類、モノテルペン類の PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性、腫瘍細胞毒性、既存の抗がん剤の増強作用の有無を検討中である。

##### 3) 生薬カンゾウ (甘草) から単離されたフェノール性化合物の PPAR- $\gamma$ アゴニスト活性と抗がん剤との併用効果

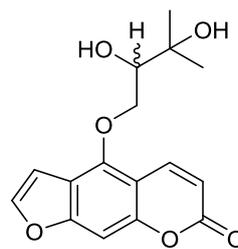
カンゾウ抽出物から単離した 63 種のフェノール性化合物のうち、強い PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を示した 9 種の化合物と抗がん剤 (エトポシド、シスプラチン) との併用効果を検討した。その結果、プレニルイソフラボノイド誘導体 (**G-1**) は、エトポシドの A549 細胞に対する細胞毒性を増強させた。



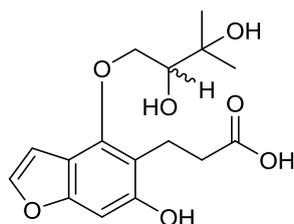
**G-1**

##### 4) 生薬ビャクシ (白芷) から単離された化合物の PPAR- $\gamma$ アゴニスト活性と抗がん剤との併用効果

ビャクシのメタノール抽出エキスより 14 種の新規化合物を含む 24 種の化合物を単離した。これらのうち、収量の多い化合物の PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を測定したところ、oxypeucedanin hydrate (**B-1**) が最も強い活性を示した。現在、oxypeucedanin hydrate と抗がん剤との併用効果を検討中である。また、新規クマリン誘導体 (**B-2**) は、エトポシドの A549 細胞に対する細胞毒性を増強した。



**B-1**

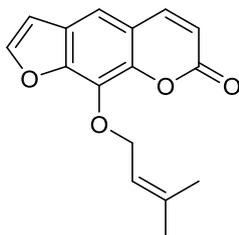


**B-2**

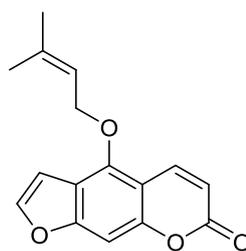
### 5) 生薬ハマボウフウ（浜防風）の PPAR- $\gamma$ アゴニスト活性成分

ハマボウフウのメタノール抽出エキスを Diaion HP-20<sup>®</sup> カラムクロマトグラフィーにより分画した。その結果、エタノール溶出画分と酢酸エチル溶出画分が PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を示したことから、両画分の成分探索を行った。その結果、5 種のフラノクマリン類と 3 種のポリアセチレン類が単離された。

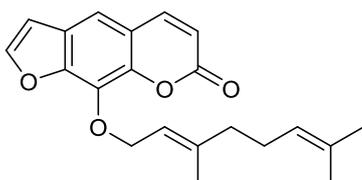
このうち、プレニル基を有するフラノクマリン誘導体の imperatorin (**H-1**)、isoimperatorin (**H-2**)、8-geranyloxypsoralen (**H-3**) が比較的強い PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を示した。現在、これらフラノクマリン誘導体と抗がん剤との併用効果を検討中である。



**H-1**



**H-2**



**H-3**

また、**H-1** と **H-2** の PPAR- $\gamma$  アゴニスト活性を *in vivo* で評価した。**H-1** と **H-2** をそれぞれ ddY 雄性マウスに単回で経口投与し、2 時間後に腹部大静脈から採血した血清の PPAR- $\gamma$  活性を測定したが、現在のところ活性は確認されていない。

以上、*Santalum album* 材よりマグノロールとの併用により、HL-60 細胞に対する腫瘍細胞毒性が 100 倍以上増強する新規セスキテルペンを見出した。また、カンゾウよりエトポシドの A549 細胞に対する細胞毒性を増強させるプレニルイソフラボノイド誘導体を、ビャクシより同じくエトポシドの A549 細胞に対する細胞毒性を増強させる新規クマリン誘導体を同定した。本研究成果は、PPAR- $\gamma$  を標的とした新たながん化学療法の端緒になりうるものと期待される。

### 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 5 件) 関連論文も含む。

1) Matsuo Y., Akagi N., Hashimoto C., Tachikawa F., Mimaki Y., Steroidal glycosides from the bulbs of *Bessera elegans* and their cytotoxic activities. *Phytochemistry*, **96**, 244-256 (2013). 査読有

2) Kuroda M., Kubo S., Matsuo Y., Atou T., Satoh J., Fujino T., Hayakawa M., Mimaki Y., New cardenolide glycosides from the seeds of *Digitalis purpurea* and their cytotoxic activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **77**, 1186-1192 (2013). 査読有

3) Matsuo Y., Sakagami H., Mimaki Y., A rare type of sesquiterpene and  $\beta$ -santalol derivatives from *Santalum album* and their cytotoxic activities. *Chem. Pharm. Bull.*, **62**, 1192-1199 (2014). 査読有

4) Matsuo Y., Takaku R., Mimaki Y., Novel steroidal glycosides from the bulbs of *Lilium pumilum*. *Molecules*, **20**, 16255-16265 (2015). 査読有

5) Matsuo Y., Maeda S., Ohba C., Fukaya H., Mimaki Y., Vetiverianines A, B, and C: Sesquiterpenoids from *Vetiveria zizanioides*. *Roots. J. Nat. Prod.*, **79**, 2175-2180 (2016). 査読有

[学会発表] (計 10 件) 関連発表も含む。

1) 栗原理沙、松尾侑希子、三巻祥浩、ユリ科植物の化学成分 (79) *Bessera elegans* の化学成分について、日本生薬学会 第 60 回年会、

2013年9月、札幌

2) 橋本千聖、松尾侑希子、三巻祥浩、*Bessera elegans* の化学成分と細胞毒性について (2)、日本生薬学会 第60回年会、2013年9月、札幌

3) 松尾侑希子、三巻祥浩、ビャクダン (*Santalum album*) の細胞増殖抑制活性成分について (6)、日本薬学会 第134年会、2014年3月、熊本

4) 山口絵美、松尾侑希子、三巻祥浩、白芷の化学成分に関する研究 (1)、日本生薬学会 第61回年会、2014年9月、福岡

5) 松尾侑希子、橋本千聖、赤城那奈、三巻祥浩、ユリ科 *Bessera elegans* 鱗茎の化学成分と腫瘍細胞毒性、第20回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2014年11月、東京

6) 松尾侑希子、高久玲奈、三巻祥浩、ユリ科植物の化学成分 (83) *Lilium pumilum* の化学成分と細胞毒性について (2)、日本薬学会 第135年会、2015年3月、神戸

7) 袴田 遼、山口絵美、松尾侑希子、三巻祥浩、ビャクシの化学成分に関する研究 (2)、日本薬学会 第136年会、2016年3月、横浜

8) 大友佳苗、松尾侑希子、三巻祥浩、浜防風の化学成分と PPAR- $\gamma$  活性について、日本生薬学会 第63回年会、2016年9月、富山

9) 小原若菜、松尾侑希子、三巻祥浩、浜防風の化学成分と細胞毒性について、日本生薬学会 第63回年会、2016年9月、富山

10) 袴田 遼、山口絵美、松尾侑希子、三巻祥浩、ビャクシの化学成分に関する研究 (3)、日本生薬学会 第63回年会、2016年9月、富山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三巻祥浩 (MIMAKI, YOSHIHIRO)  
東京薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90229790

### (2) 研究分担者

松尾侑希子 (MATSUO, YUKIKO)  
東京薬科大学・薬学部・助手  
研究者番号：70434016