

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23809

研究課題名(和文)植物由来ステロイド配糖体のミトコンドリア非依存的アポトーシス誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of induction of apoptosis by steroidal glycosides via a mitochondria-independent pathway

研究代表者

井口 巴樹(Iguchi, Tomoki)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90847120

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文): ヒト腫瘍細胞に対してミトコンドリア非依存的にアポトーシスを誘導することが示された高等植物由来ステロイド配糖体について、詳細なアポトーシス誘導メカニズムの解明に取り組んだ。ミトコンドリア非依存的なアポトーシスに関連しているcaspase-8、caspase-12、デスリガンドについて、ウエスタンブロット法による検出を試みた。Caspase-8については安定した再現性が得られる検出条件を確立することができた。さらに、一部のステロイド配糖体ではcaspase-8を活性化させることも明らかにした。一方、caspase-12あるいはデスリガンドについては、引き続き、検出条件確立に向けた実験が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然由来化合物を用いた抗腫瘍活性や細胞死誘導メカニズムの研究は国内外において盛んに行われている。しかし、アポトーシスをミトコンドリア非依存的に誘導するステロイド配糖体の報告は非常に少ない。このことより、ステロイド配糖体のミトコンドリア非依存的なアポトーシス誘導メカニズムの解明は新規がん治療薬シーズ創出に向けて大きな意義がある。本研究を通して、ミトコンドリア非依存的なアポトーシスを誘導するステロイド配糖体のメカニズム解明に向けた研究手法を一部確立することができ、今後関連の研究を遂行する上で、非常に有意義な成果が得られた。将来的には、新たながん治療薬シーズの創出につながることも期待される。

研究成果の概要(英文): Steroidal glycosides from natural plant that induce apoptosis via a mitochondria-independent pathway have been investigated for their apoptosis inducing mechanism. Western blotting attempted to detect caspase-8, caspase-12, and death ligand involved in apoptosis via a mitochondrial-independent pathway. As a result, establishment of highly reproducible detection conditions of caspase-8 was achieved. In addition, some of the steroidal glycosides isolated by the applicant induced apoptosis, including activation of caspase-8 on tumor cells. On the other hand, further examination is required for establishment of detection conditions of caspase-12 or death-ligand.

研究分野：天然物化学

キーワード：ステロイド配糖体 ミトコンドリア非依存的 アポトーシス 天然物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する薬物療法は分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の研究開発により飛躍的な発展を遂げている。その一方、既存の化学療法薬しか適応のないがんや再発・難治がんの症例も多く存在し、既存の化学療法薬による治療には限界がある。このことより、既存の化学療法薬とは異なる作用メカニズムを有するがん治療薬の開発は喫緊の課題であると考えられた。

申請者は新規がん治療薬シーズの探索を目的として、高等植物に含有される化学成分の探索を行い、ユリ科 *Ornithogalum saundersiae* 鱗茎より、ヒト腫瘍細胞に対して強力な抗腫瘍活性を示す数種のステロイド配糖体を見出した (Figure 1)。それらの化合物はヒト腫瘍細胞をミトコンドリア非依存的にアポトーシスに誘導していることが明らかとなった。一方、臨床医療で使用されている etoposide、cisplatin、paclitaxel をはじめとした化学療法薬はミトコンドリア依存的にアポトーシスを誘導していた。天然物を由来とする化合物の腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムの研究は国内外で種々行われているが、ミトコンドリア非依存的にアポトーシスを誘導する化合物の報告は少ない。これらの結果より、申請者が *O. saundersiae* 鱗茎より得たステロイド配糖体は既存の化学療法薬とは異なる作用メカニズムを有している可能性が考えられたため、詳細な作用メカニズムの解明の検討に着手した。

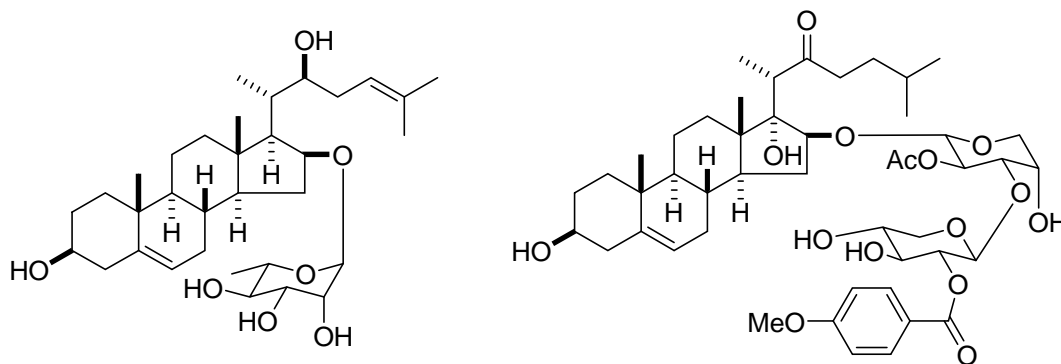


Figure 1. *O. saundersiae* 鱗茎より単離されたステロイド配糖体

2. 研究の目的

本研究は、新規作用メカニズムを有するがん治療薬の開発を志向して、ミトコンドリア非依存的にアポトーシスを誘導するステロイド配糖体について、その化合物が標的とする分子やシグナル伝達を含めた詳細なアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的としている。

3. 研究の方法

申請者がユリ科 *O. saundersiae* 鱗茎から得た数種のステロイド配糖体は強力な抗腫瘍活性を示し、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導した。それらのステロイド配糖体でそれぞれ処理した腫瘍細胞について、ミトコンドリア膜電位の変化を観察した。通常、正常細胞のミトコンドリア膜電位は負に帯電しているが、ミトコンドリアを介してアポトーシスが誘導された場合、ミトコンドリア膜電位が消失する。Etoposide や cisplatin などの既存の化学療法薬で処理した腫瘍細胞ではミトコンドリア膜電位が消失したのに対し、各ステロイド配糖体で処理した腫瘍細胞ではその消失は認められなかった。ま

た、ミトコンドリアを介してアポトーシスが誘導される場合、cytochrome *c* がミトコンドリアから細胞質へ放出されることも知られている。申請者が得た各ステロイド配糖体で処理した腫瘍細胞では、cytochrome *c* の細胞質への放出は認められなかった。これらの実験結果を背景に、まずミトコンドリアを介さないアポトーシスに関連している caspase-8 のウエスタンブロット法による検出に取り組んだ。Caspase-8 の検出条件を確立後、FasL、TRAIL などのデスリガンドの検出条件設定に着手した。それと同時に、caspase-12 についてもウエスタンブロット法による検出を試みた。

4. 研究成果

ミトコンドリア非依存的なアポトーシスの誘導に関連している caspase-8 について、ウエスタンブロット法による検出条件を確立した。陽性対照の化合物を用いて検討を繰り返し、安定した再現性を得られるようになった。その後、申請者が *O. saundersiae* 鱗茎ではない高等植物から得たステロイド配糖体を用いて予備的に評価した。その結果、当該ステロイド配糖体は caspase-8 を活性化させることが明らかになった（現在、研究が進行中であるため、使用した化合物ならびに結果は非公表）。また、デスリガンドならびに caspase-12 のウエスタンブロット法による検出については、条件を確立することができておらず、引き続き、鋭意研究に取り組んでいる。今後、デスリガンドや caspase-12 を再現性良く検出することができるようになった際に、*O. saundersiae* 鱗茎から得たステロイド配糖体を用いて評価を行うことを予定している。

また、本研究に関連して、ユリ科 *Fritillaria camtschatcensis* 鱗茎より得られたステロイドアルカロイド配糖体（以下、A）の抗腫瘍活性についても検討を行った（Figure 2）。化合物 A で処理した HL-60 ヒト白血病細胞について、MTT（3-(4,5-dimethylthial-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide）法により経時的な細胞生存率を測定したところ、非常に短時間で HL-60 細胞の生存率が低下することが明らかとなった。そこで、A で処理した HL-60 細胞を DAPI（4',6-diamidino-2-phenylindole）あるいは YOYO-1 で染色して蛍光顕微鏡で観察した結果、HL-60 細胞の細胞膜破壊が確認できた（Figure 3、4）。このことから、A は HL-60 細胞に対してネクローシス様の細胞死をもたらすことが示された。

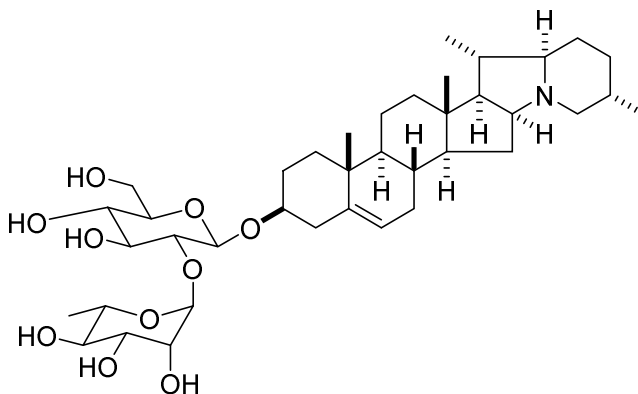


Figure 2. *F. camtschatcensis* 鱗茎より単離されたステロイドアルカロイド配糖体 A

本研究を通して確立された実験条件ならびに得られた知見を基に、引き続き、新規作用メカニズムを有するがん治療薬シーズ創出に向けてミトコンドリア非依存的なアポトーシス誘導メカニズムの解明に取り組む所存である。

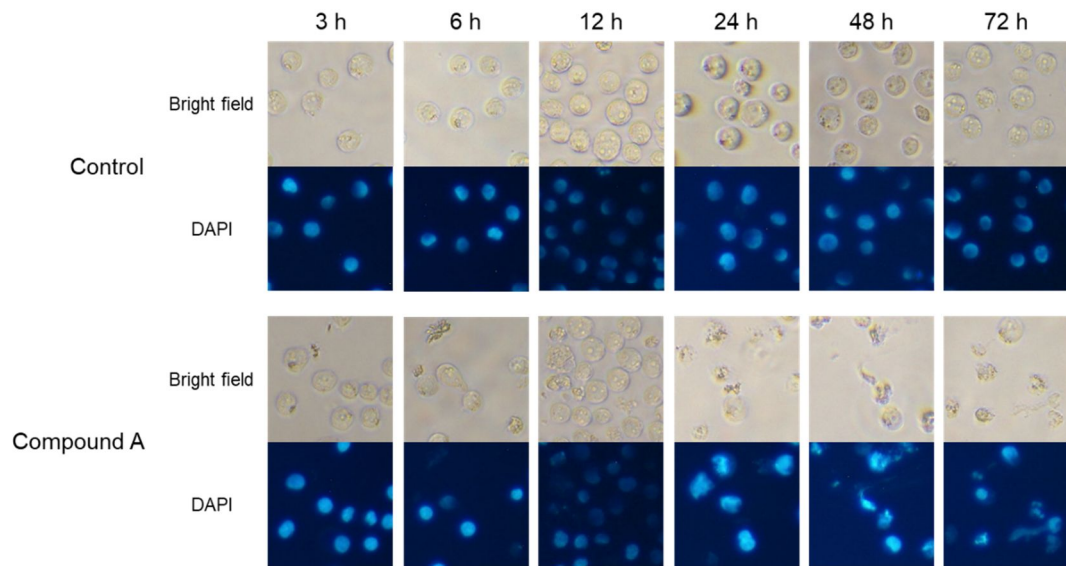


Figure 3. 化合物 A で処理した HL-60 細胞を DAPI で染色し、蛍光顕微鏡により観察した際の HL-60 細胞の形態

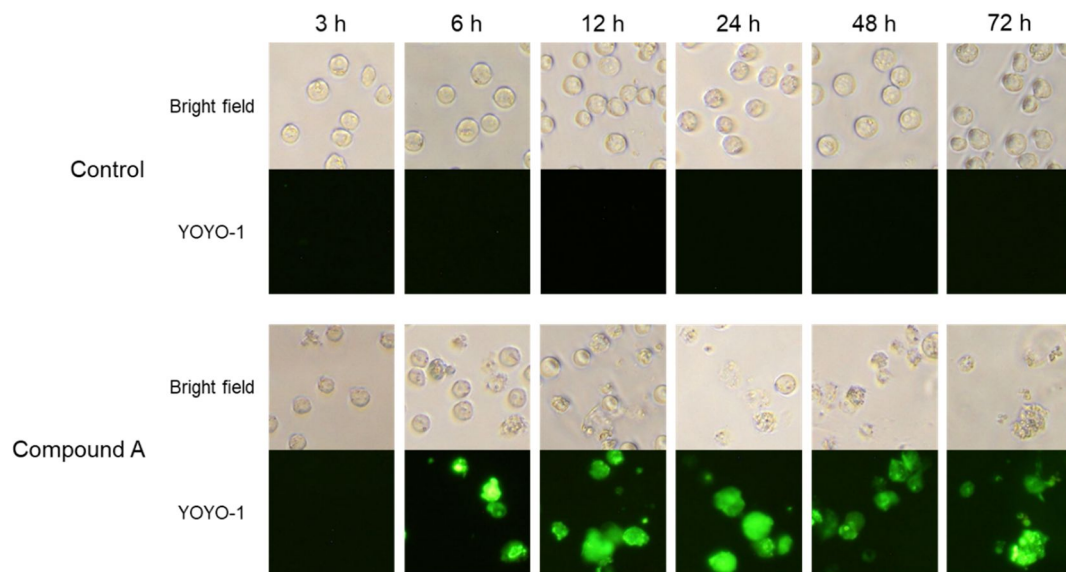


Figure 4 化合物 A で処理した HL-60 細胞を YOYO-1 で染色し、蛍光顕微鏡により観察した際の HL-60 細胞の形態

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Iguchi Tomoki, Kuroda Minpei, Takayama Hiroshi, Mimaki Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Three novel furospirostanol glycosides and a steroidal alkaloid glycoside from the bulbs of <i>Fritillaria camtschaticensis</i> (L.) Ker Gawl., and their cytotoxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Natural Product Research	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14786419.2021.1897590	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------