

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08004

研究課題名(和文) 抗がん剤の副作用低減を目指した天然物アミノ酸誘導体の合成

研究課題名(英文) Synthesis of cytotoxic amino acid derivatives from natural product

研究代表者

浮谷 基彦 (UKIYA, Motohiko)

日本大学・理工学部・准教授

研究者番号：40318358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：天然資源として入手容易かつ生物活性が期待できる化合物として、トリテルペノイドのファラジオール、ジテルペノイドのイソステビオールを選択し、それらのアミノ酸結合体、 α -アミノ酸誘導体を合成した。ファラジオール アミノ酸誘導体は、がん細胞に対し低濃度で細胞死を誘導し、また、その作用機構はアポトーシス誘導によるものであることを明らかにした。また、イソステビオールを用いて合成したアミノ酸結合体は、アポトーシス関連タンパク質であるカスパーゼを活性化していることも明らかにした。さらにイソステビオールからは β -アミノ酸誘導体も合成し、化学的にその構造を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared amino acid conjugates and amino acid derivatives from natural triterpenoid; faradiol, and diterpenoid; isosteviol. Faradiol-amino acid conjugate showed potent cytotoxicities against the four human cancer cell lines (HL60, A549, AZ521, and SK-BR-3) and the mode of action was thought to be apoptosis inducing effects which was analyzed by flowcytometry using Annexin V and propidium iodide. Furthermore, isosteviol-amino acid conjugates are also prepared. These showed potent cytotoxicities against the four human cancer cell lines. The mode of action of the compound was determined as activation of some apoptosis related protein, caspase-3 and caspase-8 by Western-Blotting analysis. In addition, seco-type ent-beyerane β -amino acid was prepared from isosteviol and the stereochemistry was determined by spectroscopic method.

研究分野：天然物化学

キーワード：テルペノイド 腫瘍細胞傷害活性 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

がん治療に使用されている抗がん剤の多くは、骨髄抑制、肺毒性、心毒性、脱毛などの副作用を伴う。原因の一つに、抗がん剤の正常細胞に対する毒性が挙げられる。これは、抗がん剤のがん細胞に対する選択性が低い事に起因している。このような背景から、“がん細胞に対して選択的に作用する”抗がん剤が必要とされている。研究戦略の一つに、がん細胞の増殖に関わる生体分子を標的とした抗がん剤(分子標的薬)の開発があり、トランスズマブ(乳がん治療薬; HER2 受容体を標的)などの分子標的薬が治療効果をあげている。これらの分子標的薬はがん細胞への高い特異性を持ち、骨髄抑制はほぼ発現しないなど有用性が高いが、副作用を完全になくすことは出来ておらず、肺毒性、心毒性、嘔吐などが発現するものがある。このような状況から、がん細胞に対して、より選択的に作用する新しい抗がん剤の開発が期待されている。本研究は、この課題を解決するために、以下の考えで選択性の高い抗がん剤を開発しようとするものである。

細胞表面にはトランスポーター(輸送タンパク質)などの機能性タンパク質が存在しているが、がん細胞ではその発現が変化している。本申請で着目したのは、がん細胞に多く発現しているアミノ酸トランスポーター LAT1(l-amino acid transporter 1)である。LAT1 は金井らによりクローニングされたアミノ酸トランスポーターで(*The Journal of Biological Chemistry*, **273**, 23629-23632, 1998)、様々ながん細胞で発現が増加している。LAT1 の阻害(アミノ酸取込阻害)や LAT1 を利用した抗がん剤輸送により、がん細胞選択性が高く副作用の少ない抗がん剤が開発できると考えられ、近年、企業・大学を中心とした LAT1 を標的とした研究が進められている。

2. 研究の目的

本研究では、天然物化学の立場からアミノ酸トランスポーターを標的とした抗がん剤合成に取り組む。申請者は予備研究としてテルペノイド-アミノ酸誘導体を合成し、正常細胞よりもがん細胞に対し最大 21 倍の選択性を示すことを報告した(*Chemistry & Biodiversity*, **10**, 1260-1268, 2013)。一方で申請者は、天然物の単離研究において、ニーム(センダン科植物)に含まれるテルペノイドの白血病細胞・肺がん細胞などに対する強い抗がん活性を報告している(*Chemistry & Biodiversity*, **11**, 451-468, 2014)。そこで、これらのテルペノイドにアミノ酸構造を導入した分子を合成することで、アミノ酸トランスポーター阻害またはアミノ酸トランスポーターを介した分子の取り込みにより、選択的にがん細胞を死滅する分子を合成する。

3. 研究の方法

アミノ酸トランスポーター LAT1 に作用する分子は、アミノ酸類似構造を持つ分子であると予想される。そこで、抗がん活性を持つ天然分子のアミノ酸誘導体化を主に行っていく。分子の合成後、逐次、がん細胞、正常細胞を用いた活性評価を実施し、選択性・作用機構・構造活性相関を明らかにする。

(1) 基質(天然物)の単離

植物試料に、ニーム(センダン科)、マリーゴールド(キク科)などを用いる。これらの植物にはテルペノイドおよびその配糖体が含まれており、いずれも強い抗がん活性を示す。化合物の単離には、各種クロマト法[フラッシュカラムクロマト、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等]を使用し、原料化合物をグラム単位で単離する。化合物の同定は、各種スペクトル法[核磁気共鳴スペクトル(NMR)、質量スペクトル(MS)など]で行う。

(2) アミノ酸誘導体の合成

アミノ酸結合型分子およびアミノ基・カルボキシ基導入型誘導体(アミノ酸を部分構造として持つ誘導体)を合成する。一般的な反応方法(エステル化、アミド化、酸化、還元、還元アミノ化反応)により行うが、立体障害などで収率が大きく変わる為、反応方法・反応条件の最適化を行い、高収率な反応方法を確立する。

(3) がん細胞に対する傷害活性評価

A549(肺がん)、HL60(白血病)、A2521(十二指腸がん)、SK-BR-3(乳がん)細胞を用いて試験を行う。これらの LAT1 発現量は各細胞を溶解処理し、抗 LAT1 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法で確認して試験に用い、LAT1 発現量と抗がん活性の関係も併せて評価する。抗がん活性は MTT 法およびトリパンブルー法による細胞生存率から算出する。

(4) 選択性評価(正常細胞に対する傷害活性評価)

正常細胞モデルに WI-38(肺正常細胞)を用い、MTT 法およびトリパンブルー法により細胞生存率および選択性を算出する。

4. 研究成果

(1) キク科植物トリテルペノイド-アミノ酸結合体の合成と細胞傷害活性

天然に豊富に存在するテルペノイド類の中で、キク科植物に含まれるファラジオールと呼ばれる化合物に注目をした。本化合物は、5 環性トリテルペノイドの 1 種で、タラクサスタン骨格を持つ事が特徴である。タラクサスタン骨格は、トリテルペノイドの中で生物活性を持つ事が多数報告されているウルサン骨格と 3 か所だけ立体配置が異なる化合物で、その生物活性に非常に興味を持たれる化合物である。また、ヒマワリなどに多く含まれ、入手が容易な利点を持つ。本化合物を、一般的なアミノ酸である L-アラニンと結合することにより、がん細胞に対し、高い傷害活性を示すことを明らかにした(図 1)。

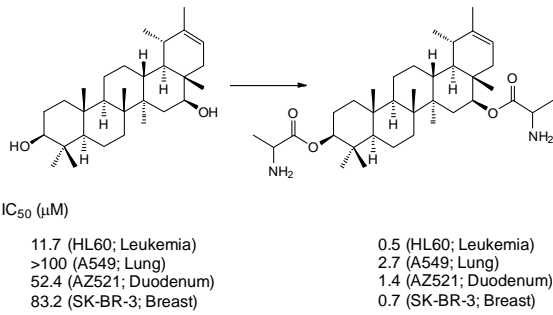


図1 ファラジオール誘導体の生物活性

さらに、その作用機構をアポトーシス誘導の観点から明らかにする為、フローサイト分析を行った。ここでは、アポトーシス細胞の膜表面に観察される膜脂質であるホスファチジルセリンを、Annexin V により検出し、図2の結果を得た。

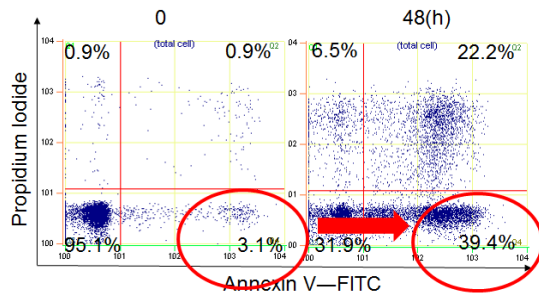


図2 フローサイト分析結果

ここに示した図は、ファラジオール L-アラニン結合体を 5μM の濃度で白血病細胞株 (HL-60) に 24 時間作用させた後のアポトーシス細胞、ネクローシス細胞の分析結果である。0 時間のアポトーシス細胞 (チャート右下) は 3.1% であったが、48 時間作用後は 39.4% に増加している。この結果、ファラジオール L-アラニン結合体は、主にアポトーシス誘導によりがん細胞に傷害活性を示していることが明らかになった。これまでにタラクサスタン骨格を持つトリテルペノイドにアミノ酸を結合した報告、さらにはその生物活性を評価した報告は無く、本知見は、タラクサスタン骨格を持つトリテルペノイドでは初めて得られた知見であり、天然物化学におけるトリテルペノイド研究分野で有用な知見となると考えている。

(2) 天然テルペノイドに対するα-アミノ酸構造の導入

α-アミノ酸構造を持つ化合物は、LAT1(L-型アミノ酸輸送体)に特異的に作用するとの考えから、天然に豊富に存在するテルペノイドのうち、商業レベルで入手可能な2つの化合物を用い、α-アミノ酸構造の導入および細胞傷害活性の評価を行った。

まず、マツヤニから豊富に得られる天然資源である、デヒドロアビエチン酸を用いて 19

位に対するストレッチャー反応を行い、α-アミノ酸合成を試みた (図3)。この結果、19位の立体傷害が大きく、化学反応を進みにくいたことが判明し、得られた化合物はアミノニトリルとなった。本化合物は、18位の立体化学が2種類存在 (S-form および R-form) し、その区別が課題となったが、合成中間体 (フェニルグリシノール結合体) の安定立体配座を分子力場法を用いて計算した結果、フェニル基の空間配向が大きく異なることが示された。この結果を受け、NMR (核磁気共鳴スペクトル) にて合成中間体の NOE (核オーバーハウザー効果) 測定を行い、S-form および R-form を区別できることを示した。

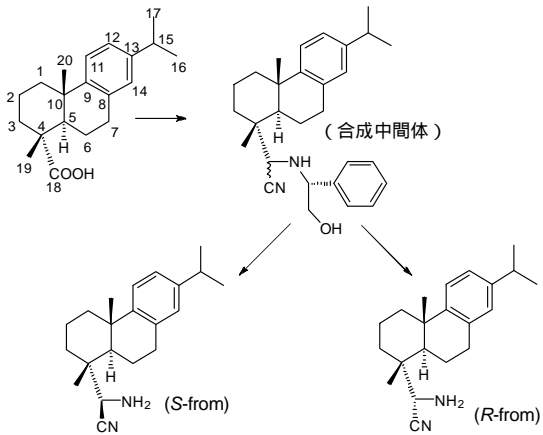


図3 デヒドロアビエチン酸誘導体合成

これらの化合物に対し、がん細胞、正常細胞に対する傷害試験を行ったところ、S-formの方がわずかに R-form よりもがん細胞に対する選択性を示した。この知見は、S-form が天然の L-アミノ酸と同じ立体化学を持つ点を踏まえると興味深い点であり、立体化学と選択性の関係を検討する基礎データとなった。本研究は、現在、他のテルペノイドを用いて継続研究中である。

次に、天然甘味料として知られるステビア葉部に含まれるジテルペノイド配糖体、ステビオンドを加水分解して得られるイソステビオールを原料としたα-アミノ酸合成を行った (図4)。イソステビオールは、その誘導体に関して、がん細胞傷害活性が報告されており、抗がん性化合物の開発において注目すべきジテルペノイドである。ここでは、イソステビオールから以下に示す構造のα-アミノ

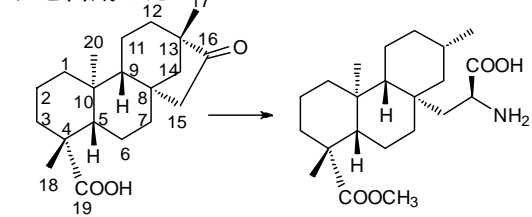


図4 イソステビオール誘導体合成

本化合物は、天然ジテルペノイドから誘導

された α -アミノ酸としては初めての化合物になるという点で、その合成方法、スペクトルデータを明らかにしたことは、天然物化学合成の観点から、非常に有用であると考えられる。しかしながら、本化合物は、がん細胞に対する傷害活性が非常に弱く、当初予想していた、がん細胞に対する選択性などの研究を進展するには至らなかった。

(3) イソステピオール - α -アミノ酸結合体の合成と生物活性

イソステピオールに対し、ファラジオールで得られた成果を基にして、種々のL型、D型アミノ酸を結合し(図5)、その生物活性を評価した結果、HL60(白血病)、A549(肺がん)、MKN-45(胃がん)細胞株に対し、ほぼ5 μ M以下のIC₅₀値を示し、非常に強い細胞傷害活性を示すことを明らかにした。これらの化合物のうち、L-イソロイシン結合体に対して、アポトーシス誘導の観点からその作用機構の評価を行った。

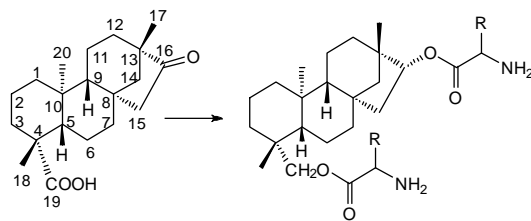


図5 イソステピオール - アミノ酸結合体

まず、化合物を作用させた細胞の細胞核を染色し観察をした。図6の左が作用前、右が作用後である。矢印で示した箇所は、細胞核の凝集または分裂が観察されている。これは、細胞核の形態観察からアポトーシスが起きていることを示唆する結果である。

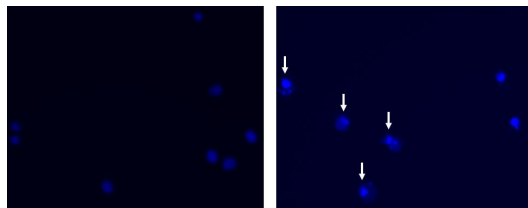


図6 がん細胞のヘキスト染色写真

さらに、フローサイト分析により、アポトーシス細胞がどの程度存在するかを観察した。

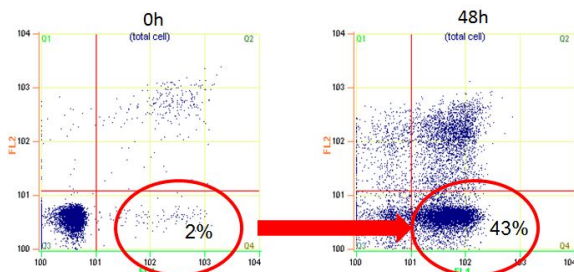


図7 フローサイト分析結果

図7の左は、作用0時間、右が48時間後の結果である。この結果、アポトーシス細胞の割合は、0時間で約2%、48時間後に約43%に増加していた。この結果、化合物を作用させた細胞では、ホスファチジルセリンの細胞膜表面への露出が観察されたことから、アポトーシス誘導が起きていることが判明した。さらに、その作用機構をアポトーシス誘導タンパク質量の増減から把握するため、アポトーシス関連タンパク質であるカスパーゼ-3、-8、-9およびBax, Bcl-2の量をウエスタンブロット法で分析した(図8)。

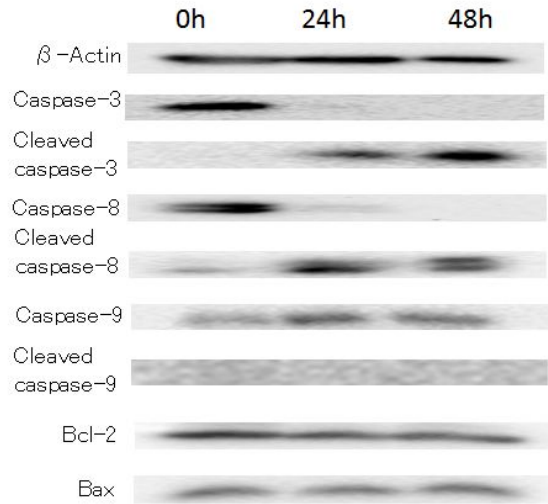


図8 アポトーシス関連タンパク質の分析

この結果、Caspase-3およびCaspase-8の量が時間経過とともに減少し、開裂型が増加していた。また、Caspase-9, Bcl-2, Baxの量に変化は認められなかった。つまり、図9のシグナル伝達経路のうち、左側(Caspase-8, -3が関与)によりアポトーシスを誘導していることが判明した。

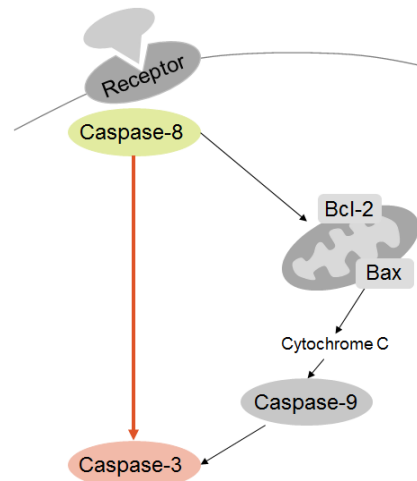


図9 アポトーシス誘導のシグナル伝達経路

さらに、Caspase-8阻害剤(Z-IETD-FMK)を用い、細胞傷害試験を実施したところ、阻害剤を添加した場合には、細胞の生存率が回

復することが確認された。この結果より、ステビオールに L-イソロイシンを結合した分子は、Caspase-8, -3 を活性化する経路で、がん細胞にアポトーシスを誘導していることを明らかにした。本研究は、ジテルペノイド-アミノ酸結合体の詳細な、がん細胞傷害機構を解明した点で、非常に意義のある研究であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Motohiko Ukiya, Chika Ohkubo, Masahiro Kurita, Makoto Fukatsu, Takashi Suzuki, Toshihiro Akihisa, Cytotoxic and apoptosis-inducing activities of taraxastane-type triterpenoid derivatives in human cancer cell lines, *Chem. Biodiversity*, **13**, 1018-1-29 (2016). (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

保科裕子,仁科淳良,深津 誠,浮谷基彦,鈴木 孝,栗田雅弘,日本生薬学科第 64 回年会,2017 年 9 月(千葉)
岡崎航太,浮谷基彦,仁科淳良,深津 誠,鈴木 孝,栗田雅弘,日本生薬学科第 64 回年会,2017 年 9 月(千葉)
細野智史,浮谷基彦,吉井 恵,早川哲平,深津 誠,仁科淳良,鈴木 孝,栗田雅弘,日本薬学会第 136 年会,2016 年 3 月(神奈川).

6. 研究組織

(1)研究代表者

浮谷 基彦 (UKIYA, Motohiko)
日本大学・理工学部・准教授
研究者番号: 4 0 3 1 8 3 5 8

(2)研究分担者

深津 誠 (FUKATSU Makoto)
日本大学・短期大学部・教授
研究者番号: 8 0 1 8 1 2 3 8

鈴木 孝 (SUZUKI Takashi)
日本大学・薬学部・教授
研究者番号: 4 0 3 1 8 4 5 7