

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08339

研究課題名(和文) Timosaponin AIIIの細胞標的と新規活性の同定

研究課題名(英文) Identification of target molecules and functions of Tomosaponin AIII

研究代表者

石崎 敏理 (Ishizaki, Toshimasa)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：70293876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：和漢薬をはじめとする伝統薬物は、西洋医学で用いられる薬物では治療困難な疾患に対しても効果を示す例が数多くある。一方で、伝統薬物は含有成分が多く、そのことが薬理作用の包括的理解並びに治療薬としての有効性を提示することを困難にしている。本研究期間内に我々は知母に含まれるチモサポニンA3は低分子量GTP結合タンパク質Racの上流で、またオウゴンに含まれるバイカレインはRacの下流情報伝達経路を阻害することにより、細胞形態・細胞運動の抑制活性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

漢方の基本原理とされている理論は、経験的に後付けされたものが多い。しかし、その作用は多彩で、有効であることも広く理解されている。本研究では、漢方薬に含まれる天然化合物の漢方薬を効果的に処方するには、含まれる天然化合物の作用を明らかにすることが不可欠であり、本研究は、漢方薬の作用の科学的に理解を深めることに貢献したものと考えている。

研究成果の概要(英文)：There are many cases where traditional drugs such as Japanese and Chinese medicines are effective against diseases that are difficult to treat with drugs used in Western medicine. On the other hand, traditional drugs have many components, which makes it difficult to provide a comprehensive understanding of their pharmacological actions and their effectiveness as therapeutic agents. During the period of this study, we found that Timosaponin A3 and baicalein suppress cell migration through upstream or downstream inhibition of small GTPase Rac, respectively.

研究分野：天然物科学

キーワード：チモサポニン 細胞運動 細胞接着 細胞内情報伝達 カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

和漢薬をはじめとする伝統薬物は、西洋医学で用いられる薬物では治療困難な疾患に対しても効果を示す例が数多くある。一方で、伝統薬物は含有成分が多く、そのことが薬理作用の包括的理解並びに治療薬としての有効性を提示することを困難にしている。

2. 研究の目的

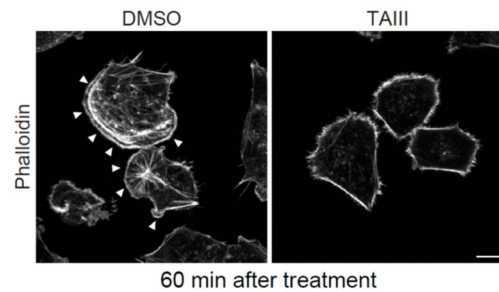
現在、医薬品として用いられている漢方薬構成成分の天然化学物質の新たな作用点・分子機序を明らかにすることで、治療薬としての科学的な有効性の明確化を加速させることを目的とする。

3. 研究の方法

生薬由来化合物 96 種を培養細胞に添加し、細胞増殖・細胞形態・細胞運動に影響を与える天然化合物を単離した。その結果、細胞運動への影響を与えるものとしてチモサポニン A3、バイカレインを、細胞増殖抑制効果を発揮するものとしてベルベリン、コプチシンを同定した。細胞形態・運動を抑制する天然化合物の作用点の解析には、主として細胞のライブイメージングで解析後、細胞内情報伝達経路の解明を実施した。細胞増殖抑制効果を発揮する天然化合物については、DNA 複製への影響を精製したトポイソメラーゼを用い、パルスフィールドゲル電気泳動で確認後、その分子機序の詳細な解析を実施した。

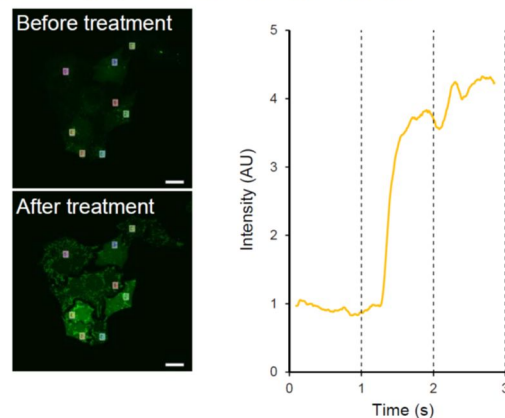
4. 研究成果

チモサポニンの新たな作用点の解析:チモサポニンを培養細胞に添加することにより、細胞運動・細胞形態変化を誘導することを見出した(右図)。この運動能抑制・形態変化は、アクチン細胞骨格再編成に寄与する Rac の下流情報伝達経路がチモサポニン添加により阻害されていることに起因することを見出した(論文投稿準備中)



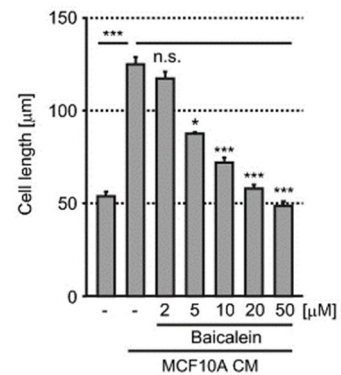
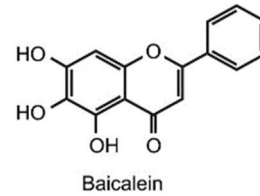
また、チモサポニン添加により、細胞表面に存在する標的分子(同定済み)に作用することにより、細胞内カルシウムの上昇が起こることを見出した(下図)。チモサポニン A3 添加によるカルシウム濃度の上昇は、チモサポニン A3 と構造が類似している他のステロイド配糖体(チモサポニン B2、ジゴキシン)に比べ、著しく高いことが判明した。さらにこの細胞内カルシウムの増加が誘因となって、ERK のリン酸化が亢進していることが判明した。この結果は、これまでのステロイド配糖体による細胞内カルシウムの上昇機構とは異なるものであることが実験的に証明されつつある(論文作成中)。

Ca²⁺ imaging in HeLa cells treated with TAIII.



バicaleinによる細胞形態変化と細胞運動への影響：

フラボノイドの一種であるバicaleinは（右図上段）、キサンチンオキシダーゼ阻害薬として知られているとともに、末梢ヒト白血球における抗炎症効果が研究されている。我々はバicaleinの新たな作用として、Rac 依存的な葉状仮足形成を阻害することで細胞運動を抑制することを見出した。乳腺上皮細胞 MCF10A の培養上清をヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に添加すると、細胞運動が亢進する（右図下段）。これは MCF10A から分泌される laminin-332 が Rac を活性化し、細胞運動が亢進することによること、この laminin-332 依存的な細胞運動をバicaleinが濃度依存的に抑制することを見出した（右図下段）。バicaleinによる細胞運動抑制は Rac の恒常的活性化変異体の導入により正常化することから、バicaleinは、チモサポニンとは異なり、Rac の上流で Rac の活性化を抑制することにより細胞運動を阻害することが判明した（論文掲載済み）。



ベンジルイソキノリン（ベルベリン、コプチシン）による抗腫瘍効果の作用機序の解析：これらの分子は1型トポイソメラーゼを阻害する。カンプトテシンにも同様な1型トポイソメラーゼ阻害活性があり、今日では2つのカンプトテシン類似物質トポテカンとイリノテカンが承認され、癌化学療法に用いられている。ベルベリンとコプチシンは同様な阻害機構であるにもかかわらず、カンプトテシン耐性癌細胞で殺細胞活性を有していることが判明した。これらの結果から、ベンジルイソキノリンアルカロイドとカンプトテシンとの併用した化学療法により、より効率的にがん細胞を消失させる可能性が示唆された（投稿中）。

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 0件）

1. 著者名 Terabayashi T, Hanada K, Motani K, Kosako H, Yamaoka M, Kimura T, Ishizaki T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Baicalein disturbs the morphological plasticity and motility of breast adenocarcinoma cells depending on the tumor microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 466-479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terabayashi T, Hanada K, Motani K, Kosako H, Yamaoka M, Kimura T, Ishizaki T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Baicalein disturbs the morphological plasticity and motility of breast adenocarcinoma cells depending on the tumor microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12584	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 膵B細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの解析
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山岡真美、荒巻千香子、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 膵B細胞におけるグルコース誘導性エンドサイトーシスの分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第60回 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 姫野冴美、山岡真美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 脾B細胞におけるGDP型Rab27a新規結合タンパク質の機能解析
3. 学会等名 第90回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 荒巻千香子、山岡真美、姫野冴美、寺林健、石崎敏理、木村俊秀
2. 発表標題 脾B細胞におけるエンドサイトーシスの解析.
3. 学会等名 第90回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 狂犬病の治療のための化合物およびその方法	発明者 小路裕行、山田健太郎、加藤明良、石崎敏理、その他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6679059	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	花田 克浩 (Hanada Kastuhiro) (90581009)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	寺林 健 (Terabayashi Ken) (40452429)	大分大学・医学部・助教 (17501)	