

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14499

研究課題名(和文) Quercetin誘導体による癌転移阻害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of quercetin derivative on anti cancer metastasis

研究代表者

山内 恒生 (Yamauchi, Kosei)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10805427

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)：プルダウン法に用いる5種のフラボノイドプローブの合成に成功した。この合成プローブを用いてプルダウンアッセイを行ったところ、導入するビーズの位置により得られるタンパク質が大きく異なることを明らかにした。特に3位にビーズを導入したプローブでは顕著に結合タンパク質が減少した。この結果は、3位メトキシル基がタンパク質との相互作用に重要であることを示唆し、3位メトキシル基が遊走阻害活性に重要であったことから、本活性がこれらのタンパク質との相互作用により生じていると考察した。得られたタンパク質をマスコットサーチにより同定した。これらのタンパク質とquercetin誘導体との作用様式は現在調査中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラボノイドは広く植物中に存在し、野菜や果物中に豊富に含まれている。また、フラボノイドは抗がん活性や抗炎症活性や抗酸化作用、メラニン抑制作用や神経細胞活性化作用など、様々な生物活性が報告されている。しかしながら、フラボノイドの細胞への直接的な作用機序は明らかとなっていない。本研究で、フラボノイドと直接相互作用するタンパク質を単離するためのフラボノイドプローブの合成に成功し、標的タンパク質を明らかにすることで、フラボノイドの未知の作用機序解明の足掛かりになると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Five flavonoid beads were successfully synthesized for the pulldown assay. The pulldown assay revealed that the position of the beads is involved in the target proteins. Especially, few proteins were interacted with the flavonoid probe that was introduced the beads to the 3 position. The results suggested that 3 methoxyl group plays an important role in the interaction with the protein. It was considered that the anti-migration activity of the methylquercetin is relating to the interaction of the target proteins, since 3 methoxyl group was important in the anti-migration activity in the previous study. The obtained proteins were identified by mascot search. The binding mode between the target proteins and the quercetin derivatives was under searching.

研究分野：Natural product chemistry

キーワード：quercetin anti cancer flavonoid

1. 研究開始当初の背景

人類は、400 万年という長い歴史の中で、身のまわりの植物、動物、鉱物の全てを含む天然産物から病気と戦う武器として数多くの薬を見つけ、各地の文明の発展と共にその知識を大切に伝承している。樹木を含む薬用植物には多彩な成分が豊富に含まれるためにその生理機能や利用法も多様である。近年ではポリフェノールをはじめとした植物の二次代謝成分の生体に与える健康効果について数多くの報告がされ注目の的となっている。本研究で注目したのは代表的なポリフェノールである **quercetin** の抗癌活性である(Cao et al., Mol. Can., 2015)。

日本では癌が死因の約 3 割を占めており、死因のトップである(平成 22 年人口動態統計月報年計の概況厚生労働省)。全世界では 2012 年の癌による死亡者数は 820 万人であり、毎年約 11%ずつ増加している("WorldCancer Report 2014" WHO)。さらに 2030 年にはその死亡者数が 50%増の 2200 万人に達すると予想されている。特に皮膚癌の一種であるメラノーマはリンパ節に転移しやすく、非常に悪性度の高い癌であるとされているため、転移を防ぐ抗癌剤の開発が急務となっている。しかし、現在の抗癌剤の多くが二つの大きな問題を抱えている。一つ目は副作用の問題である。現在の主な抗癌剤は増殖の速い細胞に作用して成長を抑制、あるいは死滅させるものである。こういった抗癌剤は脊髄や消化管、毛根などの増殖が速い正常細胞を傷つけることで強力な副作用が生じている。二つ目は価格の問題である。日本の医療費は高齢化や医療費の高額化に伴い年々増加している。2015 年度の医療費は 41.5 兆円であり 13 年連続で過去最高を更新し、国の財政を圧迫し続けている(厚生労働省「医療費の動向」)。このため、より安価で安全な抗癌剤を開発しその作用メカニズムを明らかにすることは個人、国家ともに重要であり即急に取り組むべき課題である。

2. 研究の目的

本研究は強力な癌転移抑制作用を示した **methylquercetin** の作用機序の解明を目的としている。前述したように現在の抗癌剤は高額であることと、副作用が問題となっており新しい発想の抗癌剤の開発が急務となっている。以前から注目し合成してきた **quercetin** 誘導体は安価な **rutin** を出発物質として数ステップの単純な合成により得ている。また野菜などに豊富に含まれており、安全であることが経験的に確認されている **quercetin** 誘導体を用いることで、これまでにない、安全で、安価な抗癌剤の開発につながる可能性を持つ。

Quercetin などのポリフェノールの健康効果は、タンパク質との相互作用に起因すると予想されているが、生きた細胞内でその相互作用をとらえた例はない。本研究は **quercetin** 誘導体の抗癌転移活性に注目し、本化合物と結合するタンパク質を明らかにする。

これまでに癌の増殖や転移のメカニズムに関する研究が行われ、遺伝子発現レベルで解明されつつある。しかし、それらの原因遺伝子やタンパクにおいて未だ明らかになっていないものが数多く存在している。本研究で癌の転移を抑制する新しいメカニズムが発見されれば、その作用機序を調査していく過程で、新たな関連遺伝子やタンパクの発見が期待できる。

3. 研究の方法

これまでに19種の quercetin 誘導体の合成に成功しており (Yamauchi et al., Bio. Med. Chem., 2014), これらを用いてメラノーマ細胞の抗転移活性を測定した。その結果 3,7,4'-O-trimethylquercetin が quercetin より

も強力にメラノーマ細胞の遊走を阻害することが明らかとなった(図 1)。本研究はこの原因を分子レベルで探る。構造活性相関を調査した結果、3位のメトキシル基が遊走阻害に必須であり4'位のメチル基が活性強化の役割を

担っていることがわかっている。また7位メチル基はこの活性に関与しないことが明らかとなっている (Yamauchi et al., Anticancer research, 2017) (図 1)。

この quercetin のメチル化による活性の変化が、細胞内タンパクと quercetin 誘導体の相互作用の違いにより生じているのではないかと考え

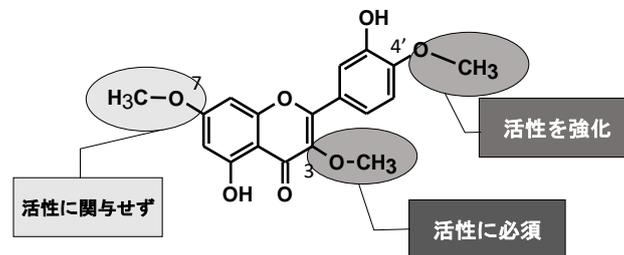


図1 Methylquercetinの遊走阻害活性における構造活性相関

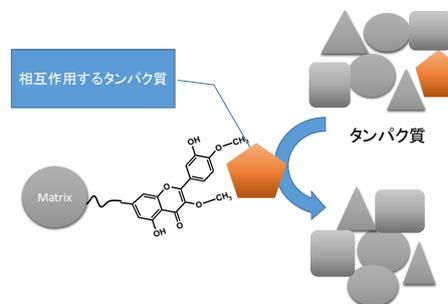


図2 Quercetin誘導体と相互作用するタンパク質を単離

た。そこで quercetin や methylquercetin と結合するタンパク質を、活性に関与しない7位に担体を位置選択的に導入し、プルダウンアッセイにより結合するタンパク質を単離した(図 2)。その後得られたタンパク質を酵素消化により分解し、得られたペプチドを MALDI-TOF-MS により検出し、mascot search を用いたデータベースとの照合により methylquercetin と相互作用するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

Methylquercetin と結合するメラノーマ細胞内のタンパク質を単離する、プルダウン法に使用するフラボノイドプローブの合成を試みた。ビーズはアミノ基と特異的に結合するものを選択し、quercetin 誘導体に位置選択的にエチルアミノ基の導入を試みた。Borax 保護などを用いて、位置選択的導入に成功し、5種のフラボノイドプローブを合成した。この合成プローブを用いてプルダウンアッセイを行ったところ、導入するビーズの位置により得られるタンパク質が大きく異なることを明らかにした。特に3位にビーズを導入したフラボノイドプローブでは顕著に結合タンパク質が減少した。この結果は、3位メトキシル基がタンパク質との相互作用に重要であることを示唆し、3位メトキシル基が遊走阻害活性に重要であったことから、本活性がこれらのタンパク質との相互作用により生じていると考察した。得られたタンパク質を mascot search により同定した。これらのタンパク質と quercetin 誘導体との作用様式は現在調査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Xiaoyu, Batubara Irmanida, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 138
2. 論文標題 Identification and structure-activity relationship (SAR) of chemical constituents from <i>Daemonorops draco</i> (Willd.) Blume and selected commercial flavonoids on anti-osteoclastogenesis activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 104280 ~ 104280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2019.104280	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 該当する
1. 著者名 Yamauchi Kosei, Natsume Misaki, Yamaguchi Kaho, Batubara Irmanida, Mitsunaga Tohru	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure-activity relationship for vanilloid compounds from extract of <i>Zingiber officinale</i> var <i>rubrum</i> rhizomes: Effect on extracellular melanogenesis inhibitory activity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 1402 ~ 1412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00044-019-02380-y	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 該当する
1. 著者名 Wang Xiaoyu, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 142
2. 論文標題 A review on osteoclast diseases and osteoclastogenesis inhibitors recently developed from natural resources	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 104482 ~ 104482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2020.104482	査読の有無 無
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 山内 恒生	4. 巻 14
2. 論文標題 熱帯産薬用植物成分の生理活性と作用メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Green Spirits	6. 最初と最後の頁 2 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Choodej S., Pudhom K., Yamauchi K., Mitsunaga T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Inhibition of melanin production by sesquiterpene lactones from Saussurea lappa and their analogues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masum M.N., Yamauchi K., Mitsunaga T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Tyrosinase Inhibitors from Natural and Synthetic Sources as Skin-lightening Agents	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reviews in Agricultural Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masum Mohammad Nuruzzaman, Choodej Siwattra, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 28
2. 論文標題 Isolation of phenylpropanoid sucrose esters from the roots of Persicaria orientalis and their potential as inhibitors of melanogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 623 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00044-019-02312-w	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 該当する

1. 著者名 Kakumu Yuya, Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of chemical constituents from the bark of Larix kaempferi and their tyrosinase inhibitory effect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Holzforschung	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/hf-2018-0267	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 ASHRAF A. H. M. ZUBERI, AFROZE SYEDA H., YAMAUCHI KOSEI, ZAWIEJA DAVID C., KEUHL THOMAS J., ERLANDSON LAURA WEISER, UDDIN MOHAMMAD N.	4. 巻 38
2. 論文標題 Differential Mechanism of Action of 3,4',7-O-trimethylquercetin in Three Types of Ovarian Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5131 ~ 5137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.12835	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 該当する

1. 著者名 Yamauchi Kosei, Fujieda Akari, Mitsunaga Tohru	4. 巻 28
2. 論文標題 Selective synthesis of 7- O -substituted luteolin derivatives and their melanogenesis and proliferation inhibitory activity in B16 melanoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2518 ~ 2522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.05.051	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 Hattori Hiroyuki, Yamauchi Kosei, Onwona-Agyeman Siaw, Mitsunaga Tohru	4. 巻 98
2. 論文標題 Identification of vanilloid compounds in grains of paradise and their effects on sympathetic nerve activity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 4742 ~ 4748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.9009	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 該当する

1. 著者名 Yamauchi Kosei, Mitsunaga Tohru	4. 巻 72
2. 論文標題 Methylquercetins stimulate melanin biosynthesis in a three-dimensional skin model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 563 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1175-0	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 Setyawati Andriyana, Hirabayashi Kae, Yamauchi Kosei, Hattori Hiroyuki, Mitsunaga Tohru, Batubara Irmanida, Heryanto Rudi, Hashimoto Hiroshi, Hotta Mitsuyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Melanogenesis inhibitory activity of components from Salam leaf (<i>Syzygium polyanthum</i>) extract	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 474 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-018-1171-4	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 該当する

〔学会発表〕 計24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sugama, C., Yamauchi, K., Mitsunaga, T.
2. 発表標題 Anti-stress activity of the essential oil flavor from <i>Alpinia zerumbet</i> var. <i>Excelsa</i>
3. 学会等名 The 2nd International Conference of Essential oil 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuoka, A., Yamauchi, K., Mitsunaga, T.
2. 発表標題 Stress reduction effect of wood essential oil flavours on Chronic Unpredictable Mild Stress (CUMS) mice.
3. 学会等名 The 2nd International Conference of Essential oil 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日置 裕介, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 アフリカ伝統生薬 <i>Garcinia kola</i> 種子抽出成分の検索と口腔疾患予防に関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 佳穂, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 Grains of Paradise 種子抽出成分の配糖化と神経変性疾患に与える影響
3. 学会等名 第2回樹木抽出成分討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤弘騎、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 サイプレス材精油香氣成分の吸入による肥満抑制効果とその作用機序に関する研究
3. 学会等名 2019年度 日本木材学会中部支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 佳穂, 服部 浩之, 山内 恒生, 光永 徹, アジマン スィアウ
2. 発表標題 Grains of Paradise種子抽出成分の配糖化とスコポラミン誘導性記憶障害に対する効果
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 各務 裕也, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 カラマツ樹皮抽出成分の構造解析とチロシナーゼ阻害活性
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋 綾香, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 3-O-methylquercetinのガン転移抑制メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内 瑞紀, 山内 恒生, 光永 徹, IRMANIDA Batubara
2. 発表標題 Murraya paniculata葉抽出物に含まれる化合物の単離・同定とPC12細胞の神経突起伸長作用
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福岡 晃帆, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 能登ヒバ材香気成分がラット交感神経活動に及ぼす効果
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田 梨帆, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 ウェンジ心材色素成分の単離・同定および変退色メカニズムの解明
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 外島 響, 山内 恒生, 光永 徹, 本間 篤史
2. 発表標題 イロハモミジ (<i>Acer palmatum</i>) 葉抽出成分に関する研究
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 弘騎, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 サイプレス材精油香気成分がラット交感神経活動に及ぼす影響 -シトロネル酸の役割について-
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川西 美帆, 山内 恒生, 光永 徹, 高山 悟
2. 発表標題 ARUNASIRI <i>Iddamal goda Rosa roxburghii</i> 果実抽出物の分画と単離化合物の構造解析
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須蒲 千晶, 山内 恒生, 光永 徹
2. 発表標題 沖縄県産タイリン月桃葉精油の香気成分が交感神経活動に及ぼす影響
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norie Shinyama, Kaho Yamaguchi, Mizuki Takeuchi, Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 May the Natural Product Constituents Contribute to Improvement of Alzheimer's Type Dementia?
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Temulawak and Potential Plants for Jamu (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Anticancer Activity of Methylquercetins
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Temulawak and Potential Plants for Jamu (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaho Yamaguchi, Hiroyuki Hattori, Kosei Yamauchi, Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Glucosylation of Vaniloid Compounds Contained in Grains of Paradise
3. 学会等名 The 4th International Symposium on Temulawak and Potential Plants for Jamu (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 晋山典恵, 中島わかほ, 山内恒生, 光永徹, 夏目真穂, 西田義昭
2. 発表標題 黒ウコン根茎成分ポリメトキシフラボンの神経突起伸長への効果
3. 学会等名 日本生薬学会65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang Xiaoyu , Kosei Yamauchi , Tohru Mitsunaga
2. 発表標題 Screening of Indonesian medicinal plants methanol extracts on osteoclastogenesis
3. 学会等名 日本生薬学会65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口佳穂, 晋山典恵, 山内恒生, 服部浩之, 光永徹
2. 発表標題 Grains of Paradise 種子抽出成分の配糖化とスコポラミン誘導性記憶障害に対する効果
3. 学会等名 日本生薬学会65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤弘騎、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 サイプレス材精油香氣成分がラット交感神経活動に及ぼす影響 - guaiol と citronellic acid の量比による検討 -
3. 学会等名 2018年度木材学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 豊田梨帆、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 ウェンジ心材の色素成分について
3. 学会等名 2018年度木材学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福岡晃帆、山内恒生、光永 徹
2. 発表標題 能登ヒバ材精油香氣成分がラット交感神経活動に及ぼす効果
3. 学会等名 2018年度木材学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

〔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