

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790461

研究課題名 (和文) 天然由来抗腫瘍活性物質の単離と薬剤耐性肺癌治療への応用

研究課題名 (英文) Analysis of cytotoxic activity against small cell lung cancer of sesquiterpene lactone newly isolated from *Lindera strychnifolia*

研究代表者

大野 高政 (OHNO TAKAMASA)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：80345777

研究成果の概要：

生薬・烏薬から単離した新規セスキテルペンラクトンが小細胞肺癌細胞、およびそのシスプラチン耐性株に対して細胞傷害性を示した。次に、各種阻害剤を用いて、新規セスキテルペンラクトンが示す細胞傷害性の機序に検討を加えたところ、細胞内還元型グルタチオンと結合して枯渇させた結果、細胞内が酸化状態になり細胞傷害性を示すものと考えられた。実際に活性酸素の産生を確認した。また、シスプラチン耐性株を皮下に移植したヌードマウスに新規セスキテルペンを投与したところ、腫瘍増殖抑制作用が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般 (含心身医学)

キーワード：小細胞肺癌、セスキテルペンラクトン、薬剤耐性肺癌、シスプラチン耐性、SBC-3、SBC-3/CDDP、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

ヒト小細胞肺癌治療薬開発を目的として、生薬・烏薬から新規セスキテルペンラクトン compound 1 を単離、構造決定した。In vitro の実験系では、小細胞肺癌細胞に対する細胞傷害性はシスプラチンに勝ることから、更なる検討が望まれたが、単離量が微量であったため、サントニンをリード化合物とした半合成を行い、更なる詳細な検討を試みた。

2. 研究の目的

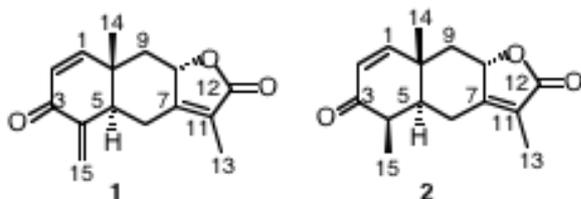
本研究の目的は、5 年生存率が 5-10% と極めて悪い小細胞肺癌に対して、小細胞肺癌がシスプラチン (CDDP) など既存の抗癌剤に対して薬剤耐性を獲得した後の、治療の選択肢となりうる薬剤を開発することである。小細胞肺癌は手術適応となる症例がきわめて少なく、抗癌剤による治療に頼っているのが

現状である。抗癌剤治療開始時のレスポンスは非小細胞肺癌に比べて良いが、反復投与する内に薬剤耐性が誘導され、予後を著しく悪くしてしまう。このことから薬剤耐性を獲得した腫瘍に対して有効な抗癌剤の開発が急務であり、我々はその開発シーズを天然物である生薬に求めて研究してきた。本研究の具体的目標は、新規化合物のシスプラチン耐性株(SBC-3/CDDP)における細胞傷害性の確認。最終目標としてSBC-3/CDDPを皮下移植したヌードマウスにおいて、腫瘍縮小効果を証明することである。

3. 研究の方法

- ・鳥薬から単離した新規化合物のシスプラチン耐性小細胞肺癌細胞 (SBC-3/CDDP) への細胞傷害性の検討および細胞傷害機序の解明

SBC-3/CDDPに対する細胞傷害性



細胞傷害性試験として汎用されるMTT法により、48時間作用させた際の細胞傷害性を評価した。Positive controlとしてCDDPを用いることにより、実験ごとにCDDP耐性を確認した。

細胞周期に及ぼす影響

血清飢餓によりG₀/G₁期に同調した3T3-L1細胞に対し、血清と共に新規化合物を添加し、経時的に細胞を回収し、フローサイトメーターおよびWestern blot法を用いて、細胞周期に及ぼす影響を検討した。

阻害剤を用いた細胞傷害機序の解析

抗酸化剤、カルシウムキレーターなどの細胞傷害性に関係する機序の阻害剤を前処置することにより、新規化合物が示す細胞傷害性の機序をMTT法により解析した。この実験から、活性酸素の産生が細胞傷害性に寄与している可能性が示唆されたことから、活性酸素により蛍光を発する試薬を作用させ、新規化合物添加による細胞内活性酸素の産生を、

フローサイトメーターにより確認した。

- ・ *in vivo* で使用する新規化合物注射剤の溶媒の決定

in vivo 試験に進める新規化合物の溶解性を、溶媒を組み合わせで検討した。

- ・ *in vivo* における新規化合物の毒性試験

1. 溶媒毒性と溶解性に関する検討

前述の検討で見いだした溶媒条件の毒性を検討し、毒性を示さない溶媒での溶解度を決定した。

2. 耐薬性に関する検討

急性毒性：鎮静、うずくまり、失調性・よろめき歩行、異常発声、間代性痙攣、鎮静化、音過敏、後肢伸長、硬直性痙攣後、後弓反張の有無

耐薬量算出：生存例での遅発性の毒性を観察し、投与後15日を判定日とする最大耐薬量(MTD)算定試験を行った。

- ・ *in vivo* における新規化合物のSBC-3/CDDP増殖抑制作用の検討

大量培養したSBC-3/CDDP細胞をヌードマウスに皮下移植し、移植翌日から1週間に一度、下記薬物を腹腔内投与する。腫瘍移植から3週間後の腫瘍重量により腫瘍増殖抑制作用を判定する。

群構成 (各群 n=8)

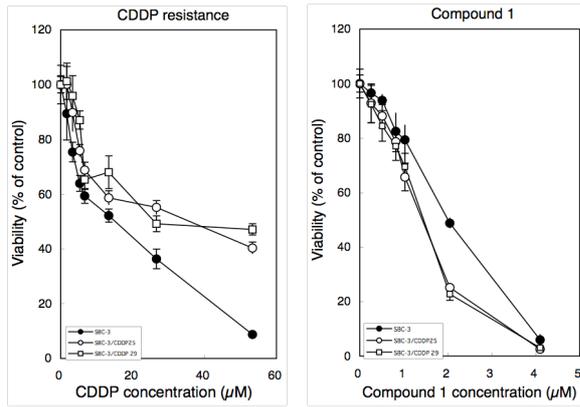
SBC-3/CDDP皮下移植ヌードマウス

- 1, CTRL群
- 2, 新規化合物 50 mg/kg i.p.投与群
- 3, シスプラチン 50 mg/kg i.p.投与群

4. 研究成果

シスプラチン耐性株(SBC-3/CDDP)は、親株であるSBC-3に対してIC₅₀値に相当するCDDPを繰り返し添加しながら継代培養することにより確立した。MTT法により、CDDPを48時間作用させた際の細胞傷害性を評価したところ、CDDP耐性を確認した(下図左の図)。

また、新規セスキテルペンラクトン(以後 Compound 1)をSBC-3およびSBC-3/CDDPに作用させたところ、両細胞

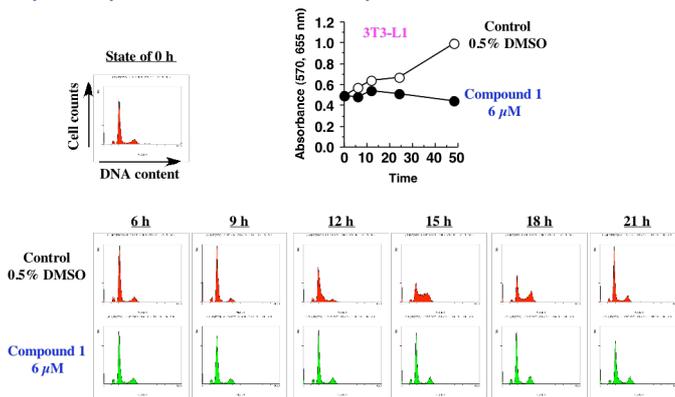


に対して細胞傷害性を示した（上図の右図）。上図におけるCDDPの後ろの25および29の数字は、耐性株確立段階でのCDDP暴露数を示すが、何れの細胞も耐性およびcompound 1の効果は同等であった。

血清飢餓によりG₀/G₁期に同調した3T3-L1細胞に対し、血清を含む培地と共にCompound 1 6 μMを添加し、3時間おきに経時的に細胞を回収し、フローサイトメーターおよびWestern blot法を用いて、細胞周期に及ぼす影響を検討した。その結果（下図）、Controlの細胞（赤色ヒストグラム）では、G₀/G₁期に同調されていた細胞が血清添加により約21時間かけて細胞周期を一周させたのに対し、Compound 1 6 μMを添加により、細胞周期の進行がG₀/G₁期で停止していた。また、Western blot法による細胞周期関連蛋白の発現を解析したところ、Compound 1 添加によりサイクリンD₁の発現が抑制されることが明らかとなった。

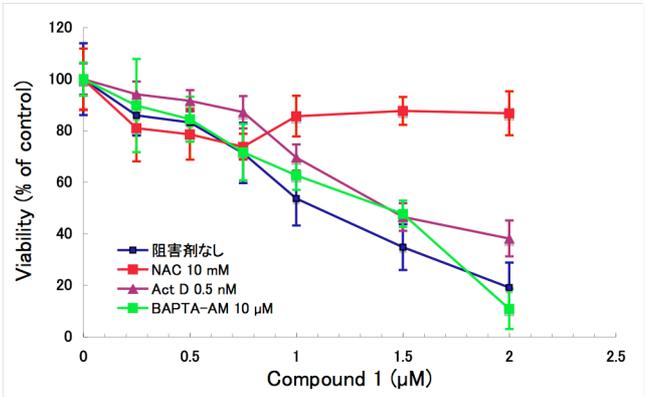
Cell cycle analysis

MTT assay



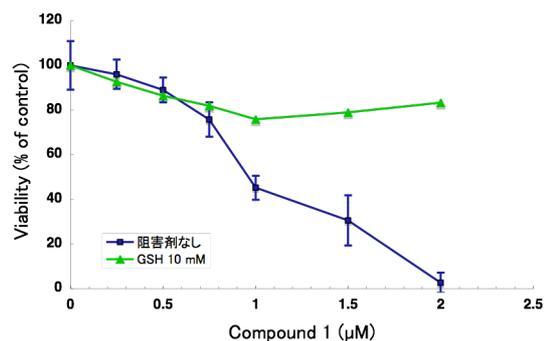
N-acetyl cystein 10 mM (NAC, 抗酸化剤)、BAPTA-AM 10 μM (細胞内カルシウムキレーター)、Actinomycin D 0.5 nM (Act D, 蛋白合成阻害剤)などの細胞傷害性に関する機序の阻害剤を前処置することにより、

compound 1が示す細胞傷害性の機序をMTT法により解析した。下図に示した様にNACで前処置することにより、compound 1による細胞傷害性が消失したことから（赤色折れ線グラフ）、compound 1処置により細胞内が酸化状態になっていることが示唆された。



この結果を考察するため文献検索を行ったところ、類似の部分構造を持つコストノライドが細胞内還元型グルタチオンと結合して枯渇させた結果、細胞を酸化状態にして細胞死を誘導するとの論文を検出した（Jpn.J.Cancer Res. 93,1327-1333, 2002）。

Compound 1が示す細胞傷害性と細胞内還元型グルタチオン枯渇の関連を明らかにするため、還元型グルタチオン (GSH) で前処置した後Compound 1を作用させた（下図）。

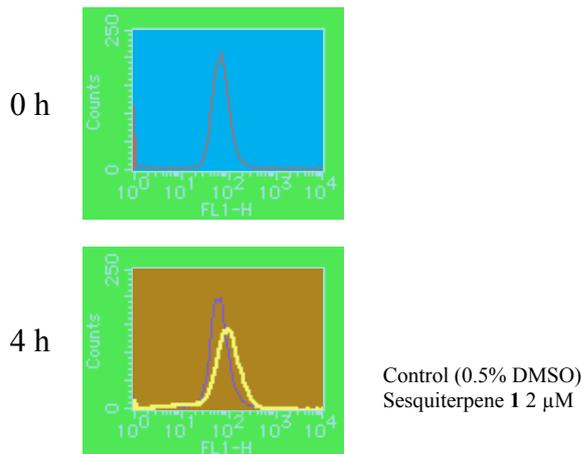


GSH 10 mMの補充により（緑折れ線グラフ）compound 1の細胞傷害性が消失したことから、作用機序の1つとして、GSH枯渇による細胞内の酸化が関与していることが確認できた。

これまでの実験から、活性酸素の産生が細胞傷害性に寄与している可能性が示唆

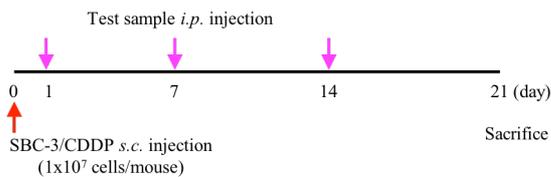
されたことから、細胞内過酸化物質感受性の蛍光試薬（DCF-DA）を作用させ、compound 1添加による過酸化物質産生を、フローサイトメーターにより確認した。

DCF-DAはそれ自身では蛍光を発しないが、細胞膜のエステラーゼによって脱アセチル化され細胞内に蓄積される。更に、 H_2O_2 などと速やかに反応して酸化され、蛍光物質DCFが過酸化物質の量に比例して生成される。下図に示す様に、compound 1, 2 μM 処置から4時間後に細胞の蛍光強度が増加し、過酸化物質の産生が示唆された。



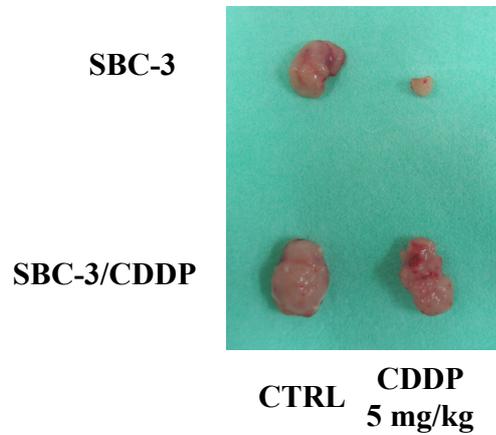
また、*in vivo*の実験系による抗腫瘍効果検討の準備として、注射剤調製時の溶媒を検討した。烏薬から単離したセスキテルペンラクトンcompound 1は脂溶性で、DMSOには可溶であり、*in vitro*の実験系ではDMSO溶液を培地に添加していた。しかし、DMSO、エタノール、ポリエチレングリコール、注射用水を組み合わせることで可溶化でき、静脈内投与できることが確認できた。急性毒性試験の結果、烏薬から単離したcompound 1静脈内投与により神経毒性が発現し、最大投与可能量は50 mg/kgと判断した。

Protocol

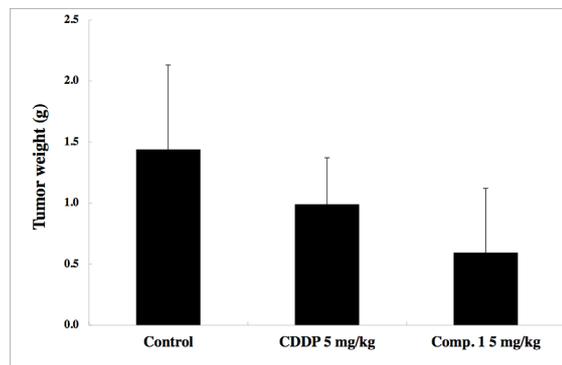
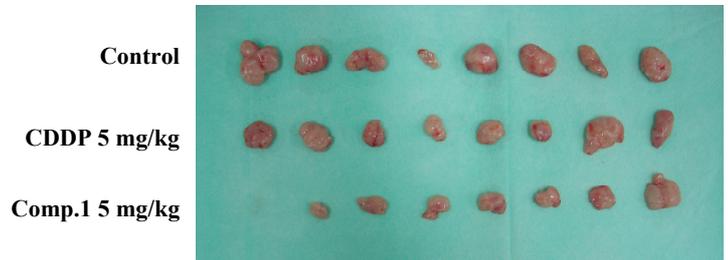


また、*in vivo*の実験系による抗腫瘍効果検討を上図プロトコールに従って行った。これまで*in vitro*の実験系で確認されてい

たシスプラチン耐性が*in vivo*においても発現するかモデルの確認を行ったところ、下図に示す様に、シスプラチン耐性が確認できた。



急性毒性試験の結果、烏薬から単離したcompound 1静脈内投与により神経毒性が発現し、最大投与可能量は50 mg/kgと判断している。シスプラチン耐性株を背部皮下に移植したヌードマウスにシスプラチンを50 mg/kg投与しても腫瘍増殖抑制作用は認められなかったが、compound 1 50 mg/kg投与により腫瘍増殖抑制作用が認められた（下図）。



しかしながら、神経毒性を示す投与量と有効量の差が小さく、より低用量で抗腫瘍活性を示す様、構造的改善が継続して課題として残った。

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)

[学会発表] (計 1 件)

- ①Takamasa Ohno、Cytotoxic activity against small cell lung cancer of sesquiterpene lactone newly isolated from *Lindera strychnifolia*、第66回 日本癌学会学術総会、平成19年10月3日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 高政 (OHNO TAKAMASA)
愛知学院大学・薬学部・講師
研究者番号：80345777

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし