

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07096

研究課題名（和文）和漢薬からのエピゲノムを標的とする新規抗癌薬の探索及び作用機序の解明

研究課題名（英文）Searching for novel anticancer epigenetic drugs from Kampo medicines followed by elucidation of the mechanism through transcriptomic analyses.

研究代表者

平崎 能郎（Hirasaki, Yoshiro）

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40436374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は身近でかつ長年経験的に使用されてきた和漢薬由来化合物の中から抗腫瘍成分を同定し、そのエピゲノム分子修飾作用を評価し、安全で臨床応用がより現実的な癌治療戦略を構築することを目的とした。現在日本で入手可能な和漢薬及びその構成化合物に対し、癌細胞株への抗腫瘍活性に関してスクリーニングを行った。白血病細胞株、HL60とKasumi-1の両者に対して抑制作用を表す生薬を同定した。Cinobufaginによる白血病細胞株に対する抑制効果に関して、詳細なる解析を行い報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回解析を行ったCinobufaginは和漢薬蟾酥の成分であるが、抗癌作用に関しては報告数が少なく、また網羅的な分子生物学的な解析が進んでいない状況であった。難治疾患である急性骨髄性白血病の治療に関してCinobufaginが奏功する可能性があるという新たな知見である。

和漢薬は長年の歴史を経て生体に投与され、安全性も確保されており、入手が比較的容易であることから、抗がん薬物を探索する上では重要なデータストックと言える。生薬由来成分による、エピゲノムへの影響を評価することで、新たな癌治療へつながる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we intended to identify anti-tumor components from compounds derived from crude drugs used in Kampo medicine that have been familiar and empirically used for many years and to develop cancer treatment strategies that are safe and more realistic for clinical application by evaluating their epigenome modifying effects.

Crude drugs and their constituent compounds currently available in Japan were screened for their antitumor activity against cancer cell lines. We identified crude drugs that exhibited inhibitory effects on leukemia cell lines, HL60 and Kasumi-1.

A detailed analysis of the inhibitory effect of cinobufagin on leukemic cell lines was reported with elucidation of the mechanism by transcriptomic analyses.

研究分野：和漢薬を用いた癌の臨床と研究

キーワード：和漢薬 白血病 抗癌 生薬 Cinobufagin transcriptome エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究当初の背景

癌は日本国民の多くが罹患し、死因の上位を占める重要な疾患である。発症に関してはゲノム変異だけでなくエピゲノム異常の関与も示唆されている。エピゲノムに作用する安全で長期投与可能な薬物を検索し新たな予防治療戦略を立てることは国民の健康増進に寄与するものと考えられた。抗体医薬品は特異性が高く、作用機序も明確で臨床にも応用されているが、分子量が大きいため細胞内分子を標的にできず、高価で医療経済を逼迫する。この点を克服するものとして天然由来の小分子抗腫瘍薬物は注目されている。和漢薬から創薬につながった物質も多数みとめられる。t(15;17)転座型の急性前骨髄性白血病に用いられる As_2O_3 (雄黄)、免疫抑制薬の Fingolimod (冬虫夏草)、抗マラリア薬の Artemisinin (青蒿、発見者は 2015 年ノーベル生理学医学賞を受賞)などがその例である。

また、漢方医学で長年用いられて来た和漢薬は体質を改善する作用があり、「体質」とエピゲノムの「記憶」「可塑性」という概念が類似する。和漢薬由来の天然薬物の中には特定の細胞内分子を標的とするエピゲノム調節性作用のある成分が含まれていると推察された。

近年、ドラッグ・リポジショニングという創薬戦略に注目がおかれている。ヒトでの安全性・体内動態がわかっている既存薬または開発中止薬物を、別の疾患の治療薬として開発することである。エピゲノム作動薬としては抗てんかん薬のバルプロ酸に HDAC 阻害作用が認められ多数の報告がなされている(H Ridwansyah. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021)。和漢薬は歴史の長い既存薬であり有望なドラッグ・リポジショニングのライブラリーと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では和漢薬由来の抗癌化合物成分に対して、スクリーニングを行い、細胞情報統合解析により抗癌作用を解明し、エピゲノム指標に関しても評価を加えることである。抗腫瘍作用をゲノム網羅的なエピゲノム統合解析技術を用いて評価することで、従来の一面的な作用機序を狙った作用機序解析では判明しなかった新たな包括的な解析が可能となり、薬物の特性に関して検討を加えることができる。また、アジア圏で臨床上癌に有用であるが分子生物学的な解析が進んでいない和漢薬にもライブラリーを広げることで、臨床にフィードバックでき、新たな創薬リード化合物の発見へとつながる可能性も考えられる。臨床上癌に有用である和漢薬を解析することで、漢方医学にエビデンスを付与し数千年蓄積されてきた経験智を現在に活かすことができる。

3. 研究の方法

1) 白血病細胞株(HL60, Kasumi-1)を用い、和漢薬からの抽出液を対象とする。各生薬 0.75-3.0g に 70%エタノール 12ml を入れ、2 時間攪拌したのち 4°C O/N 静置の後、抽出液を培養液に加える。別に分けた抽出液を Yamamoto 社 DY300 を用い乾燥し、乾燥重量から濃度を測定する。96 well plate に 10,000-20,000/well の細胞株を入れ培養液の総量は 100 μ l とする。抽出液の 100 倍希釈、200 倍希釈、400 倍希釈となるように濃度を調整し、48 時間培養。WST-8 を用いて細胞増殖抑制作用の評価を行う。

2) 候補成分に対して、薬物処理による転写物の発現量の変動を RNA-seq を用いて評価する。RNA 抽出には RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い、TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit

(Illumina, San Diego, CA, USA)により製造元の指示通りに RNA ライブラリーを作成し、1.5 pM の RNA を Illumina Nextseq500 platform を用いてシーケンスを行う。シーケンスされたリードは HISAT2 を用いて UCSC human genome (hg19)にアラインメントされる。Gene set enrichment analysis (GSEA 解析)は GSEA software (version 4.1.0)を用いる。Gene set database は Molecular Signatures Database の h.all.v2023.1.Hs.symbols.gmt を用い 50 の Hallmark の中で有意性の高いものを網羅的に評価する。次に、エピゲノムの変化をヒストン修飾活性化指標(H3K4me3, H3K4me1 H3K27ac)に対する ChIP-seq により評価する。ChIP-seq ライブラリーは KAPA Hyper Prep Kit (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA) を用い作成する。RNA-seq と同様に、1.5 pM の ChIP ライブラリーを Nextseq500 platform を用いてシーケンスを行い Bowtie 2 を用い hg19 にマッピングする。また ChIP-seq DATA を用い H3K27ac シグナルが増強した領域の *de novo* Motif 解析を HOMER software を用いて行い、抗癌機序に関して主要な役割を果たす転写因子を推定する。

4. 研究成果

1) 主に中国において抗癌作用を目的に臨床で使用されている生薬 66 種類の生薬のエタノール抽出成分を用いて、HL60 および Kasumi-1 に対する増殖抑制効果を検討したところ、何首烏 *Polygonum multiflorum* Thunb. (エタノール抽出液濃度 30.0 mg/ml), 呉茱萸 *Euodia officinalis* Dode (42.4 mg/ml), 地骨皮 *Lycium chinense* Miller (25.0 mg/ml), 白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd. (8.8 mg/ml), ウワウルシ *Arctostaphylos uva-ursi* Sprengel (55 mg/ml), 菱実 *Trapa japonica* Flerow (14.0 mg/ml), 莪朮 *Curcuma zedoaria* Roscoe (20.0 mg/ml), 穿山竜 *Discorea nipponica* Makino (72.5 mg/ml), 石菖根 *Acorus gramineus* L. (15.0 mg/ml), 白豆蔻 *Amomum cardamomum* L. (15 mg/ml), 益智 *Alpinia oxyphylla* Miquel (25 mg/ml), 川棟子 *Melia toosendan* Siebold et Zuccarini (62.5 mg/ml)において、抽

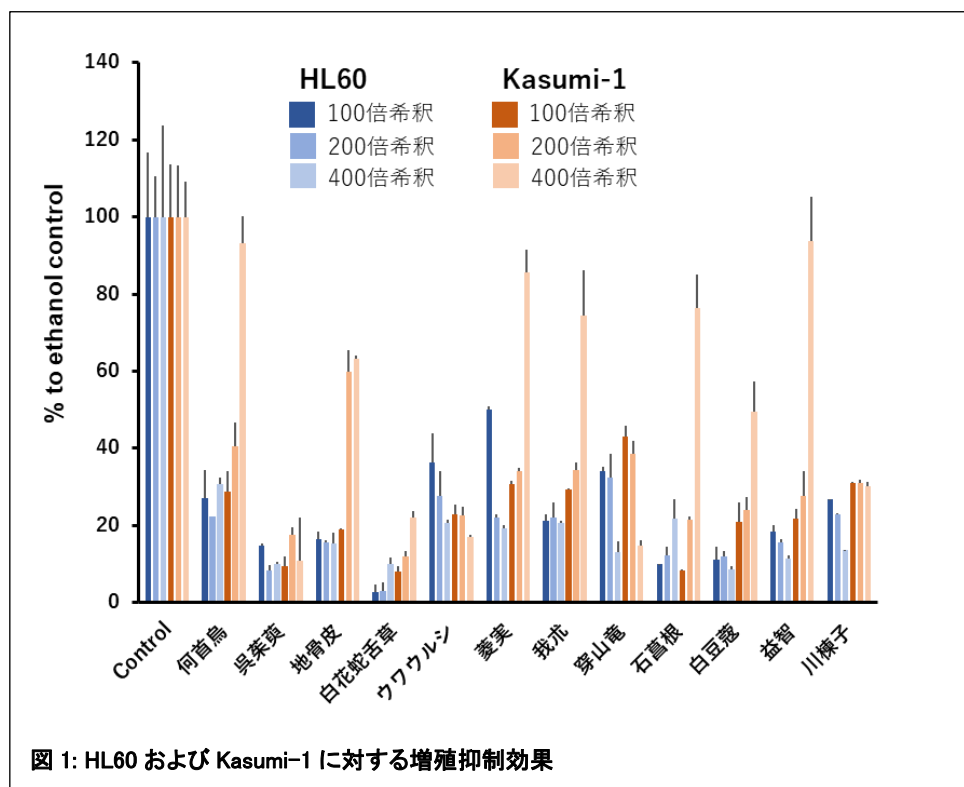
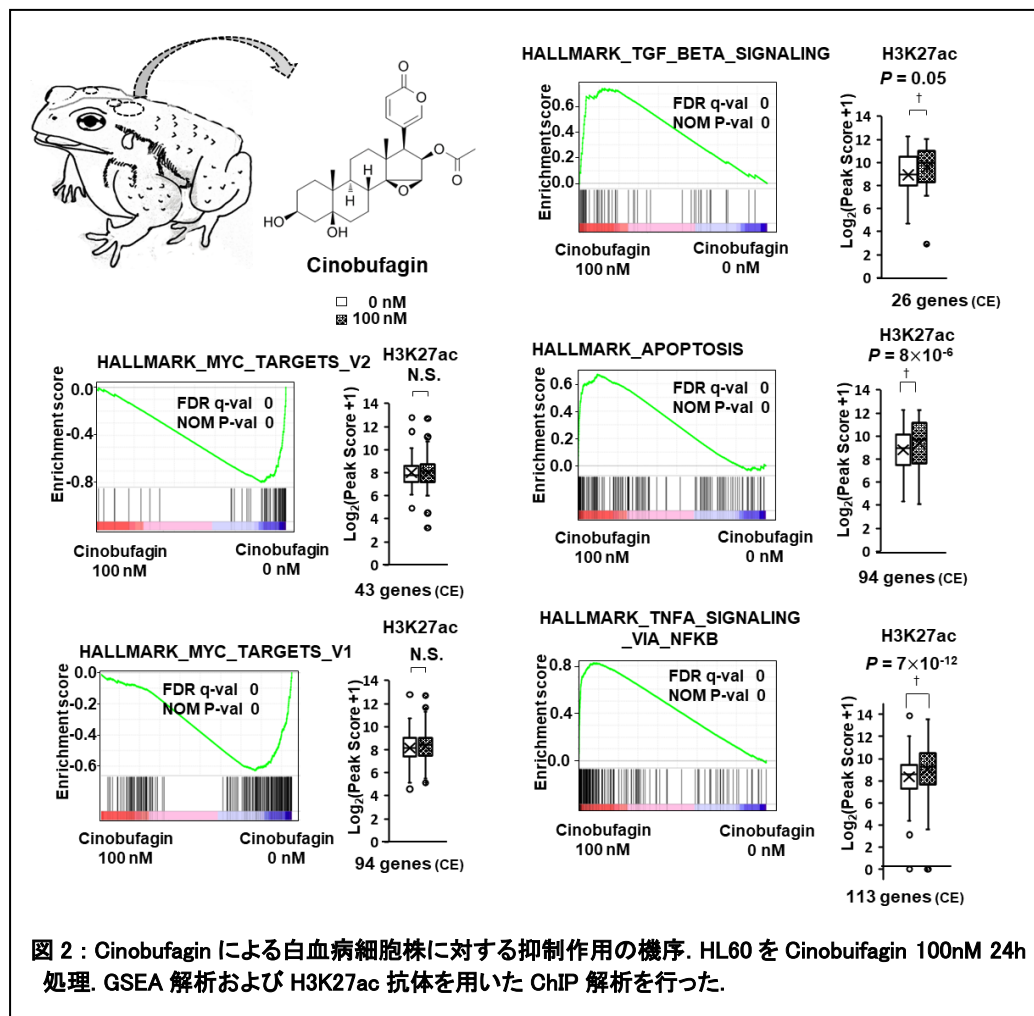


図 1: HL60 および Kasumi-1 に対する増殖抑制効果

出液希釈倍率 100-400 倍の条件下で両細胞株に対して細胞増殖抑制効果が認められた(図 1)。

2) シナヒキガエル皮膚腺分泌物由来のステロイド Cinobufagin による白血病細胞株に対する抑制効果に関して、詳細なる解析を行った。FAB 分類 M2 に属する HL60、Kasumi-1 に対して Cinobufagin 処理を行い、RNA-seq DATA を用い、GSEA 解析を行った結果、薬剤処理により発現が低下した遺伝子群に関しては MYC_TARGETS_V2 と V1 にトップヒットをみとめた。また上昇した遺伝子群は TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB, APOPTOSIS, TGF_BETA_SIGNALING という白血病細胞を細胞死に導

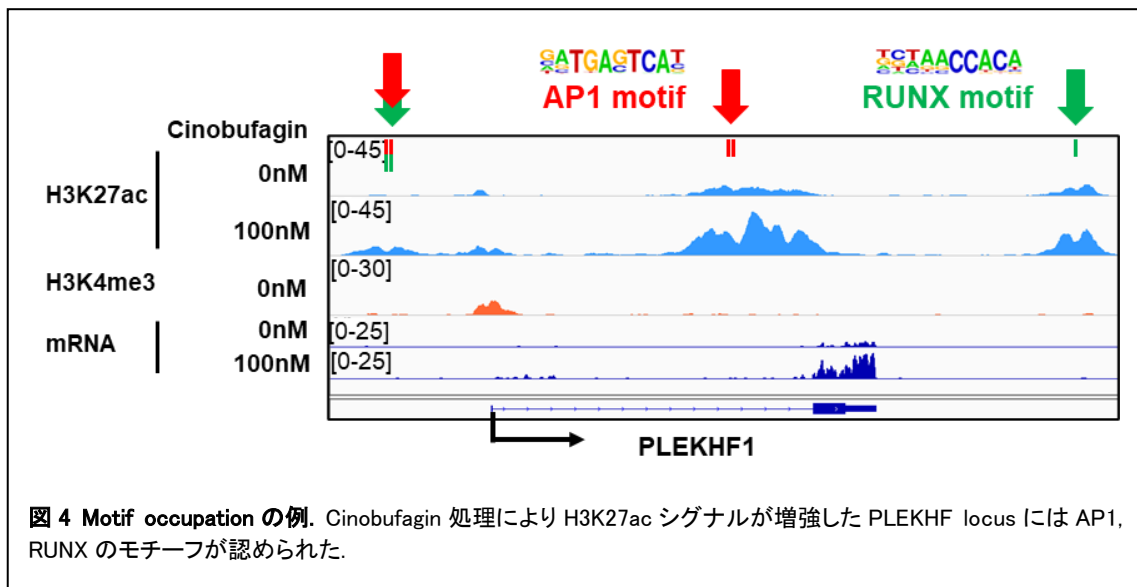


くものであった。また、H3K27ac 抗体による ChIP-seq で解析したところ上昇した遺伝子群の H3K27ac 化レベルは薬剤処理により上昇をみとめた。一方、発現低下した MYC_TARGETS の core enriched genes (CE) では H3K27ac の変化は認められなかった(図 2)。薬剤処理により H3K27ac 化レベルが上昇した領域において *de novo*

# of the motif	De novo motif	p-value	Best match
P1	1 CACTCCCT	1×10^{-67}	ETV6
NP1	2 AACAGGAAT	1×10^{-371}	Etv2 (ETS)
	3 SATGACTCAI	1×10^{-319}	AP-1 (bZIP)
	4 ATTCCCTAAC	1×10^{-143}	CEBPE
	5 TCTAACCCACA	1×10^{-118}	RUNX(Runt)

図 3 : 薬剤処理により H3K27ac が上昇した領域での *de novo* motif 解析.

Motif 解析を行ったところ、プロモーター領域(P1)では ETV6 が、プロモーター以外(NP1)の領域では Etv2, AP-1, CEBPE, RUNX の Motif がマッチした(図 3)。さらにこの実験系で白血病細胞を細胞死に導いている GO カテゴリーの領域においてこれらの Motif の占拠率が他の領域とくらべて有意に高いかどうかを χ^2 検定で検討したところ、AP-1 と RUNX1 の Motif が有意であり、これらの転写因子の関与が示唆された。実際に、PLEKHF1 locus を実例として図4に示す。AP1, RUNX の Motif が認められた。



これら c-Myc シグナルの抑制を介したアポトーシス誘導および H3K27ac 化を介した白血病細胞を細胞死に導くシグナルの活性化に関して、論文化し報告した。

Cinobufagin はジギタリスなどの強心ステロイドと同じく Na^+/K^+ ATPase を阻害することが知られているが、c-Myc の抑制を介した抗癌作用が認められた。このことは難治疾患である急性骨髄性白血病の治療に関して、新たな知見であると思われた。

次に、ムラサキ科の紫根 *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini に含まれる天然化合物 Shikonin に関して解析を行った。Shikonin はナフトキノンの 1 種であり、甲状腺癌、悪性脳腫瘍、肺癌や大腸癌に対する報告がみられる。白血病に対する効果の報告も数多く、作用機序としては c-Myc の低下による機序が報告されている。そこで、c-Myc がドライバーとして働いている白血病細胞株 HL60, Kasumi-1 を用いて、Shikonin による薬剤処理を行ったところ、細胞増殖抑制効果を確認した。実際に網羅的な転写変動をみるために RNA-seq を行い、GSEA 解析を行ったところ、低下した遺伝子群は両細胞株において 50 の HALLMARK のうち MYC_TARGETS_V2 の NES が最も低かった。一方上昇していた遺伝子群は両細胞株において炎症系や apoptosis の HALLMARK の NES が高く、上位を占めた。つづいて薬物処理によるエピゲノムの変化を観察するために抗 H3K27ac 抗体を用いて ChIP assay を施行し、統合解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hirasaki Yoshiro, Okabe Atsushi, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Mano Yasunobu, Seki Motoaki, Hoshii Takayuki, Namiki Takao, Kaneda Atsushi	4. 巻 360
2. 論文標題 Cinobufagin inhibits proliferation of acute myeloid leukaemia cells by repressing c-Myc pathway-associated genes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 109936 ~ 109936
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbi.2022.109936	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平崎能郎
2. 発表標題 Anti-proliferative effect of Cinobufagin on acute myeloid leukemia cells with repression of Myc pathway associated genes
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平崎能郎
2. 発表標題 Cinobufagin, a component of toad venom, exerts anti-cancer activity on human leukemia through epigenetic alteration
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平崎能郎
2. 発表標題 中薬を用いた癌治療とエビデンス
3. 学会等名 日本中医薬学会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	金田 篤志 (Kaneda Atsushi) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	福世 真樹 (Fukuyo Masaki) (40639085)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究分担者	関 元昭 (Seki Motoaki) (70714278)	千葉大学・医学部附属病院・特任助教 (12501)	
研究分担者	岡部 篤史 (Okabe Atsushi) (80778118)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	

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
---------	---------