

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460136

研究課題名(和文) 選択的がん幹細胞毒性を指標とする新規抗がん剤シーズの探索研究

研究課題名(英文) Investigation of new anti-cancer agents with selective anti-proliferative activities

研究代表者

浅田 善久 (ASADA, Yoshihisa)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90118779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：薬用植物約200種を用いて、がん幹細胞抑制活性を持つ生薬のメタノール抽出物をスクリーニングした結果、*Saururus chinensis*、*Trichosanthes kirilowii*、*Euphorbia fischeriana*に活性が見られた。*S. chinensis*のメタノールエキスより活性成分を分離し、新規化合物2種を含む10種のtetrahydrofuran lignan 誘導体を得た。単離した化合物の内、saurucinol Iは強いmammosphere形成の抑制作用を示し、またヒト乳がん幹細胞の指標であるCD44+/24-発現量を抑制した。

研究成果の概要(英文)：A library consisting of 200 kinds of methanolic extracts from medicinal plants, was screened cancer stem cell inhibitory activity. Extracts of *Saururus chinensis*, *Trichosanthes kirilowii* and *Euphorbia fischeriana* were bioactive. The methanol extract of *S. chinensis* was fractionated by a Bioassay Guided Fractionation method to give 10 kinds of tetrahydrofuran lignan derivatives, including two novel compounds, as well as three kinds of 8, 4'-oxyneolignan derivatives and three other lignan derivatives. Two tetrahydrofuran-type lignans with characteristic poly-oxygenated functional groups on the aromatic ring, namely, saurucinol I and rel-(7R, 8S, 7'S, 8'S)-4',5'-methylenedioxy-3,4,5,3'-tetramethoxy-7,7'-epoxylignan, showed the most potent activity. Saurucinol I showed the inhibitory effect of mammosphere formation, and inhibited the CD44+/24- expression level which is an indicator of human breast cancer stem cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Saururus chinensis Euphorbia fischeriana Trichosanthes kirilowii Mammosphere formation Cancer stem cells

1. 研究開始当初の背景

(1) がんの疫学および既存抗がん剤の問題点：世界においてがん疾患による死亡数は年々増加しており、国際がん研究機関 (IARC) は2008年ではがんによる死亡数は全体の13%を占める760万人であり、2030年には1100万人を超えると発表している。がん治療において重要な位置づけを有する化学療法には植物成分、抗生物質、分子標的薬、アルキル化剤などの抗がん剤が使用されているが、薬物耐性、毒性、副作用などが依然として大きな課題として残されているため、がんの治癒率は未だ飛躍的な向上がみられない。

(2) がん幹細胞と新規抗がん剤創製の関連性：1997年に白血病で初めてがん幹細胞が発見されて以来 (*Nat Med*, 1997, 3, 730), 乳がんなど多くのがん組織に普遍的に存在することが明らかにされている (*Nat Rev Cancer*, 2005, 5, 899)。がん幹細胞は幹細胞に特徴的である自己複製能と多分化能を持ち、がんの発生および転移に深く関与している (*Nat Rev Cancer*, 2012, 12, 133)。また、がん幹細胞は既存の抗がん剤に薬剤耐性を有するため、手術あるいは化学療法によって大部分のがん組織あるいはがん細胞を取り除いても、残ったごく少数のがん幹細胞はがん再発の重要な原因とされている (*Cell Stem Cell*, 2007, 1, 353)。従って、がん幹細胞を標的とすれば、がんの転移や再発の防止に有用な新規治療薬の創製につながるものが大きく期待されている (*Cell Stem Cell*, 2009, 5, 125)。

(3) 国内・国外の研究動向：近年、少数のがん幹細胞でも腫瘍の発生源になることが明らかとなっており、現在この「がん幹細胞説」を基にしたがん幹細胞を標的とした治療戦略が注目されている (*Am J Cancer Res*, 2012, 2, 340)。がん幹細胞を標的とする研究は、がん幹細胞における特異的なマーカーの同定と機能解析を中心とする分子生物学的研究が多く行われているが、直接がん幹細胞の増殖を抑制する物質に関する知見はまだ限られている (*Cell*, 2009, 138, 645)。その理由は、世界的に見ても、幹細胞のみを培養する方法を確立している研究グループが限られていることが挙げられる。この数少ない研究においては、既存の抗がん剤あるいは既知がん細胞毒性化合物ライブラリーを用いた研究が殆どであり、実用化に至る化合物はまだ見出されていない (*Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22, 3571)。一方、天然化合物をリードとした医薬品の創製研究ではこれまで多くの成果が得られている (*J Nat Prod*, 2012, 75, 311)。しかしながら、がん幹細胞増殖抑制活性を指標とする天然資源からの化合物探索研究はまだ報告されていない。

2. 研究の目的

死亡率の一番高い病気であるがん疾患の新

規治療薬の創製が社会から求められている。近年、多くのがん組織に発見されているがん幹細胞の存在はがんの発生または転移に大きく関与することが明らかになりつつある。がん幹細胞は殆どの既存抗がん剤に対し薬剤耐性を持つため、がん幹細胞をターゲットとする新規抗がん剤の開発が急務である。そこで、本研究では、新しい作用機序に基づいた新規抗がん剤創製のためのシーズ発見を研究目標として、伝統医学に用いられている薬用植物から選択的がん幹細胞毒性を有する天然化合物の探索を行い、天然物化学および分析化学の手法により、活性成分を明らかにし、さらにケミカルバイオロジー、分子生物学の手法により活性成分の作用機序、構造活性相関を解明する。

3. 研究の方法

(1) 生薬メタノールエキスの調製

約200種の生薬のメタノールエキスを調製し、活性試験を行った。

(2) 乳がん幹細胞増殖抑制活性評価

ヒト乳がん MCF-7 細胞 (breast cancer cell line) に濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ の生薬抽出物を添加して low-attachment plate で4日間培養し、形成したがん幹細胞が濃縮されたスフェロイドをシングルセルに分離後、再培養をしてがん幹細胞によるスフェロイド形成阻害活性を測定した。

(3) *S. chinensis* より乳がん幹細胞阻害活性成分の単離

中国原産 *S. chinensis* 地上部 (1.7Kg) を MeOH で抽出し、MeOH エキス (128g) を得た。得られた MeOH エキスを EtOAc と水にて分配し、EtOAc 画分 (63g) を得た。得られた EtOAc 画分を、HP-20 カラムクロマトグラフィーにて10画分に分画し、乳がん幹細胞に対する活性を評価した。活性が見られた画分の内、Fr.5, Fr.8 をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、順相系および逆相系 HPLC などを用いて精製し、新規化合物2種を含む10種の tetrahydrofuran lignan 誘導体と、天然物から初めて単離された1種を含む3種の 8,4'-oxyneolignan 誘導、3種のその他 lignan 誘導体を得た。

(4) *E. fischeriana* の成分研究

中国原産 *E. fischeriana* 地下部 (3.0Kg) を MeOH で抽出し、MeOH エキスを得た。得られた MeOH エキスを EtOAc と水にて分配し、EtOAc 画分 (88g) を得た。得られた EtOAc 画分を、ODS およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画後、順相系および逆相系 HPLC などを用いて精製し、6種の新規化合物を含む31種のジテルペンを単離した。

(5) *Trichosanthes kirilowii* より乳がん幹細胞

阻害活性成分の単離

生薬 栝楼根 (1.9 kg) を MeOH で抽出し、MeOH エキスを得た。得られた MeOH エキスを EtOAc と水にて分配し、EtOAc 画分を得た。得られた EtOAc 画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画後、順相系および逆相系 HPLC などを用いて精製し、活性成分を単離した。

4. 研究成果

(1) 乳がん幹細胞の選抜培養法と活性評価法の確立並びに評価結果

乳がん由来細胞株である MCF-7 細胞を用いて、スフェロイド培養によりがん幹細胞の選抜培養法を確立した。更にそれを用いることによりがん幹細胞を標的とした化合物を評価することが可能な High-Throughput Screening (HTS) 法を確立した。この HTS 法により、中国伝統医学において使用されている約 200 種の生薬から構築した抽出物ライブラリーを選択的がん幹細胞毒性試験によりスクリーニングした。その結果、三白草 (*Saururus chinensis*)、狼毒大戟 (*Euphorbia fischeriana*) および栝楼根 (*Trichosanthes kirilowii*) の 3 種の生薬抽出物は乳がん細胞に毒性を示さないが、乳がん幹細胞に優れた選択毒性を示した。

(2) 三白草のがん幹細胞増殖抑制活性
特に強い活性を示した三白草について Bioassay Guided Fractionation 法により活性成分の探索を行った。単離した化合物の内、tetrahydrofuran-type lignan の中で、芳香環上に酸素官能基を多く持つ saurucinol I (2) および化合物 (4) に特に強いスフェロイド形成の抑制作用が認められた (Fig.1)。またヒト乳がん幹細胞の指標である CD44+/24- 発現量は 2 により抑制された。MCF-7 細胞において 2 の投与による細胞生存率は、adherent culture では viability に大きな影響は認められなかったが、mammosphere culture では viability が低かった。以上のことから、saurucinol I (2) はがん細胞に対してよりもがん幹細胞に対しての方がより効果を示すことが明らかとなった。近年、STAT3 ががん幹細胞の維持に関与しているとの報告がされている。そこで、STAT3 活性に対する 2 の影響を検討した。MDA-MB-468 細胞における STAT3 (Tyr705) のリン酸化及び STAT3 の標的遺伝子である Survivin, CyclinD1 のタンパク発現量の減少が認められた。EGF 処置により、STAT3 のリン酸化は促進されたが、2 の前処置により抑制された。核タンパクを分画し、STAT3 の核移行を検討したところ、2 の前処理により EGF 処置による STAT3 の核移行が抑制されることが明らかとなった。このことから、2 は STAT3 のリン酸化阻害作用が、がん幹細胞を減少させる要因の一つではないかと考えており、さらに検討を行っている。

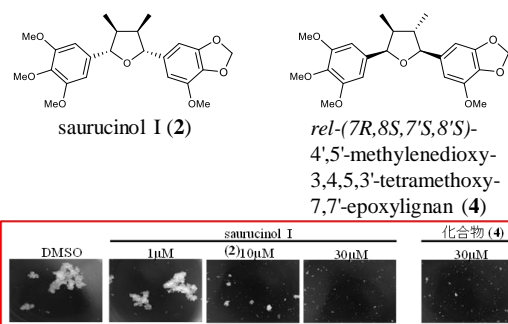


Fig.1

(3) 狼毒大戟ジテルペノイドのがん幹細胞増殖抑制活性

単離したジテルペノイド (1-31) について、ヒト乳がん MCF-7 細胞より誘導したがん幹細胞の増殖抑制活性をスクリーニングした。その結果、新規化合物 (7, 7a, 15, 21, 24) を含む 14 種の化合物は顕著な抑制活性を示した。

(4) 栝楼根のがん幹細胞増殖抑制活性
ヒト乳がん幹細胞増殖抑制活性試験を指標にして活性成分の探索を行い、脂肪酸を単離した。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Xinzhu Kuang, Wei Li, Yuichiro Kanno, Naoya Yamashita, Shoko Kikkawa, Isao Azumaya, Kiyomitsu Nemoto, Yoshihisa Asada, Kazuo Koike. Euphorins A-H: bioactive diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. Journal of Natural Medicines, First online: 21 March 2016
DOI 10.1007/s11418-016-0987-z 査読有
- (2) Xinzhu Kuang, Wei Li, Yuichiro Kanno, Naoya Yamashita, Kiyomitsu Nemoto, Yoshihisa Asada, Kazuo Koike. *ent*-Atisane diterpenoids from *Euphorbia fischeriana* inhibit mammosphere formation in MCF-7 cells. Journal of Natural Medicines, 70,120-126 (2016)
DOI 10.1007/s11418-015-0940-6 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) がん幹細胞抑制作用を示す *Saururus chinensis* の活性成分の同定及び作用機序の解明
山下直哉, 菅野裕一郎, 佐藤ちひろ, 若井将志, 遠藤慎平, 李巍, 小池一男, 浅田善久, 井上義雄, 第 134 回日本薬学会年会, 熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市), 2014 年 3 月 27 日
- (2) *Saururus chinensis* の成分研究

若井将志, 遠藤慎平, 李巍, 小池一男, 菅野裕一郎, 井上義雄, 浅田善久, 第 57 回
日本薬学会関東支部大会, 帝京大学板橋
キャンパス (東京都・板橋区), 2013 年
10 月 26 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅田 善久 (ASADA, Yoshihisa)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90118779

(2)研究分担者

李 巍 (LI, Wei)
東邦大学・薬学部・准教授
研究者番号：90328633

菅野 裕一郎 (KANNO, Yuichiro)
東邦大学・薬学部・講師
研究者番号：40453849