

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460544

研究課題名(和文)新規ステロイド系抗ピロリ菌薬の開発

研究課題名(英文)Development of new steroidal bactericidal substances for Helicobacter pylori

研究代表者

下村 裕史(Shimomura, Hirofumi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80348002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ステロイドホルモンのプロゲステロンを基本母核構造とした新規合成プロゲステロン誘導体が、ヒトの胃癌発症の原因菌であるピロリ菌に対して選択的な殺菌作用を示し、腸内細菌などの他の一般的な細菌に対しては全くその作用を示さないことが明らかとなった。このことから、プロゲステロンを基本母核構造として、ピロリ菌の除菌に特化した抗菌薬(抗ピロリ菌薬)の開発が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated that new progesterone derivatives selectively act as bactericidal agents on Helicobacter pylori, a pathogen responsible for gastric cancer in human, but have no influence on the survival of other representative bacteria such as enterobacteria. These results indicate that progesterone could be a convenient structure for development of steroidal antibacterial medicines in the eradication of H. pylori in human stomach.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 ステロイド 不飽和脂肪酸 飽和脂肪酸 グリセロリン脂質 極狭域スペクトル抗菌薬 狭域スペクトル抗癌剤

## 1. 研究開始当初の背景

世界人口のおよそ半数はピロリ菌に感染している。本菌の感染は、慢性胃炎および消化性潰瘍の原因であり、また胃癌および胃 MALT リンパ腫の発症にも深く関与する。他の細菌感染症同様に、ピロリ菌感染においても薬剤耐性の問題があり、ピロリ菌の臨床分離株の中には、現在、除菌治療に使用されている抗菌薬に対して既に耐性を獲得している菌株も少なくなく、その除菌率は年々低下の一途を辿っている。従って、ピロリ菌に対して効果的且つ選択的に作用する抗菌薬の開発が急務である。

## 2. 研究の目的

ピロリ菌は、種々のステロイド化合物に対して積極的に反応する非常にユニークな性質を持つ。これは、他の一般細菌では全く認められない本菌の特筆すべき生物学的特徴である。これまでに申請者は、種々のステロイド化合物に対するピロリ菌の膜応答性について検討し興味深い知見を得た。例えば、代表的なステロイド化合物の遊離型コレステロールは、ピロリ菌の最も主要な細胞膜脂質成分のホスファチジルエタノールアミン (PE) を介して本菌の細胞表面に付着し、その細胞膜に組み込まれ、本菌の膜脂質バリアの強化に重要な役割を果たす。一方、ステロイドホルモンのプロゲステロンは、ピロリ菌の細胞膜を傷害し、本菌を溶菌させる。即ち、ピロリ菌は、生存にとって有用であるか、或いは有害であるかに関係なくステロイド化合物に対して何らかの膜応答性を示すことが明らかとなった。さらに、申請者は、プロゲステロンのピロリ菌に対する溶菌活性についても興味深い知見を得た。プロゲステロン分子の 17 位の炭素原子がヒドロキシル化された 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンは、ピロリ菌に対して溶菌作用を全く示さず、一方、プロゲステロン分子の 17 位の炭素原子が短鎖脂肪酸のカプロン酸によってアシル化された 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン・カプロン酸エステルは、ピロリ菌に対してプロゲステロンよりも強い溶菌活性を有することが判明した。プロゲステロンおよび 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン・カプロン酸エステルの溶菌作用は、ピロリ菌に対して選択的であり、大腸菌やブドウ球菌などの他の一般的な細菌に対しては全くその作用を示さない。即ち、このことは、プロゲステロンを基本母核構造とした全く新しいステロイド系抗ピロリ菌薬の開発を期待させるものである。しかしながら、プロゲステロンおよび 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン・カプロン酸エステルは、抗ピロリ菌作用を示すと同時に、ステロイドホルモン作用も示す。従って、ステロイドホルモン活性を失活し且つ強い抗ピロリ菌活性を保持したプロゲステロン誘導体を新規に開発する必要がある。上述したように、プロゲステロン分子の 17 位の炭素原子のアシル化は、プロゲステロンの抗ピロリ菌活性の増強に重要な役割を果たすことが示唆された。リノール酸やアラキドン酸などの長鎖不飽和脂肪酸は、種々の細菌に対して抗菌作用を示すことが古くから知られている。また、申請者は、リノール酸およびアラキドン酸が、ピロリ菌に対して強い溶菌作用を示すことも既に明らかにしている。そこで、本研究では、リノール酸およびアラキドン酸によって修飾したプロゲステロン誘導体 (17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン・リノール酸エステル: 17hPL および 17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン・アラキドン酸エステル: 17hPA) を新規に合成し、これら誘導体の抗ピロリ菌作用およびステロイドホルモン作用を解析し、プロゲステロンが、新規ステロイド系抗ピロリ菌薬の開発にとって、有用な基本母核構造体になり得るかを検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) 新規プロゲステロン誘導体の合成  
新規プロゲステロン誘導体の合成は、17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロンと脂肪酸 (リノール酸またはアラキドン酸) の脱水縮合反応によっておこなわれた (図 1)。
- (2) 最小殺菌濃度 (MBC)  
種々の細菌に対する新規プロゲステロン誘導体の最小殺菌濃度 (MBC) が、常法に従って測定された。
- (3) ホスファチジルエタノールアミン (PE) の抽出・精製  
大量培養によって得られた細菌からの脂質の抽出は、有機溶媒分配法によっておこなわれた。抽出した脂質からの PE の精製は、シリカゲル・カラム・クロマトグラフィーによっておこなわれた。
- (4) プロゲステロン誘導体と PE ベシクルとの相互作用  
クーマシー・ブリリアントブルー (CBB) を包含した PE ベシクル浮遊液が、新規プロゲステロン誘導体と共に 37°C で 2 時間振盪放置された。放置後、PE ベシクルから上清中に放出した CBB が、波長 590 nm の吸光度によって測定された。
- (5) プロゲステロン誘導体と PE の結合親和性  
PE 固定ペーパーディスクが、17hPL または 17hPA を含む緩衝液に浸漬され、37°C で 2 時間振盪放置された。放置後、蒸留水で 6 回洗浄された PE 固定ペーパーディスクからクロロホルムを用いて抽出された 17hPL および 17hPA が、薄層クロマトグラフィー (TLC) 後に 60% 硫酸試薬によって検出された。
- (6) PE の脂肪酸組成および PE 分子種の解析  
細菌から抽出・精製した PE の脂肪酸組成が、ガスクロマトグラム・質量分析 (GC-MS) 法によって解析され、PE 分子種の構成比率が、LC-MS 法によって解析された。
- (7) プロゲステロン誘導体のホルモン活性  
マウス・マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞が、17hPL と共に 4 時間放置された後、LPS によって 24 時間刺激された。LPS 刺激後、細胞培養上清中の一酸化窒素 (NO) が、グリース試薬を用いて波長 540 nm の吸光度によって定量された。
- (8) プロゲステロン誘導体の細胞毒性  
ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞、ヒト乳癌細胞株 T47D 細胞およびアフリカミドリザル腎上皮細胞株 vero 細胞が、種々の濃度の 17hPL または 17hPA 存在下で 72 時間、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で放置された。放置後、MTT 試薬を用いて生細胞が、波長 540 nm の吸光度によって測定された。
- (9) プロゲステロン誘導体の T47D 細胞に対するネクローシスおよびアポトーシスの誘導  
T47D 細胞が、17hPA 存在或いは非存在下で 72 時間、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で放置された。放置後、回収した細胞培養上清中のケラチン 18 (K18: ネクローシスの指標) およびカスパーゼの作用によって開裂したケラチン 18 (ccK18: アポトーシスの指標) が、CytoDeath ELISA キットを用いて定量された。アポトーシス誘導率は、ccK18 量を K18 量で除して算出された。

#### 4. 研究成果

##### (1) 17hPA および 17hPL の MBC

まず、申請者は、種々の細菌における 17hPA および 17hPL の殺菌活性を検討した。17hPA および 17hPL のピロリ菌に対する最小殺菌濃度 (MBC) は、それぞれ 4  $\mu\text{M}$  および 16  $\mu\text{M}$  であり、検討に用いたピロリ菌は、17hPL よりも 17hPA に対して高感受性を示した (図 2)。17hPL は、ピロリ菌と同属のヘリコバクター・フェリス (フェリス菌) に対して全く殺菌作用を示さなかったが、17hPA は、フェリス菌に対しても殺菌作用を示し、その MBC は 30  $\mu\text{M}$  であった。しかしながら、17hPL 同様に、17hPA も大腸菌を含む一般細菌に対しては殺菌作用を全く示さなかった。以上の結果から、17hPL は、ピロリ菌に対して非常に選択性の高い殺菌活性を有することが示された。検討に用いたフェリス菌は、17hPA の殺菌作用に対してピロリ菌よりも低感受性であったが、17hPA は、これら 2 菌種のヘリコバクター属細菌に効果的な殺菌作用を示すことが判明した。

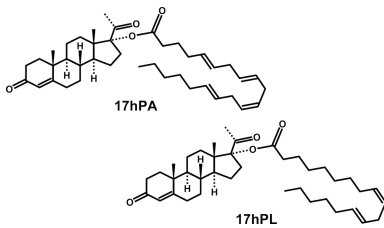


図 1. 新規プロゲステロン誘導体の化学構造

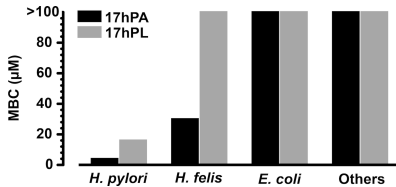


図 2. 種々の細菌に対する 17hPA および 17hPL の MBC。2.5% FCS-RPMI 培地を用いて  $10^5$  個/ml に調整された菌液 (1 ml) が、種々の濃度の 17hPA または 17hPL 存在下で 24 時間振盪放置され、17hPA および 17hPL の種々の細菌に対する MBC が測定された。図は、独立した 2 回の実験から得られたデータを示す。実験に供した菌株は、ピロリ菌 NCTC 11638、ヘリコバクター・フェリス (フェリス菌) ATCC 49179、大腸菌 ATCC 11775 であった。その他の 6 菌種 (肺炎桿菌、プロテウス、セラチア、サルモネラ、黄色ブドウ球菌および緑膿菌) は、当研究室で長年維持管理している標準的な菌株であった。

##### (2) 17hPA および 17hPL の PE ベシクルとの相互作用

以前の研究において、申請者は、ジミリストイル PE (DMPE) が、ピロリ菌の細胞膜を構成する最も主要な PE 分子種の一つであることを報告した。そこで次に、DMPE およびジバルミトイル PE (DPPE) を用いてクーマシー・ブリリアントブルー (CBB) 包含 PE ベシクルを調製し、それら CBB 包含 PE ベシクルと 17hPA および 17hPL の相互作用が検討された。その結果、17hPA および 17hPL は、DPPE ベシクルからよりも DMPE ベシクルからの CBB の溶出を強く誘導した (図 3)。即ち、このことは、17hPA および 17hPL は、DPPE よりも DMPE とある程度の選択性をもって相互作用し、そのベシクル構造を崩壊させるということを示す。

##### (3) 各細菌由来の PE に対する 17hPA および 17hPL の結合親和性

次に、申請者は、ピロリ菌およびフェリス菌から抽出・精製した PE に対する 17hPA および 17hPL の結合親和性について検討をおこなった。

各細菌由来の PE を固定したペーパーディスクに結合した 17hPL を TLC 解析によって検出した結果、17hPL は、ピロリ菌 PE を固定したペーパーディスクにおいて強く検出された (図 4)。このことは、17hPL が、ピロリ菌 PE に対して選択性の高い結合親和性を示すということを示し、この結果は、図 2 に示した 17hPL のピロリ菌に対する選択性の高い殺菌作用の結果と合致した。驚いたことに、17hPA は、ピロリ菌 PE を固定したペーパーディスクにおいては、ほとんど検出されず、フェリス菌 PE を固定したペーパーディスクにおいて強く検出された。しかしながら、この結果は、図 2 に示した 17hPA のフェリス菌に対する殺菌作用の結果と合致した。

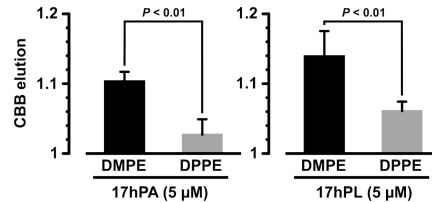


図 3. 17hPA および 17hPL の作用によって PE ベシクルから溶出した CBB の検出

DMPE または DPPE で調製された CBB 包含 PE ベシクルが、図に示した濃度の 17hPA または 17hPL を添加した 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) 中で 2 時間、37°C で振盪放置された。放置後、PE ベシクルから上清中に溶出した CBB が、波長 590 nm の吸光度 ( $A_{590 \text{ nm}}$ ) によって測定された。図は、プロゲステロン誘導体非存在下で放置した PE ベシクル上清の  $A_{590 \text{ nm}}$  を 1 とした時の相対的な  $A_{590 \text{ nm}}$  で示した。DMPE ベシクルおよび DPPE ベシクルから溶出した CBB レベルの統計学的有意性 ( $P < 0.01$ ) は、独立した 4 回の対実験から得られた  $A_{590 \text{ nm}}$  を基に、 $t$ -検定によって算出された。

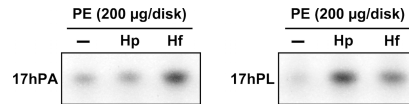


図 4. ピロリ菌およびフェリス菌の PE への 17hPA および 17hPL の結合

ピロリ菌 (Hp) およびフェリス菌 (Hf) から抽出・精製した PE (200  $\mu\text{g}$ ) がペーパーディスクに固定され、それら PE 固定ペーパーディスクが、3 mM 濃度の dM $\beta$ CD を添加した 50 mM 濃度トリス緩衝液 (pH 7.5) の 1 ml に浸漬され、50  $\mu\text{M}$  濃度の 17hPA または 17hPL 存在下で 2 時間、37°C で振盪放置された。放置後、蒸留水 (1 ml) で 6 回洗浄された PE 固定ペーパーディスクからクロロホルムを用いて抽出した 17hPA および 17hPL が TLC によって解析された。図中のマイナス記号は、PE 非固定ペーパーディスクにおける 17hPA および 17hPL の検出レベルを示す。

##### (4) 各細菌の主要な PE 分子種

次に、ピロリ菌、フェリス菌および大腸菌の PE 分子種の比較がおこなわれた (図 5)。ピロリ菌の PE 分子種の主要な飽和脂肪酸側鎖は、炭素数 14 のミリスチン酸であった。また、上述したように、DMPE がピロリ菌の主要な PE 分子種の一つに含まれた。一方、フェリス菌の PE 分子種の主要な飽和脂肪酸側鎖は、炭素数 16 のパルミチン酸であったが、主要な PE 分子種の中にはミリスチン酸を結合する PE 分子種も含まれた。大腸菌の PE 分子種の主要な飽和脂肪酸側鎖はパルミチン酸であり、ミリスチン酸は皆無であった。

##### (5) 新規プロゲステロン誘導体の抗ピロリ菌活性についての総括

本研究において、新規に合成したプロゲステロン誘導体の 17hPL は、ピロリ菌に対して極めて選択的に殺菌作用を示すことが判明した (図 2)。このことは、ピロリ菌に対して選択的且つ効果的

に作用するステロイド系抗菌薬の開発において、プロゲステロン分子が有用な基本母核構造体になり得ることを示す。また、17hPL と PE ベシクルの相互作用の検討 (図 3) および 17hPL と細菌由来の PE との結合親和性の検討 (図 4) から、17hPL は、ピロリ菌細胞膜のミリスチル PE に対して選択性の高い結合親和性を示し、ミリスチル PE に何らかの構造変化を誘導し、本菌の膜構造を不安定化させ、最終的に本菌を溶菌へと導く抗菌作用機序が強く示唆された (発表論文 1 も合わせて参照)。一方、17hPA は、DPPE ベシクルに対してよりも DMPE ベシクルに対して統計学的有意性をもって強く相互作用したが、精製ピロリ菌 PE に対しては、ほとんど結合親和性を示さなかった。このことから、17hPA は、ピロリ菌細胞膜の少なくとも DMPE に結合し、DMPE に何らかの構造変化を誘導し、本菌の膜構造を不安定化させ、本菌を溶菌へと導くことが示唆された。

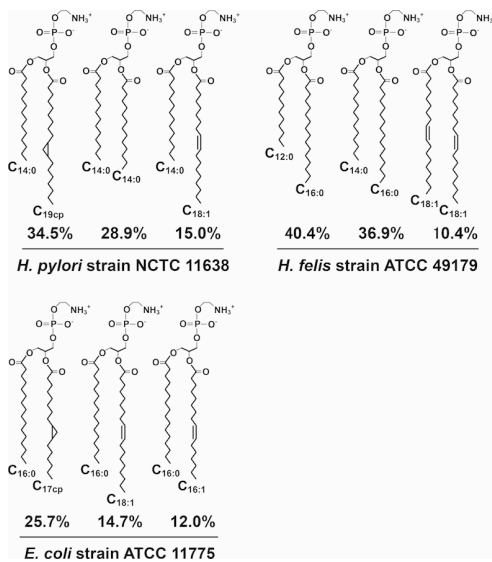


図 5. ピロリ菌、フェリス菌および大腸菌の主要な PE 分子種

それでは何故、精製ピロリ菌 PE に対する 17hPA の結合親和性が低かったかは、推測の域を脱しないが、種々の PE 分子種が共存する精製ピロリ菌 PE を用いた結合親和性試験では、DMPE に対する 17hPA の結合親和性に影響をおよぼす別の PE 分子種が、DMPE と 17hPA との間の疎水的な相互作用を阻害するのかも知れない。DMPE と 17hPA の疎水的相互作用を阻害する最も可能性のある PE 分子種として、DMPE よりもさらに主要なピロリ菌の PE 分子種であるミリスチン酸 (C<sub>14:0</sub>) とフィトモン酸 (C<sub>19:0p</sub>) を結合する PE 分子種 (MPhytoPE) が考えられる (図 5)。このことを明らかにするには、MPhytoPE を化学的に合成し、MPhytoPE に対する 17hPA の結合親和性の検討および MPhytoPE 存在下での 17hPA の DMPE に対する結合親和性の検討をおこなう必要がある。また、17hPA は、17hPL とは異なり、フェリス菌に対しても殺菌作用を示し、本菌 PE に対して選択性の高い結合親和性を示した (図 2 および図 4)。フェリス菌の PE 分子種の 75% 以上は、ラウリン酸 (C<sub>12:0</sub>) とパルミチン酸 (C<sub>16:0</sub>) を結合するラウロイル・パルミトイル PE (LPPE) およびミリスチン酸 (C<sub>14:0</sub>) とパルミチン酸 (C<sub>16:0</sub>) を結合するミリスチル・パルミトイル PE (MPPE) である (図 5) ことから、17hPA は、DMPE に加え、LPPE または MPPE、或いはそれら PE 分子種の両方と選択性のある結合親和性を示す可能性が考えられる。このことを検証するには、LPPE および MPPE を化学的に合成し、それら PE 分子種に対する 17hPA および 17hPL の結合能を比較する必要がある。この検証

によって、17hPA のフェリス菌に対する抗菌作用機序の解明の糸口が見つかると共に、17hPA が、DMPE、LPPE および MPPE のいずれかを主要な PE 分子種として保持するヘリコバクター属細菌に対して選択的に作用する抗菌物質であることが明らかにされるかも知れない。

#### (6) 17hPL のステロイドホルモン活性

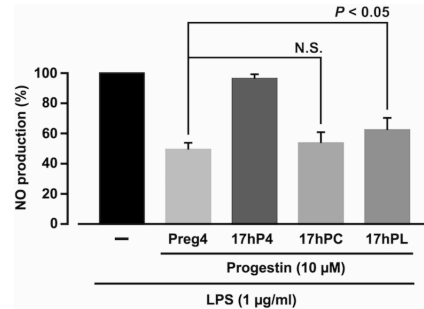


図 6. LPS 刺激により活性化した RAW264.7 細胞の NO 産生における 17hPL の抑制効果

10% FCS-RPMI 培地を用いて、 $10^{5.7}$  cell/ml に調整された RAW264.7 細胞の浮遊液 (1.5 ml) が、24 穴のマイクロプレートの各穴に分注され、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で一夜放置された。放置後、各穴が PBS で 3 回洗浄された後、図に示した濃度のプロゲステン (プロゲステロンおよびその誘導体) を含む同培地 (1.5 ml) で RAW264.7 細胞が 4 時間、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で処理された。プロゲステン処理後、RAW264.7 細胞が、大腸菌由来の LPS (1 μg/ml) で 24 時間、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で刺激された後、その細胞培養上清が回収された。回収した上清中の NO がグリース試薬を用いて定量された。図は、プロゲステン非存在下で放置した LPS-活性化 RAW264.7 細胞の NO 産生を 100% とした時の相対的な NO 産生を示す。統計学的有意性 ( $P < 0.05$ ) は、独立した 6 回の対実験によって得られたデータに基づいた *t*-検定によって算出された。図中の N.S. は、統計学的有意性なしを表す。

次に、申請者は、哺乳類細胞に対する新規プロゲステロン誘導体のステロイドホルモン活性について検討をおこなった。プロゲステロンは、リポ多糖 (LPS) の刺激によって活性化したマクロファージからの一酸化窒素 (NO) の産生を抑制することが知られている。これは、プロゲステロンのステロイドホルモン作用の一つである。そこで、LPS-活性化 RAW264.7 細胞 (マウス・マクロファージ様細胞株) における 17hPL の NO 産生抑制効果が検討された。17hPL の LPS-活性化 RAW264.7 細胞に対する NO 産生抑制効果は、プロゲステロン (Preg4) および 17α-ヒドロキシプロゲステロン・カプロン酸エステル (17hPC) の同細胞に対する NO 産生抑制効果よりも、統計学的有意性をもって低かった (図 6)。即ち、新規合成プロゲステロン誘導体の 17hPL は、天然のプロゲステロン (Preg4) および既存の合成プロゲステロン誘導体 (17hPC) よりもステロイドホルモン活性が减弱していることが示唆された。因みに、天然の 17α-ヒドロキシプロゲステロン (17hP4) のステロイドホルモン活性は著しく弱いことが知られている。また、申請者の以前の研究により、17hP4 がピロリ菌に対して全く抗菌作用を示さないことも明らかにされている。

#### (7) 17hPA および 17hPL の細胞毒性

次に、哺乳類細胞の生存における 17hPA および 17hPL の影響について検討がおこなわれた。ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞、ヒト乳癌細胞株 T47D 細胞およびアフリカミドリザル腎上皮細胞株 vero 細胞の生存性は、培地に添加した 17hPA の濃度に依存して漸次低下した (図 7 上図)。一方、検討した濃度域の 17hPL は、上記 3 種の細胞株の生存性にほとんど影響しなかった。MKN45 細胞、T47D 細胞および vero 細胞の生存性における 17hPA の IC<sub>50</sub> は、それぞれ 4.11 μM、6.81 μM および 6.69 μM

であり、MKN45 細胞は、検討した他の細胞株に比べ、17hPA の細胞障害作用に対して高感受性であった (図 7 下図)。一方、検討した 3 種の細胞株の生存性における 17hPL の IC<sub>50</sub> は、10 μM 以上であった。

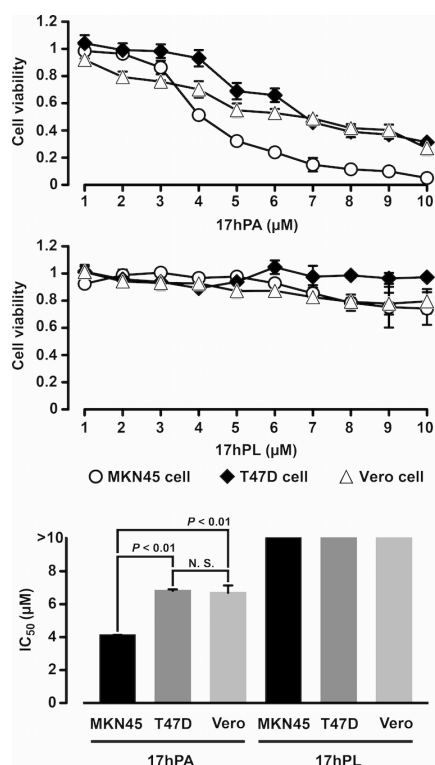


図 7. 17hPA および 17hPL の種々の細胞に対する細胞障害活性

(上図) 2.5% FCS-RPMI 培地を用いて、 $10^4$  cell/ml に調整した MKN45 細胞、T47D 細胞および vero 細胞の浮遊液 (200 μl) が、96 穴のマイクロプレートの各穴に分注され、図に示した濃度の 17hPA または 17hPL 存在下で 72 時間、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で放置された。放置終了 4 時間前に、5 mg/ml 濃度の MTT 試薬 (20 μl) が、各穴に添加された。MTT 試薬に反応した生細胞の細胞質において形成されたホルマザンブルーの結晶が、5% 濃度の蟻酸を含むイソプロパノール溶液 (150 μl/穴) によって溶出され、その溶出液 (100 μl) の吸光度が、波長 540 nm により測定された。図は、新規プロゲステロン誘導体非存在下で放置した時の細胞の生存性 (cell viability) を 1 とした時の相対的な細胞生存性を示す。データは、独立した 3 回の実験から得られた平均値 ± 標準偏差で表される。(下図) 上手の結果を基に、細胞の生存性を 50% 阻害する 17hPA および 17hPL の濃度 (IC<sub>50</sub>) が決定された。統計学的有意性 ( $P < 0.01$ ) は、独立した 3 回の対実験から得られた IC<sub>50</sub> に基づいて、*t*-検定によって算出された。図中の N.S. は、統計学的有意性なしを表す。

(8) T47D 細胞に対する 17hPA のネクローシス・アポトーシス誘導活性

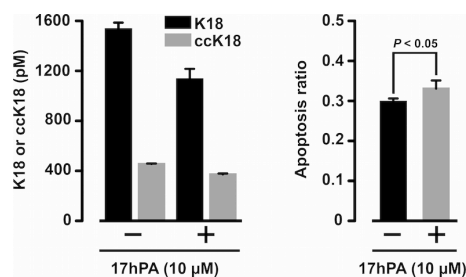


図 8. 17hPA の細胞障害活性によって T47D 細胞から放出した K18 および ccK18

(左図) 10% FCS-RPMI 培地を用いて、 $10^5$  cell/ml に調整された T47D 細胞の浮遊液 (1 ml) が、図に示した 17hPA 存在或いは非存在下で 72 時間、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベ

ータ内で放置された。放置後回収した細胞培養上清中のケラチン 18 (K18) およびカスパーゼ-開裂化ケラチン 18 (ccK18) が CytoDeath ELISA キットによって定量された。データは、独立した 3 回の対実験から得られた平均値 ± 標準偏差で表される。(右図) 左図の K18 および ccK18 の定量結果を基に、アポトーシス誘導率が、ccK18 量を K18 量で除して算出された。統計学的有意性 ( $P < 0.05$ ) は、独立した 3 回の対実験から得られたアポトーシス誘導率に基づいた *t*-検定によって評価された。

次に、T47D 細胞に対する 17hPA の細胞障害活性が、培養上清中のケラチン 18 (K18) およびカスパーゼ-開裂化ケラチン 18 (ccK18) を定量することにより評価された。K18 は、ネクローシス時に細胞から放出される細胞骨格の構造タンパク質であり、ccK18 は、アポトーシス時に細胞から放出される K18 分解タンパク質である。17hPA 存在下で放置した T47D 細胞の培養上清中で検出された K18 レベルは、17hPA 非存在下で放置した同細胞の培養上清中で検出された K18 レベルよりも明らかに低かった (図 8 左図)。このことは、17hPA 非存在下で放置した T47D 細胞では、72 時間の放置により細胞が分裂・増殖し、細胞数が、17hPA 存在下で放置した同細胞の細胞数よりも多いことが顕微鏡観察によって確認されたことから、細胞数の増加に伴い相対的に培養上清中の K18 レベルが高くなったと考えられる。一方、ccK18 レベルもまた、17hPA 存在下で放置した T47D 細胞の培養上清中においてよりも、17hPA 非存在下で放置した同細胞の培養上清中において高かったが、そのレベルの差の度合いは、K18 の時に比べ小さかった。そこで、17hPA 存在下で放置した T47D 細胞におけるアポトーシス誘導率が、17hPA 非存在下で放置した同細胞におけるその誘導率と比較された (図 8 右図)。アポトーシス誘導率は、17hPA 非存在下で放置した T47D 細胞においてよりも 17hPA 存在下で放置した同細胞において、統計学的有意性をもって高かった。しかしながら、そのアポトーシス誘導率 (ccK18/K18) は 1 以下であることから、17hPA は、T47D 細胞に対してアポトーシスよりもむしろネクローシスを強く誘導することが示唆された。

(9) 新規プロゲステロン誘導体の哺乳類細胞に対する生物活性の総括

本研究において、17hPL のステロイドホルモン活性は、天然のプロゲステロンおよび既存の合成プロゲステロン誘導体のその活性よりも弱いことが示唆された (図 6)。このことは、プロゲステロンを基本母核構造とし、ステロイドホルモン活性を極限まで減弱させたステロイド系抗ピロリ菌薬の開発が可能であることを意味する。今後、創薬的に考えられ得るプロゲステロン誘導体を種々設計し、得られた新規合成プロゲステロン誘導体の抗ピロリ菌活性およびステロイドホルモン活性をさらに詳細に検討する必要がある。もう一つの新規プロゲステロン誘導体の 17hPA は、ヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞に対して、ある程度の選択性をもって細胞障害作用を示すことが判明した (図 7)。17hPA は、ヒト乳癌細胞株 T47D 細胞に対して、アポトーシスよりもむしろネクローシスを強く誘導することが示唆されたことから、17hPA は、MKN45 細胞に対してもネクローシスを強く誘導する可能性が考えられる (図 8)。上述したように、17hPA は、ピロリ菌の主要な PE 分子種の DMPE に対して選択性の高い結合親和性を示すことが本研究により明らかとなった (図 3)。また、17hPA は、LPPE および MPPE を主要な PE 分子種として保持するフェリス菌に対して効果的な殺菌作用を示し、フェリス菌 PE に対して選択的な結合能を有することが示唆された (図 2、図 4 および図 5)。これらのことから、申請者は、PE 分子中の炭素数 14 以下のミリスチン酸やラウリン酸などの中鎖飽

和脂肪酸が、17hPA と PE 分子種の相互作用に重要な役割を果たすと考えている。ピロリ菌を含むグラム陰性細菌の細胞膜を構成する最も主要なグリセロリン脂質成分は PE であるが、哺乳類細胞の細胞膜を構成する最も主要なグリセロリン脂質成分は、ホスファチジルコリン (PC) である。即ち、17hPA は、ミリスチン酸やラウリン酸を結合する PE に対してだけでなく、それら脂肪酸を結合する PC に対しても選択性のある結合親和性を示すかも知れない。また、17hPA は、ある程度の選択性をもって MKN45 細胞に対して細胞障害作用を示すことから、MKN45 細胞は、T47D 細胞および vero 細胞に比べ、ミリスチン酸或いはラウリン酸を結合する PC 分子種を細胞膜に豊富に含むかも知れない。これらのことを検証するには、まず、MKN45 細胞、T47D 細胞および vero 細胞から PC を抽出・精製し、それら細胞株間で PC の脂肪酸組成および主要な PC 分子種の構造を比較する必要がある。もし、MKN45 細胞において、ミリスチン酸或いはラウリン酸を結合する PC 分子種の含有率が、他の細胞株のそれら PC 分子種の含有率よりも高かった場合、得られた PC 分子種の化学的情報を基に、ミリスチン酸 PC 或いはラウロイル PC を化学的に合成し、17hPA のそれら PC 分子種に対する結合親和性およびそれら PC 分子種を用いて調製した PC ベシクルと 17hPA の相互作用について検討する必要がある。これらの検証が成功裡に遂行した場合、特に胃の新生物 (胃癌) に対して、画期的な作用機序 (腫瘍細胞の膜脂質に選択的に結合し、その膜構造を不安定化させ腫瘍細胞のネクローシスを誘導する) により制癌効果を発揮するステロイド系抗腫瘍薬の開発が期待される。

#### 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. A. Amgalanbaatar, H. Shimomura, K. Hosoda, S. Hayashi, K. Yokota, Y. Hirai. Antibacterial activity of a novel synthetic progesterone species carrying a linoleic acid molecule against *Helicobacter pylori* and the hormonal effect of its steroid on a murine macrophage-like cell line. J Steroid Biochem Mol Biol 140 (2014) 17-25.
2. A. Amgalanbaatar, K. Hosoda, H. Shimomura. Phosphatidylethanolamine, but not phosphatidylglycerol-cardiolipin, isolated from two species of *Helicobacter* binds cholesterol over cholesteryl ester. Lipids 50 (2015) 799-804.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

下村裕史 (Shimomura, Hirofumi)  
自治医科大学・医学部・医学科・准  
教授  
研究者番号：80348002

##### (2) 研究分担者

なし  
研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし  
研究者番号：