

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860069

研究課題名(和文) 微小管ダイナミクスに着目した植物由来がん分子標的治療薬シードの探索研究

研究課題名(英文) Discovery of the seeds for plant-derived molecular-targeted agents with a focus on microtubule dynamics

研究代表者

横須賀 章人 (Yokosuka, Akihio)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20318190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：微小管ダイナミクスを分子標的とする植物由来新規抗がん剤シードの探索を行った。3種の生薬、3種のヒガンバナ科植物、1種のキンポウゲ科植物、1種のユリ科植物のアルコール抽出物について、HL-60ヒト白血病細胞に対する細胞毒性を指標とした成分検索を行った結果、キンポウゲ科 *Helleborus foetidus* から単離された新規プファジェノリド誘導体と anemonin、ユリ科 *Ornithogalum saundersiae* から単離されたコレスタン配糖体は、HL-60細胞に対してアポトーシスを誘導し、G2/M期で細胞周期を停止したため、細胞分裂期における紡錘体形成を蛍光イメージングにより判定した。

研究成果の概要(英文)：The alcoholic extracts of three crude drugs [the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata* (Umbelliferae), the leaves of *Thujopsis dolabrata*, and the barks of *Marsdenia cundurango*], three Amaryllidaceae plants (*Lycoris radiata*, *Galanthus elwesii*, and *Haemanthus multiflorus*), a Ranunculaceae plant (*Helleborus foetidus*), and a Liliaceae plant (*Ornithogalum saundersiae*), were evaluated for their cytotoxic activity against HL-60 human leukemia cells. As a result of bioassay-guided fractionation of the extracts, a chromon derivative from *S. divaricata*, a pregnane glycoside from the barks of *M. cundurango*, a bufadienolide derivative (HF-1) and anemonin from *H. foetidus*, a cholestane glycoside (OS-1) from *O. saundersiae* were obtained as active substances, and all of them induced apoptosis in HL-60 cells. HF-1, anemonin, and OS-1 arrested cell cycle progression in G2/M phase. Anemonin showed microtubule assembly in A549 human lung cancer cells by immunofluorescence microscopy.

研究分野：抗腫瘍活性天然物の探索研究

キーワード：腫瘍細胞毒性 アポトーシス 微小管ダイナミクス 分子標的 細胞周期 チューブリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 臨床で使用される抗がん剤のうち、微小管作用薬は天然物から開発されたものが多く、微小管への結合部位の違いにより作用機序が異なる。既存の微小管作用薬であるビンカルカロイド類やタキサン類は微小管の β -チューブリンに広範囲にわたって結合し、細胞分裂期において急速な微小管構造の変動を起こす。その結果、臨床で重篤な副作用が生じ、薬剤耐性も報告され、新たな作用機序の微小管作用薬の発見が臨まれていた。

(2) エリブリンメシル酸塩に代表される微小管ダイナミクス阻害薬は、微小管構造を破壊せずに微小管の伸長のみを阻害し、微小管の重合部位である(+)端のみに選択的かつ高親和性に結合して作用を示す。微小管の脱重合に影響を及ぼすことなく微小管伸長の速度と程度を抑制し、既存の微小管作用薬とは薬物結合部位が異なるため、化学療法の治療歴があり、微小管作用薬に耐性が発現したががん患者に対しても奏功する。微小管ダイナミクスは抗がん剤の新たな作用点となりうるが、国内・国外を問わず微小管ダイナミクスを標的とした抗がん剤の探索研究、特に、天然物を対象とした系統的・本格的な探索研究はほとんど実施されていなかったことから、天然物から微小管ダイナミクスに着目した抗がん剤シードを探索することは意義があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物からヒト腫瘍細胞の微小管ダイナミクスに作用してアポトーシス型の細胞死を引き起こす化合物を探索した後、それらの微小管ダイナミクスへの作用を解析することで、新たな作用メカニズムを有するがん分子標的治療薬シーズを見出すことを目的とする。ここで発見された化合物は、がん細胞選択的に細胞毒性を示し、微小管作用薬に耐性を示したがん細胞に対しても細胞毒性を有することが考えられ、最終的に臨床応用への可能性が高いがん分子標的治療薬シードに繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) 生薬・植物エキスのヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価

漢方系生薬や、キンポウゲ科、ヒガンバナ科、ユリ科植物などの生薬・植物エキスについて、ヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価を行う。

(2) 活性成分の単離・構造決定

腫瘍細胞に対して細胞毒性が認められた生薬・植物エキスについては、同活性を指標に、多孔質ポリスチレン樹脂(Diaion HP-20)、シリカゲル、ODSを充填したカラムクロマトグラフィー、分取HPLCなどの各種クロマトグラフィーを駆使して、活性成分を単離する。NMRスペクトルを中心とした解析と化学的手法により、単離された活性成分の構造を絶対立体配置を含めて決定する。

(3) 活性成分の細胞毒性およびアポトーシス誘導活性の評価

構造が明らかとなった化合物については、HL-60ヒト白血病細胞、A549ヒト肺非小細胞がん細胞に対する腫瘍細胞選択的な細胞毒性試験をMTTアッセイにより行う。アポトーシス誘導活性は、細胞の形態変化の観察(蛍光顕微鏡による観察)、断片化DNAの観測、caspase類の発現の確認、により評価する。

(4) 微小管ダイナミクスに作用する化合物のスクリーニング

微小管ダイナミクスへ作用する化合物のスクリーニングは、以下の2段階のスクリーニングを行う。

細胞周期解析によるG₂/M期阻害物質の検出

活性化合物で一定時間処理した各種培養腫瘍細胞を、70% EtOHで膜透過処理を行い、ヨウ化プロピジウムでDNAを染色する。その後、フローサイトメトリーにより細胞内DNA含量の変化を評価する。微小管に作用して細胞増殖を停止する化合物は、細胞周期をG₂/M期で阻害する。

細胞分裂期における紡錘体形成の判定

培養腫瘍細胞をカバーガラス上に培養し、G₂/M期で細胞周期を阻害を示した化合物で一定時間処理する。ホルムアルデヒドで固定処理後、微小管を免疫染色する。併せて、染色体DNAを蛍光色素(DAPI)で染色する。蛍光顕微鏡を用いて、細胞分裂期(M期)の微小管(FITCによる蛍光)と染色体DNA(DAPIによる蛍光)を直接的に観察する。急速な微小管構造の変動をもたらす薬物は、微小管構造が崩壊して紡錘体が形成されず、微小管ダイナミクスに作用する薬物は紡錘体が形成される。

4. 研究成果

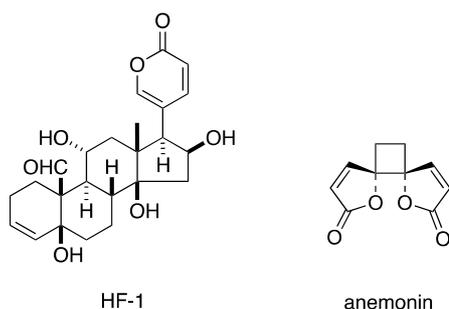
(1) 生薬・植物エキスのヒト培養腫瘍細胞に対する細胞毒性の評価

3種の生薬〔防風（セリ科 *Saposhnikovia divaricata* の根及び根茎）、あすなる葉（ヒノキ科 *Thujaopsis dolabrata* の葉）、コンズランゴ（ガガイモ科 *Marsdenia cundurango* の樹皮）〕、3種のヒガンバナ科植物（*Lycoris radiata*、*Galanthus elwesii*、*Haemanthus multiflorus*）、1種のキンポウゲ科植物（*Helleborus foetidus*）、1種のユリ科 *Ornithogalum saundersiae* のアルコール抽出エキスと、それらを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画した粗画分について、HL-60 細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、あすなる葉、*L. radiata*、*G. elwesii*、*H. multiflorus*、*H. foetidus*、*O. saundersiae* については抽出エキスに活性が認められ〔50% 細胞増殖阻害濃度（ IC_{50} ）: 0.13 ~ 4.2 $\mu\text{g/mL}$ 〕、防風とコンズランゴは、粗分画した溶出画分に活性が認められた。

（2）活性成分の単離・構造決定と細胞毒性およびアポトーシス誘導活性の評価

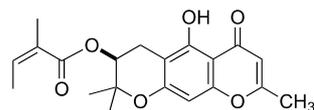
腫瘍細胞に対して細胞毒性が認められた生薬・植物エキス、あるいはそれらを粗分画した溶出画分について、同活性を指標に、カラムクロマトグラフィー、分取 HPLC などを駆使し、以下に示す化合物を活性成分として単離・構造決定した。

H. foetidus から単離された新規プファジェノリド誘導体（HF-1）は、HL-60 細胞および A549 細胞に対して強い細胞毒性を示した（ IC_{50} 0.035 μM 、0.029 μM ）。



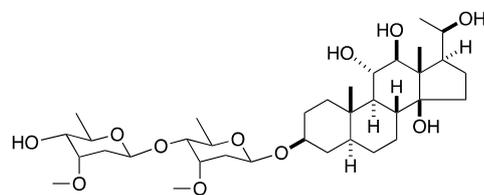
HF-1 は、HL-60 細胞に対して、核クロマチンの凝集と caspase-3 の活性化を示したことから、アポトーシスを誘導することが示された。さらに、HF-1 で処理した HL-60 細胞ではミトコンドリア膜電位の消失と、cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出が認められたことから、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが確認された。同じく *H. foetidus* から単離された anemonin も、HL-60 細胞および A549 細胞に対して中程度の細胞毒性を示した（ IC_{50} 2.7 μM 、8.8 μM ）。

防風から単離されたクロモン誘導体の 3'-*O*-angeloylhamaudol で処理した HL-60 細胞において、ミトコンドリア膜電位の消失と cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出、および caspase-9 の活性化が確認されたことから、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導していることが示唆された。



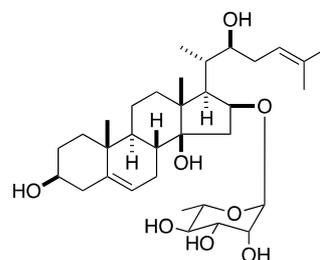
3'-*O*-angeloylhamaudol

コンズランゴから単離された新規プレグナン配糖体 Mc-9 は、HL-60 細胞と A549 細胞に対して強い活性を示し HL-60 細胞に対して核クロマチンの凝集と caspase-3 の活性化を示したことから、アポトーシスを誘導することが確認された。



Mc-9

O. saundersiae から単離された新規コレスタン配糖体 OS-1 は、HL-60 細胞に対して細胞毒性（ IC_{50} 0.16 μM ）を示し、アポトーシスを誘導したが、ミトコンドリア膜電位の消失、cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出は確認できなかった。したがって、OS-1 はミトコンドリア非依存的な経路でアポトーシスを誘導することが示唆された。



OS-1

（3）微小管ダイナミクスに作用する化合物のスクリーニング

HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導した化合物について、フローサイトメトリーを用いて、細胞周期の解析を行なった。その結果、*H. foetidus* から単離された新規プファジェノリド誘導体 HF-1 と anemonin、ユリ科

O. saundersiae から単離されたコレスタン配糖体 OS-1 は、HL-60 細胞に対して G₂/M 期で細胞周期を停止した。

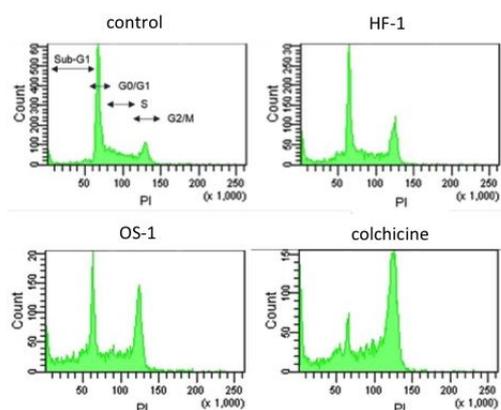


Fig. Effects of HF-1 or OS-1, or colchicine on cell cycle progression in HL-60 cells
Cell cycle distribution in HL-60 cells after treatment with 1 μ M of HF-1, 10 μ M of OS-1, or 1 μ M of colchicine for 20 h.

さらに、A549 細胞を用いて、細胞分裂期における紡錘体形成を、チューブリンと核の蛍光イメージングにより判定した結果、anemonin は、微小管の重合阻害剤である colchicine と同様の挙動を示すことが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Akihito Yokosuka, Tomoki Iguchi, Riko Kawahata, Yoshihiro Mimaki. Cytotoxic bufadienolides from the whole plants of *Helleborus foetidus*, 査読有, *Phytochemistry Lett.*, 23, 2018, 94-99
DOI: 10.1016/j.phytol.2017.10.017

Akihito Yokosuka, Natsumi Suzuki, Yoshihiro Mimaki. Chemical constituents of the bulbs of *Haemanthus multiflorus*, 査読有, *Phytochemistry Lett.*, 21, 2017, 6-10
DOI: 10.1016/j.phytol.2017.05.007

Tomoki Iguchi, Minpei Kuroda, Rei Naito, Tomoyuki Watanabe, Yukiko Matsuo, Akihito Yokosuka, Yoshihiro Mimaki. Structural characterization of cholestane rhamnosides from *Ornithogalum saundersiae* bulbs and their cytotoxic activity against cultured tumor cells, 査読有, *Molecules*, 22, 2017, e1243
DOI: 10.3390/molecules22081243

Akihito Yokosuka, Satoru Tatsuno, Takuma Komine, Yoshihiro Mimaki. Chemical constituents of the roots and rhizomes of *Saposhnikovia divaricata* and their

cytotoxic activity. 査読有, *Nat. Prod. Commun.*, 12, 2017, 255-258

〔学会発表〕(計 15 件)

高野 真吾、井口 巴樹、横須賀章人、三巻 祥浩、キンポウゲ科植物の化学成分(27) *Helleborus foetidus* 全草の新規スピロスタン配糖体の構造、日本薬学会第 138 年会、2018.3.25、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

井口 巴樹、横須賀章人、黒田明平、三巻 祥浩、植物由来新規ステロイド系化合物の構造と細胞毒性、第 59 回天然有機化合物討論会、2017.9.20、札幌市民ホール(北海道札幌市)

内田 優香、井口 巴樹、横須賀章人、三巻 祥浩、キンポウゲ科植物の化学成分(25) *Helleborus foetidus* 全草の新規ステロイド配糖体の構造と細胞毒性、日本生薬学会第 64 回年会、2017.9.9、東邦大学薬学部(千葉県船橋市)

安藤 円、井口 巴樹、横須賀章人、三巻 祥浩、キンポウゲ科植物の化学成分(24) *Helleborus foetidus* 全草の新規 bufadienolides の構造とアポトーシス誘導活性、日本生薬学会第 64 回年会、2017.9.9、東邦大学薬学部(千葉県船橋市)

Akihito Yokosuka, Tomoki Iguchi, Yoshihiro Mimaki, New bufadienolides from the whole plants of *Helleborus foetidus* and their apoptosis-inducing activity, 2017.9.3, 65th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Congress Center Basel (バーゼル、スイス)

Tomoki Iguchi, Akihito Yokosuka, Minpei Kuroda, Yoshihiro Mimaki, Cholestane glycosides from *Ornithogalum saundersiae* bulbs and their apoptosis-inducing activity via a mitochondriaindependent pathway, 2017.9.3, 65th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Congress Center Basel (バーゼル、スイス)

川幡 莉子、横須賀章人、三巻 祥浩、キンポウゲ科植物の化学成分(23) *Helleborus foetidus* の新規 bufadienolide 類、日本生薬学会第 63 回年会、2016.9.24、富山国際会議場(富山県富山市)

鈴木 夏生、横須賀章人、三巻 祥浩、ヒガンバナ科 *Haemanthus multiflorus* 鱗茎の化学成分、日本生薬学会第 63 回年会、2016.9.24、富山国際会議場(富山県富山市)

Akihito Yokosuka, Takuma Komine, Yoshihiro Mimaki, International symposium on natural products for the future 2016 Tokushima, 2016.9.1, Tokushima Bunri University (徳島県徳島市)

川幡 莉子、横須賀章人、三巻 祥浩、キンポウゲ科植物の化学成分(22)、*Helleborus foetidus* の化学成分と細胞毒性について、日本薬学会第 136 年会、2016.3.26、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

竜野暁、横須賀章人、三巻祥浩、コンズランゴの化学成分と細胞毒性について、日本薬学会第 136 年会、2016.3.26、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

小峰拓馬、横須賀章人、三巻祥浩、防風の化学成分と細胞毒性について、日本生薬学会第 62 回年会、2015.9.11、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

横須賀章人、竜野 暁、鈴木 夏生、高山 裕樹、三巻 祥浩、コンズランゴの化学成分について、日本薬学会第 135 年会、2015.3.25、神戸学院大学(兵庫県神戸市)

初馬 薫子、竜野 暁、横須賀章人、三巻 祥浩、コンズランゴの新規プレグナン配糖体について、日本生薬学会第 61 回年会、2014.9.13、福岡大学薬学部(福岡県福岡市)

齋藤 慎、横須賀章人、三巻 祥浩、*Thujopsis dolabrata* の化学成分と細胞毒性、日本生薬学会第 61 回年会、2014.9.13、福岡大学薬学部(福岡県福岡市)

〔その他〕

ホームページ

東京薬科大学薬学部漢方資源応用学教室

<https://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/kanposhigen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横須賀 章人 (YOKOSUKA, Akihito)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20318190