

## 論文の内容の要旨

氏名：矢 萩 弘 晃

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：膵癌微小環境を標的とした天然物からの癌進行制御物質の探索

### 【背景】

膵癌は我が国での悪性新生物における部位別死亡数第4位の癌であり、5年生存率10%以下と他の癌と比較しても非常に予後不良な固形癌である。外科手術による摘出が標準療法であるが、進行するまで自覚症状に乏しいため早期発見が困難であり、周囲に主要血管が豊富に存在し容易に遠隔転移するため外科手術不可能な症例が多く存在する。また、化学療法や放射線療法もその奏効率は低く、早期発見法やより有効な治療薬の開発が急務である。近年、治療困難な要因として腫瘍および正常組織から構成される微小環境が注目されている。膵癌は固形癌の中でも血流が極めて乏しく低酸素・低栄養状態となるが、このような微小環境下でも様々な因子を産生もしくは周囲の正常組織から放出させることで、解糖系の亢進によるATP産生や血管新生を行い、癌細胞の増殖や転移が促進すると報告されている。そのため、癌微小環境を制御する天然薬物を探索することで化学療法の奏効率の低い膵癌に対する治療薬候補となると考え、生薬および天然物を対象として探索研究を行うこととした。

### 第1章 昆虫寄生糸状菌 *Isaria* sp. RD055140 からの膵癌増殖および TGF- $\beta$ 誘導性遊走抑制活性物質の探索

#### 【目的】

癌微小環境では間質細胞と癌細胞との相互作用により癌促進的な変化がもたらされることが報告されており、その一例として transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) による癌細胞の上皮間葉転換 (EMT) が挙げられる。線維芽細胞などの間質細胞から放出される TGF- $\beta$  により EMT が誘導されると、上皮系マーカーの発現抑制および間葉系マーカーの発現亢進を介して癌細胞は遊走および浸潤能を獲得し、他臓器へ遠隔転移すると考えられている。そこで、細胞増殖抑制作用に加え、EMT 抑制活性も併せて有する化合物を探索することにより癌の進行を制御する新たな抗腫瘍薬候補の創出に繋がると考えた。

昆虫寄生糸状菌は昆虫などに寄生する *Cordyceps* 属やその近縁菌であり、いくつかの二次代謝産物は抗腫瘍活性や免疫抑制活性を有することが報告されている。今回、膵癌細胞株 PANC-1 細胞に対する増殖抑制活性を指標として昆虫寄生糸状菌培養液 EtOAc エキス 171 種をスクリーニングしたところ、*Isaria* sp. RD055140 に活性が認められたため、活性物質の探索、細胞増殖・遊走抑制活性評価および作用機序解析を行った。

#### 【方法】

PANC-1 細胞に対する細胞増殖抑制活性が認められた *Isaria* sp. RD055140 を potato dextrose broth (PDB, 10.5 L) にて振盪培養し、等量の EtOAc で抽出したエキスを各種クロマトグラフィーにより分離および精製を行い、得られた化合物について構造解析を行った。また、各化合物に対して細胞増殖抑制活性を評価し、最も強い活性が認められたものについて wound-healing アッセイによる遊走抑制活性および RT-PCR 法による上皮・間葉系マーカー遺伝子の発現解析を行った。

#### 【結果および考察】

スクリーニングにおいて活性が認められた *Isaria* sp. RD055140 の PDB 培養液の EtOAc エキス [cell viability: 31.4% (30  $\mu$ M, % of control)] について成分探索を行った結果、beauvericin (**1**) および新規化合物 **2** を含む 3 種の Isariotin アナログ (**2-4**) の計 4 化合物を単離・同定した。単離した化合物 4 種について活性評価を行ったところ、**2-4** は PANC-1 細胞の増殖をほとんど抑制しなかったが、**1** は 3-10  $\mu$ M で増殖抑制活性 (IC<sub>50</sub> = 4.8  $\mu$ M) が認められた。

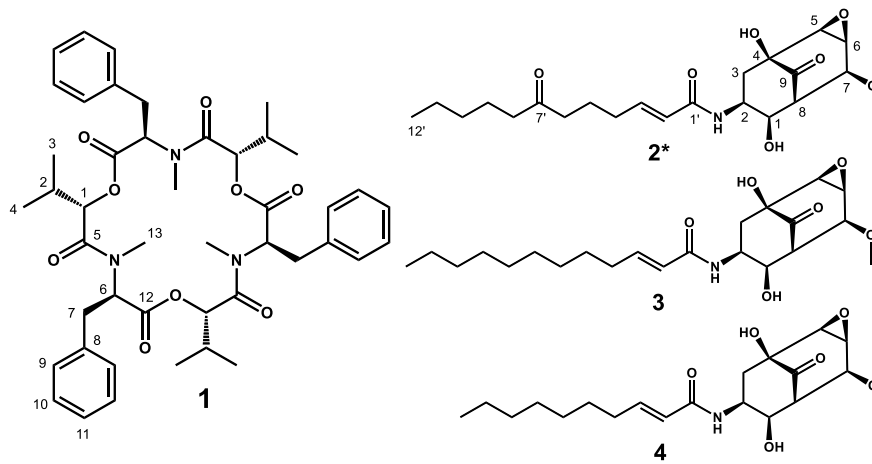


Figure 1. The structures of isolated compounds (1–4) from EtOAc extract of the culture medium of *Isaria* sp. RD055140. \*: new compound

次に、活性が認められた **1** について、wound-healing アッセイにより細胞遊走能評価を行ったところ、細胞増殖抑制をほとんど示さなかった濃度 (0.1–1  $\mu\text{M}$ ) にて TGF- $\beta$  誘発性細胞遊走を濃度依存的に抑制した (Figure 2A). さらに、活性メカニズム解析のため上皮および間葉系マーカーの遺伝子発現量の変化を検討したところ、TGF- $\beta$  により減少した上皮系マーカーである *E-cadherin* の発現量の増加が認められた。一方で、増加した *N-cadherin* および *Snail* の発現量を有意に減少させたことから、**1** はこれらの因子の発現量を制御することにより PANC-1 細胞の遊走を抑制することが示唆された (Figure 2B). 以上の結果より、**1** は高濃度で膵癌細胞に対して細胞増殖抑制活性を示す一方で、低濃度で細胞遊走を抑制することが認められ、遠隔転移しやすい膵臓癌に対する治療薬候補としての可能性が示唆された。

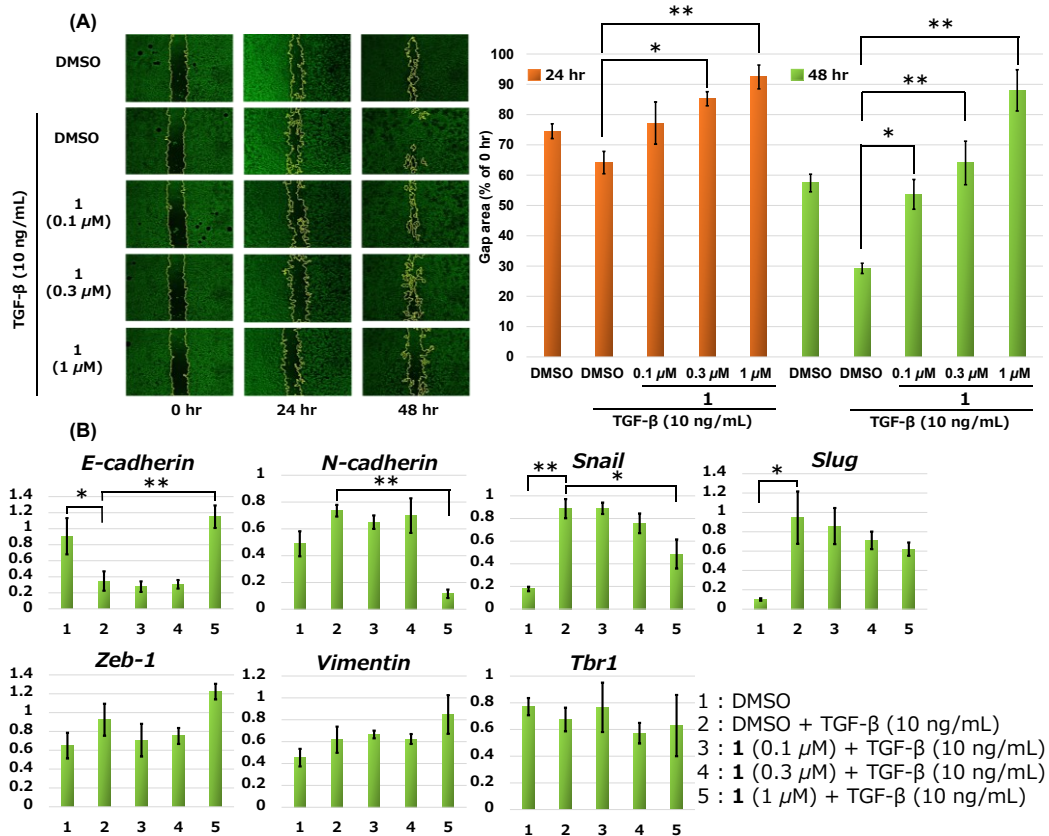


Figure 2. Effect of **1** on migration of PANC-1 cells. (A) Wound-healing assay, PANC-1 cells grown at confluency and quantification of cell free area of the culture. (B) The mRNA expression levels of EMT-related markers. The expression levels of the above genes were confirmed using *Gapdh* as a control. These experiments were done in triplicate (N = 3). Data were expressed as the mean  $\pm$ SE. Quantification was done using NIH Image J (ver. 1.51). Statistical analysis was performed using JMP 14. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

【目的】

低酸素誘導因子 (HIF) は細胞が低酸素環境に暴露された際に活性化される因子であり, HIF には活性を左右する主要制御サブユニット (HIF-1 $\alpha$  および 2 $\alpha$ ) と恒常的に発現しているサブユニット (HIF-1 $\beta$ ) が存在する. 正常酸素濃度下では HIF-1 $\alpha$  および 2 $\alpha$  は分解酵素により速やかに分解されるが, 低酸素環境下では分解が抑制され, HIF-1 $\beta$  と複合体を形成する. この複合体は核内に移行すると低酸素応答配列 (HRE) に結合し, 血管新生や糖代謝などに関与する遺伝子の転写を活性化することで細胞の生存や増殖に寄与する. そのため, 癌細胞内における HIF シグナルを制御する化合物を探索することで, 低酸素環境を正常化し癌の進行を抑制する新規抗癌剤の開発につながると考えた.

HIF シグナル阻害化合物の探索のため, 当研究室で作成した 187 種の生薬エキスイブラリーを対象に HRE を組み込んだプラスミドを導入した PANC-1 細胞を用いて, レポーターアッセイによるスクリーニングを行ったところ, 麻黄のメタノールエキスに強い阻害活性 ( $IC_{50} = 6.5 \mu M$ ) が認められた. 麻黄は主に ephedrine およびその誘導体を主成分とする生薬であるが, 近年, フラボノイドなどのアルカロイド以外の成分に抗癌活性や鎮痛活性などの様々な生物活性があることが報告されている. そのため, 本研究では麻黄に含まれる非アルカロイド成分を対象として活性物質を探索し, その作用機序解析を行った.

【方法】

PANC-1 細胞を用いた HRE 阻害レポーターアッセイスクリーニングにおいて阻害活性が認められた麻黄 (1.5 kg) をアセトン (5 L $\times$ 3) で抽出した. 得られたエキス (45 g) を酸・塩基を用いた液-液分配および各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行った. 得られた化合物について構造解析を行い, 上述のレポーターアッセイにより阻害活性を評価し, その構造活性相関についても解析を行った. 最も強い活性が認められた化合物に関して Western blot 法および RT-PCR 法による HIF- $\alpha$  とそのシグナル下流因子のタンパク質および遺伝子発現解析を行った.

【結果および考察】

麻黄のアセトンエキスについて, 成分探索を行った結果, 2 種の新規新規アシル化フラボノール配糖体 (5, 6) を含むフラボノイド 10 種 (5-14) を単離・同定した (Figure 3). 単離した 10 種の化合物について HRE 阻害レポーターアッセイを行ったところ, 5, 6 および 11 に阻害活性 ( $IC_{50} = 18.0 \pm 0.6, 13.3 \pm 2.2, 28.9 \pm 6.9 \mu M$ ) が認められた. 9, 10 および 11 を比較すると, rhamnose の 2 位から 4 位に置換基が結合していない場合および rhamnose の 4 位に (Z)-p-coumaroyl が結合した場合は活性が減弱していた ( $IC_{50} > 30 \mu M$ ) ため, 活性発現および増強には (E)-p-coumaroyl の存在が重要であることが示唆された. また, 5 および 6 の構造を比較すると, rhamnose の 2 位および 3 位の水酸基に dihydroxypalmitic acid がエステル結合すると有意差は認められなかったものの, 活性が増強する傾向があり, 2 位に結合した場合, 3 位よりも阻害活性が増強される傾向があることが示された.

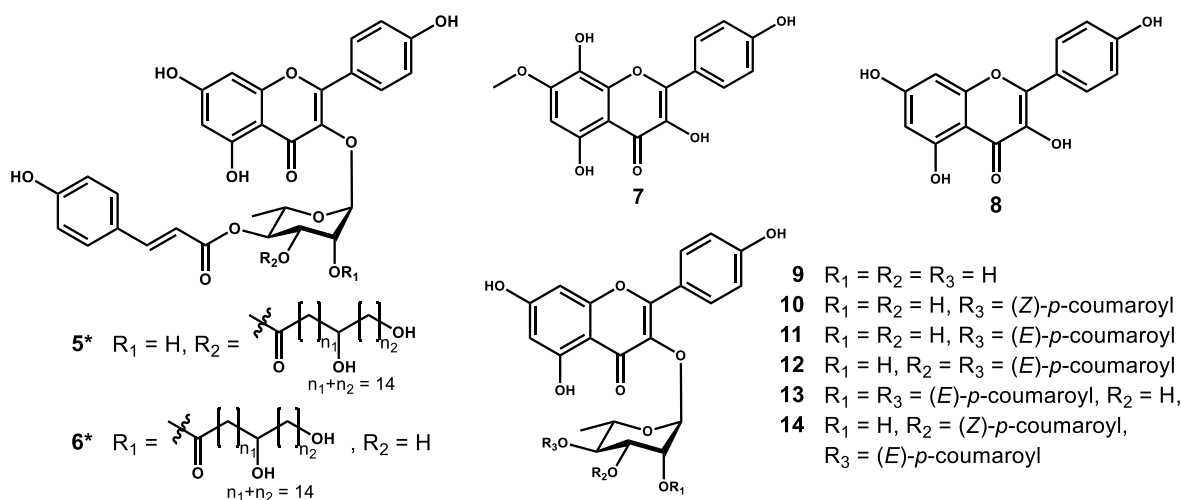


Figure 3. The structures of isolated compounds (5-14) from Ephedrae Herba. \*: new compounds

最も強い活性が認められた **6** について、Western blot 法を用いて細胞質および核内の HIF-1 $\alpha$  および 2 $\alpha$  のタンパク質発現解析を行った。その結果、細胞質における両タンパク質の発現には有意な変化が認められなかったのに対して、核内においては 30  $\mu$ M にて HIF-1 $\alpha$  の有意な発現低下が認められ、2 $\alpha$  についても発現低下の傾向が認められた (Figure 4A)。HIF-1 $\alpha$  および 2 $\alpha$  タンパク質は通常酸素濃度下では様々な修飾酵素が関与するユビキチン-プロテアソーム経路で速やかに分解されることが報告されている。そのため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用い、**6** の HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現低下にこの経路が関与しているかについて解析した (Figure 4B)。通常酸素下では PANC-1 細胞は MG132 (10  $\mu$ M) 処理により HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現が増加したが、**6** (30  $\mu$ M) との併用により発現増加が抑制された (Figure 4C)。これらの結果から、**6** は HIF タンパク質の核内移行へは影響を与えず、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して HIF-1 $\alpha$  タンパク質を不安定化させることが示唆された。

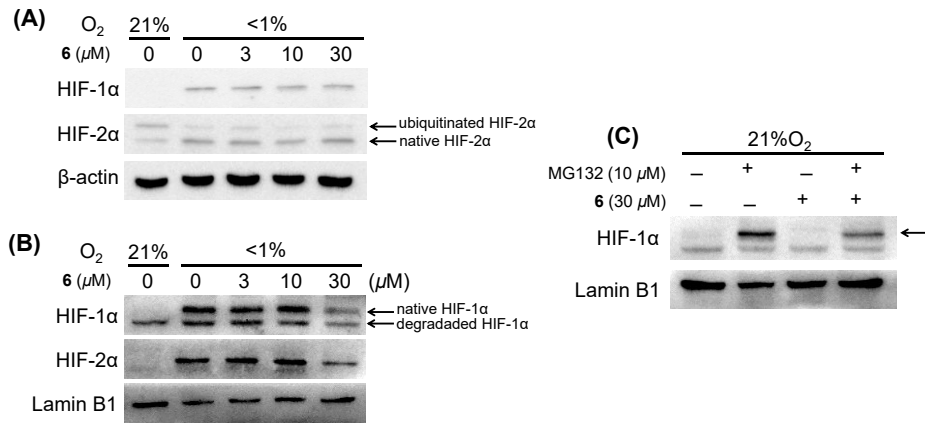


Figure 4. (A) Effects of **6** on the amount of HIF proteins on PANC-1 cells in cytosol fraction. (B) Effects of **6** on the amount of HIF proteins on PANC-1 cells in nuclear fraction. (C) Effect of **6** on HIF-1 $\alpha$  protein accumulation in nuclear fraction induced by proteasome inhibitor.

また、**6** の HIF シグナル下流因子発現への影響を評価するため、RT-PCR 法による HIF- $\alpha$  およびその関連因子の mRNA 発現解析を行った (Figure 5)。Hif-1 $\alpha$  および Hif-2 $\alpha$  に関しては発現にほとんど影響が認められなかったが、30  $\mu$ M にて細胞への糖の取り込みに関与する *Glut1* の有意な発現抑制が認められた。このことから、**6** は HIF の遺伝子発現および核内移行には影響を与えず、ユビキチン-プロテアソーム経路の阻害を介して HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現を低下させ、HIF シグナル下流因子である *Glut1* の mRNA 発現低下に影響することが示唆された。これらの結果から、**6** は低酸素シグナルを制御する膵癌治療薬候補化合物となる可能性があると考えられる。

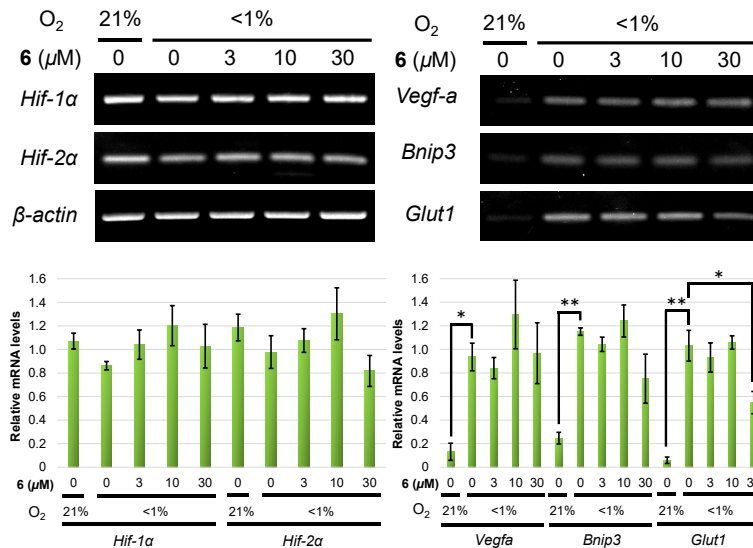


Figure 5. Effects of **6** on the expression of HIF and related genes in mRNA levels. The expression levels of the above genes were confirmed using  $\beta$ -actin as a control. These experiments were done three times. Data were expressed as the mean  $\pm$ SE. Quantification was done using NIH Image J (ver. 1.51). Statistical analysis was performed using JMP 14. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01.