

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 松 崎 桂 一

(副査) 教授 飯 島 洋 教授 内 山 武 人

本研究は、天然物より微小環境を標的とした膵癌の進行抑制物質の探索研究である。

膵癌はわが国において年間患者数および年間死亡者数が増加傾向にある固形癌の一種であり、自覚症状があまりなく転移しやすいことが知られている。しかも発見時には進行した状態であることが多いので5年生存率が10%以下と低い予後不良の疾患である。現在使用されている標準的な治療法は2000年代初頭に確立されたものであるが、未だに有効な新規治療薬の開発が急務とされている。近年、癌微小環境を標的とした抗癌剤の開発研究が精力的に行われているが、未だ実用化に至っていない。本研究では膵臓における癌微小環境に着目し、具体的にはTGF- β シグナルあるいは低酸素誘導因子(hypoxia-inducible factor, HIF)シグナルを指標として、真菌及び生薬から新規膵癌治療薬候補化合物を見出した。さらにそれらのメカニズム解析を行った。

1. 昆虫寄生糸状菌を用いた膵癌細胞の細胞増殖抑制活性および遊走抑制活性物質の探索

昆虫寄生糸状菌培養液ライブラリーを用い、PANC-1細胞に対する細胞増殖抑制および細胞遊走抑制活性を示す物質の探索を行ない、*Isaria* sp. RD055140株のEtOAcエキスを活性物質を認めた。このエキスからbeauvericinおよび新規化合物7-O-methoxyisariotin Cを含む3種のisariotin誘導体を単離・同定した。単離した化合物についてPANC-1細胞を用いた細胞増殖抑制活性を測定したところ、isariotin誘導体には活性が認められなかったものの、beauvericinに $IC_{50} = 4.8 \mu M$ と強い阻害活性を認めた。また、wound-healing法により細胞遊走能に対する影響を評価した。すなわち、細胞遊走に関与する増殖因子の1種であるTGF- β (10 ng/mL)でPANC-1細胞を刺激すると、48時間までに創傷がほとんど閉塞するが、beauvericinが0.1-1 μM で濃度依存的に回復を遅延させることを明らかにした。更に、この細胞遊走抑制メカニズムの解析のためRT-PCR法により上皮系および間葉系マーカー遺伝子発現を評価した。PANC-1細胞をTGF- β 刺激することにより上皮系マーカーである*E-cadherin*の発現が減少し、間葉系マーカーである*N-cadherin*, *Snail* および *Slug*の発現が上昇した。一方、beauvericinを0.1-1 μM 添加することにより、減少していた*E-cadherin*のmRNA発現が回復し、上昇していた*N-cadherin* および *Snail*のmRNA発現が抑制されていたことから、beauvericinはこれらの因子の発現を調節することによりPANC-1細胞の遊走を抑制することが示唆された。

以上の結果より、beauvericinが4.8 μM の高濃度で膵癌細胞に対して細胞増殖を抑制する一方で、0.1-1 μM の低濃度では細胞遊走を抑制することを明らかにした。この結果は、遠隔転移しやすい膵臓癌に対する治療薬候補化合物としての可能性を示唆するものである。

2. 生薬エキ斯拉イブラリーを用いた膵癌細胞のHIF抑制物質の探索

生薬エキ斯拉イブラリーを対象に、低酸素認識配列(hypoxia response element, HRE)を組み込んだプラスミドを導入したPANC-1細胞を低酸素下で培養し、HIF阻害活性を有する物質の探索を実施したところ、麻黄エキスの非アルカロイド画分に活性を見出した。常法に従い活性を指標に探索を実施して、新規アシル化フラボノール配糖体kaempferol 3-O-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-3"-O-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside および kaempferol 3-O-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-O-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside を含む10種のフラボノールを単離・同定した。単離した化合物の活性評価を行ったところ、新規アシル化フラボノール配糖体kaempferol 3-O-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-3"-O-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside, kaempferol 3-O-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-O-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside および kaempferol-3-O-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl] rhamnoside にそれぞれ IC_{50}

= 17.8, 13.4, 28.9 μM の阻害活性が認められた。これらの単離された化合物から、活性発現には rhamnose の 4 位に (*E*)-*p*-coumaroyl 基が必須で、2 位および 3 位に dihydroxypalmitic acid が結合することで活性が増強すること、dihydroxypalmitic acid が rhamnose の 2 位に結合している化合物は、3 位に結合している化合物と比較して、活性が増強する傾向にあると構造活性相関を明らかにした。

最も強い活性が認められた kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside について、HIF-1 α および 2 α のタンパク質の発現解析を行い、30 μM で HIF-1 α タンパク質の有意な発現抑制が認められ、HIF-2 α についても発現抑制傾向があることを明らかにした。また、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いて、ユビキチン-プロテアソーム経路への関与を検討した結果、MG132 単独処理で発現が増加した HIF-1 α が kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside との併用により有意に抑制していた。この結果から、kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside の活性にはユビキチン-プロテアソーム経路が関与していることが示唆された。

また、kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside の HIF-1 シグナル関連因子発現への影響を評価するため、RT-PCR 法による、HIF- α およびその下流因子の発現解析を行った。その結果、HIF-1 α の発現に関してはほとんど影響が認められなかったものの、HIF-2 α の発現は濃度依存的に減少することを明らかにした。また、下流因子については、細胞の糖の取り込みに関与する *Glut1* 遺伝子発現の有意な減少が認められた。

以上の結果から、kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside はユビキチン-プロテアソーム経路を介して、HIF-1 α タンパク質の分解を促進し、HIF シグナル下流因子である *Glut1* の mRNA 発現を減少させることを明らかにした。このことから、kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside は膵癌細胞において低酸素シグナルを制御する新規膵癌治療薬候補化合物となる可能性を明らかにした。

膵癌の標準治療薬として DNA 合成阻害剤である gemcitabine や cisplatin, 5-fluorourasil などが臨床で用いられているが、いずれも効果が十分ではなく、癌特異的な作用点を標的としていないため副作用発現が課題となっている。本研究は昆虫寄生糸状菌および生薬から膵癌における TGF- β および HIF シグナルを制御する活性化合物として beauvericin, kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-3"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside および kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside を見出し、そのうち beauvericin および kaempferol 3-*O*-[4"-(*E*)-*p*-coumaroyl-2"-*O*-dihydroxypalmityl]- α -L-rhamnoside について、その作用機序を明らかにしたものである。癌微小環境を標的として見出された天然物として arctigenin や verucvopeptin が知られているが、これらの膵癌における TGF- β および HIF シグナルへの影響に関する報告はなく、本研究で得られた知見はこれまで困難とされてきた膵癌治療に対する創薬研究の発展と新たな医薬品開発を期待させるものである。

以上より本論文は、創薬を目指した天然生物活性物質研究において優れたものであり、博士 (薬学) の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 3 年 1 月 15 日