学位論文　博士（理学）

牡丹皮に由来する細胞増殖抑制物質の探索および作用機序の検討

2019 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

黄　穎

目次

概要 4

序論 7

本論 12

第一章　漢方生薬に由来する細胞増殖抑制物質の探索 14

第一節 90 種生薬粗抽出物の細胞増殖抑制活性 16

第二節 牡丹皮に含まれる細胞増殖抑制物質の単離 19

第三節 細胞増殖抑制活性物質 A の同定 21

第二章　PFG の抗腫瘍活性の評価 24

第一節 正常細胞とがん細胞に対する抗腫瘍活性 26

第二節 がん細胞選択的なアポトーシス誘導活性 28

第三節 PFG による Csapase-3 の活性化 30

第四節 PFG の構造活性相関 32

第三章　PFG の作用機序の検討 34

第一節 細胞の形態変化 37

第二節 PFG による細胞周期停止 40

第三節 がん細胞における細胞分裂阻害効果 41

第四節 正常細胞における早期老化誘導効果 43

第五節 DNA 損傷の誘導 46

第六節 活性酸素種消去効果 49

第七節 PFG の増殖抑制メカニズムの推測 52

総括 54

実験項 60

参考文献 81

謝辞 85

概要

生物の二次代謝産物は、昔から医薬品として重宝されてきた。特に、植物から多くの抗がん物質が発見され、抗がん剤として開発され臨床へ応用された。しかし、現行の抗がん剤は細胞毒性が強いため、がん細胞だけではなく正常細胞も殺すので、患者にとって重篤な副作用を引き起こす。著者は、漢方生薬から、細胞毒性の少ない細胞増殖抑制物質の探索研究を進めてきた。

本論の第一章では、漢方生薬における活性物質のスクリーニングおよびPaeoniflorigenone(以下 PFG)の単離と構造決定について述べる。がん細胞を用いたスクリーニング系を構築し、90 種の薬用植物について検討した結果、19 種の粗抽出物にやや強い細胞増殖抑制活性を確認した。19 種の生薬の粗抽出物を用いて細胞毒性を測定して、細胞毒性 IC_{50} と細胞増殖抑制 IC_{50} の比を指標に活性を評価した結果、牡丹皮の抽出物が最も強い活性を示した。そして、牡丹皮の抽出物からボタン科植物特有成分である PFG を活性物質として単離・同定できた。

本論の第二章では、PFG の抗腫瘍活性評価について述べる。3 種類のがん細胞と 2 種類の正常細胞を用いて PFG の増殖抑制活性を評価した結果、PFG は全ての細胞株に対して細胞増殖抑制活性を示した。また、がん細胞のみに対して、カスパーゼ 3 依存的なアポトーシスを誘導した。さらに、ヒトがん細胞パネルスクリーニングの結果により有効濃度はやや高いが、特定のがん種またはいくつのがん細胞株に対し顕著な有効性が見られた。また、PFG は低酸素誘導因子 HIF を誘導した。COMPARE プログラムにより、PFG の Finger Print をデータベース中の既存の抗がん剤全てと比較した結果、似た Finger Print のものがないため、PFG が新規作用機序を持つことが示唆された。次に、PFG の構造活性相関を調べた結果、ケージ構造を崩れると抗腫瘍活性が失うことと、ケトン基が還元されると活性が大幅に減少することが明らかになった。

本論の第三章では、PFG の細胞増殖抑制機序について述べる。正常細胞とがん細胞において、PFG 処理による細胞形態の肥大扁平化を糸口として、細胞周期停止、細胞老化誘導、DNA 二本鎖切断効果および活性酸素産生などの活性を評価した。その結果、1．PFG は正常細胞が早期老化を誘導することで細胞増殖を抑制すること。2．PFG はがん細胞の細胞分裂を阻害することでアポトーシスを誘導すること。3．PFG は細胞 DNA 損傷を引き起こしたが、その原因は PFG による活性酸素の過剰産生ではないこと。4．PFG は活性酸素消去能を持つことが判明した。これらの結果から、PFG の細胞増殖抑制メカニズムについて仮説を立てた。

本研究で得られた知見は、PFG は新規の抗腫瘍作用機序を持つニューリードであることを示唆した。将来、がん細胞分裂阻害機構および正常細胞早期老化機構の解明の重要な基盤になるものと期待される。

序論

植物は古代からエジプト、中国、インド、そしてギリシャで医薬品として重宝されてきた[1]。紀元前26世紀のシュメール人とアッカド人は植物が薬として使った最初の記録を残した[2]。エーベルス・パピルス(Ebers Papyrus)は古代エジプト医学パピルスとして、紀元前1550年頃に書かれて、700程の調和法と治療薬が記かされている。中国本草(CMM: Chinese Materia Medica)に関する記録は紀元前1100年頃までに追溯できる[3]。インドのススルタとチャラカに記録されたアーユルヴェーダシステム(Ayurvedic system)は、紀元前1000年頃のものである[4]。ギリシャ人もハーブ薬の開発に大きく貢献した。 ギリシャの医師(西暦100年)であるDioscoridesは、彼の作品「De Materia Medica」で600を超える薬用植物について説明していた[5]。植物を使う治療法は4つの基本的なシステムに分類できる：中薬(Chinese Herbal Medicine)[6]、アーユルヴェーダシステム[7]、ギリシャとローマからヨーロッパに伝わりその後南北アメリカに広まった西洋薬草[8]、およびアラブ伝統薬[9]。世界保健機関(WHO)の推定によると、世界の住民の約80%がこれらの伝統医学に依存している[10]し、現在1/4の処方に植物由来の1個以上の有効成分が含まれている[11]。

がんは、世界中の死亡率と罹患率の主な原因の1つである。2017年、アメリカで1,688,780の新しい癌症例と600、920のがんによる死亡者が発生した[12]。日本では1981年以来、がんは死因の第1位の疾病となり、2017年では386,354人ががんにより死亡した[13]。2030年の世界中のがん患者数は2100万人と推定されている[14][15]。現在がんの治療法として、基本的に外科治療、化学療法と放射線療法が挙げられる。転移していない早期がんは手術、放射線および重粒子・陽子線などの局所療法で治療できる。ところで、転移した進行がんについては、局所療法では転移した微小がんに対応できないため、殺細胞性の抗がん剤を使う化学療法が基本となる。また、さまざまな種類のがんの発生率の増加により、新しい抗がん剤が必要になる。

抗がん剤の開発のために、研究者たちは抗がん効果を示す生物の二次代謝物(天然物)に着目してきた[16][17]。植物、微生物と海洋生物に由来する天然物リード化合物が抗がん作用の研究に用いられており、多くの天然物もしくはその誘導体に抗がん活性が確認できた。植物はがんの治療に長い間使用されてきて[18]、世界中で3000種以上の植物が抗がん活性を持っていて[19][20]、これまでに約30種の植物由来化合物ががんの臨床試験に進んでいる[21]。1950年代のビンカアルカロイド(vinblastineとvincristine)とポドピロトキシンの発見[22]を契機に、アメリカ国立がん研究所(NCI)は1960年代から20か国から約35,000の植物サンプルを収集し、抗がん活性について約114,000の抽出物をスクリーニングした[23]。その結果、タキソールとカンプトキシンなど新規リード化合物が発見され、抗がん剤の臨床開発へ用いられた[24]。 1983年以前に米国で市

販されていた 92 種類の抗がん剤および、1983 年から 1994 年にかけて世界的に承認された抗がん剤のうち、60%が天然物由来である [25]。

現在使用されている抗がん薬は、いずれも DNA 複製やチューブリンの重合・脱重合などの細胞分裂に必須な機能を阻害することにより抗がん活性を発揮する [26]。例えば *Streptomyces peucetius var. caesius* の培養濾液中から発見された Anthracycline 系の抗腫瘍性抗生物質 Adriamycin および、キョウチクトウ科ニチニチソウから分離したビンカアルカロイドのビンブラスチンは 1966 年と 1963 年に抗がん剤として開発されて以来、多くの種類のがんに対して用いられた [27]。Adriamycin は、トポイソメラーゼ II(Top2)の阻害作用 [28]、DNA の塩基対間に挿入による DNA/RNA の合成阻害 [29] [30] や、活性酸素種の産生 [31]などの機序で抗がん作用を発揮する。また、ビンブラスチンはチューブリンの集合を妨害することで微小管の伸長を阻害 [32]することにより抗がん作用を発揮した。これらの抗がん剤の標的となるたんぱく質は、正常細胞とがん細胞において共通に存在し、生存に必須の基本的な機能を担っている。従って、抗がん剤はがん腫瘍を攻撃すると同時に、患者の正常臓器に大きなダメージを与えてしまい、感染症、貧血と脱毛などの副作用が引き起こす。患者の QOL 向上のために、現行の抗がん剤より細胞毒性が低い抗がん物質を自然界に求める動きが再び活発になっている [33]。天然物はより生物学的に友好的であり、その結果、標的部位と共進化し、正常細胞に対する毒性が低いとみなされているため、がん化学療法でますます注目を集めている [34]。過去 20 年間で、多くの先進国は厳格な法律と監視の下での薬草療法を補完代替医療として広く受け入れられてきた [35]。

中薬(CHM: Chinese Herbal Medicine)と針鍼、推拿、食事療法、太極拳、および気功は中国伝統医学(TCM: Traditional Chinese Medicine)の主要な治療手段となる [36]。中薬は、中国本草(CMM: Chinese Materia Medica)と呼ばれる何千もの薬用物質による処方で構成されている。中国本草(CMM)は主に植物と一部の鉱物および動物性物質から構成されている [37]。中国の臨床診療では、200~600 の CMM がルーチン的に処方に使われている [38]。CHM 処方は、CMM を組み合わせて使用することで、それらの利点を高め、同時に副作用を減らせる。また、CHM は様々な有効成分間の相乗的相互作用により、抗がん剤/放射線療法の効力を高める、正常細胞と組織に対する抗がん剤/放射線療法による傷害を回避できる、感染合併症を削減できる、および免疫力を高めるなどの利点が挙げられる [39]。このように、いくつかの CHM は顕著な抗がん効果を示し、がん治療を補う可能性があることが研究により示されている [39] [40]。例えば、PHY906 と呼ばれる CHM 処方は、胃腸系症状を治療する「黄ごん湯」(組成：黄ごん、芍薬、甘草、大棗)を理論的に再構成し、当初抗がん剤における胃腸の副作用を軽減すること

に成功した。動物試験で PHY906 とイリノテカンまたはカペシタビンを併用し、抗がん作用が相乗的に高まった結果から、PHY906 は癌に対する免疫応答を起こすことで化学療法の効果を増大させる可能性が示唆された [41] [42]。

抗がん CHM のメカニズムに関する研究の大部分は、CHM 由来の純粋な化合物を対象として取り組んでいる。混合物である単一の薬草の抽出物や CHM 製剤を対象となる研究例が比較的少ない。抗がん CHM のメカニズムは大きく分けて 3 種類：１．トポイソメラーゼの阻害と DNA 複製の阻害、２.アポトーシスの誘導、３．腫瘍細胞の形質転換表現型の維持に必要なシグナル伝達経路の変更(血管新生阻害、分化誘導など)がある [39]。いずれかのメカニズムによりがん細胞を直接殺すことになる。CHM 由来の純粋な化合物または粗抽出物を対象の細胞と動物を用いた研究は、CHM の抗がん活性の強力な分子的証拠を提供した。抗がん CHM は現行の抗がん剤と比べて、抗がん作用の潜在的な新規メカニズムが関与している可能性がある。例えば、子宮頚がん、膀胱がん、腎がんの治療のために使う CMM 粉萆薢(*Dioscoreae Hypoglaucae* Rhizoma)について、2002 年に粉萆薢由来のグリコシド protodioscine の抗がん効果について研究を行われた。アメリカ国立がん研究所 NCI の 60 種ヒトがん細胞パネルを行った結果、子宮頚がん細胞、膀胱がん細胞および腎がん細胞に特に有効であることが判明した [43]。さらに、COMPARE プログラムの解析により protodioscin 独特な細胞毒性パターンを有し、NCI の抗がん剤データベースに細胞毒性パターンが類似な化合物が存在しなかった。この結果から、新規な抗がんメカニズムの存在、そして COMPARE プログラムの有用性が示唆された。

主な抗がん CHM または CHM 由来の化合物は、がん細胞のアポトーシスを誘導することで抗がん作用を発揮する [39]。一方、霊芝や松茸など細胞毒性がない CHM にも潜在的に抗がん活性が期待されている。Ras 遺伝子の focus formation assay を用いてがん化細胞への影響を調べた研究では、霊芝や松茸の抽出物はがん化細胞の増殖を強く抑制できた。興味深いことに、この抑制効果は、直接がん化細胞を殺すことからもたされた結果ではなく、周囲の正常細胞に何らかの作用を発揮したと思われた [44]。この様に正常細胞に作用点を持つ化合物は、他にアカネ科植物のフタバムグラ(白花蛇舌草)から単離されたオレアノール酸が知られている [45]。まだどの様な抗がんメカニズムがあるかは不明だが、少なくともアポトーシスではないことが明らかになった。

以上のことをふまえて、本研究では、中国本草から細胞毒性が低い細胞増殖抑制物質の探索を行うとともにその作用機序の解明に取り込むこととした。

本論

第一章

漢方生薬に由来する細胞増殖抑制物質の探索

第一節　90 種生薬粗抽出物の細胞増殖抑制活性

漢方生薬を研究対象として、抗がん作用を示す活性物質の探索を行った。2013 年に中国の薬局で消炎鎮痛作用のあるものを中心に、90 種類の生薬を 10 g ずつ購入した(表 1、表 2)。これら 90 種類の生薬について、それぞれを乳鉢で粉砕した後に 70%EtOH 水溶液で抽出した。抽出液を濾過して溶媒を留去し、それぞれの粗抽出物を得た。各粗抽出物のヒト骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞増殖抑制活性を MTT アッセイ法で評価した。90 種類生薬は 50%細胞増殖抑制濃度 IC_{50} を 0~50、50~200、200 μg/mL 以上の三群(表 1、表 2)に分けた。表 1 に表した生薬は全て、消炎、止痛または収斂止血いずれの効果があるものであった。

次に、IC_{50} が 0~50 μg/mL の生薬(19 種)の細胞毒性を Trypan Blue 染色で評価した。50%細胞毒性濃度 IC_{50} を分子、50%細胞増殖抑制濃度 IC_{50} を分母に計算した Ratio of IC_{50} を指標に、19 種生薬の低毒性且つ増殖抑制活性を評価した。その結果、牡丹皮(Moutan cortex)が最も強い活性を示した。

牡丹皮はボタン科*Paeonia suffruticosa* Andrewsの根皮の乾燥したものである(図 1)。牡丹皮は、鎮痛剤、鎮静剤、および抗炎症剤であり、心血管障害、溢血性疾患、および女性生殖器疾患の治療薬として使用されてきた [46] [47] [48] [49]。牡丹皮の主要な活性成分として、paeonol以外に、paeoniflorin、oxypaeoniflorinおよびbenzoyl paeoniflorinなどのモノテルペンが知られている [50]。

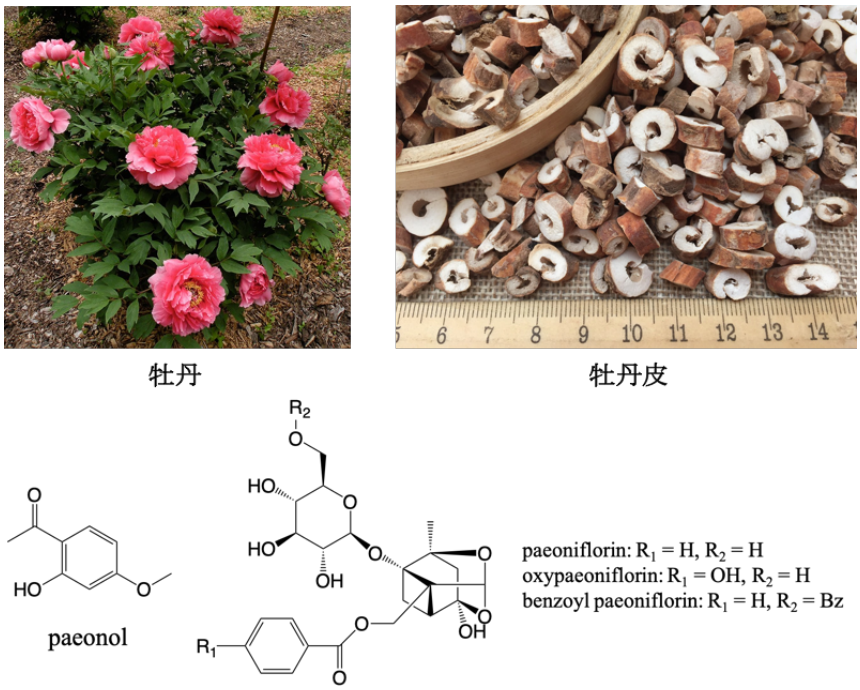


図 1　Moutan cortex の原植物(上左)、生薬形態(上右)および活性成分(下)

表 1　低毒性＆抗腫瘍活性を示した生薬

Sample(群 1)	増殖抑制 IC_{50} (MTT)	細胞毒性 IC_{50} (Trypan blue)	Ratio of IC_{50}
Moutan cortex	12.3±1.5	142.0±10.4	11.5
Rubia cordifolia	12.2±0.7	127.0±10.1	10.3
Cornu cervi degelatinatum	18.9±2.5	100.6±8.7	5.5
Centipeda minima	29.2±6.8	85.2±4.2	3.0
Isatis indigotica	28.4±3.5	71.7±2.5	2.5
Magnolia officinalis	12.0±3.0	26.3±3.2	2.2
Curculigo orchioides	31.3±0.6	68.2±8.5	2.2
Imperata cylindrica	28.4±2.9	57.3±2.5	2.0
Dioscorea hypoglauca	3.5±0.5	6.7±0.5	1.9
Lithospermum erythrorhizon	3.3±0.5	6.1±0.4	1.8
Ephedra sinica	27.0±4.4	40.7±3.8	1.5
Salvia chinensis	32.0±3.0	48.0±7.0	1.5
Nepeta cataria	13.3±1.5	19.3±2.1	1.5
Coptis chinensis	3.1±0.6	4.4±0.6	1.4
Ligusticum chuanxiong	34.7±5.0	48.2±2.0	1.4
Trigonella foenum-graecum	4.2±0.3	5.3±0.6	1.3
Tetradium ruticarpum	2.2±0.3	2.22±0.3	1.0
Eucommia ulmoides	31.3±7.6	24.3±5.5	0.8
Picrorhiza scrophulariiflora	2.3±0.8	1.6±0.4	0.7

MTT 法および Trypan Blue 法による評価した細胞増殖抑制活性、IC_{50} が 50 μg/mL 以下の 19 種生薬の細胞毒性を Trypan Blue 法で評価した。結果は Ratio of IC_{50} を指標に並び替えた。

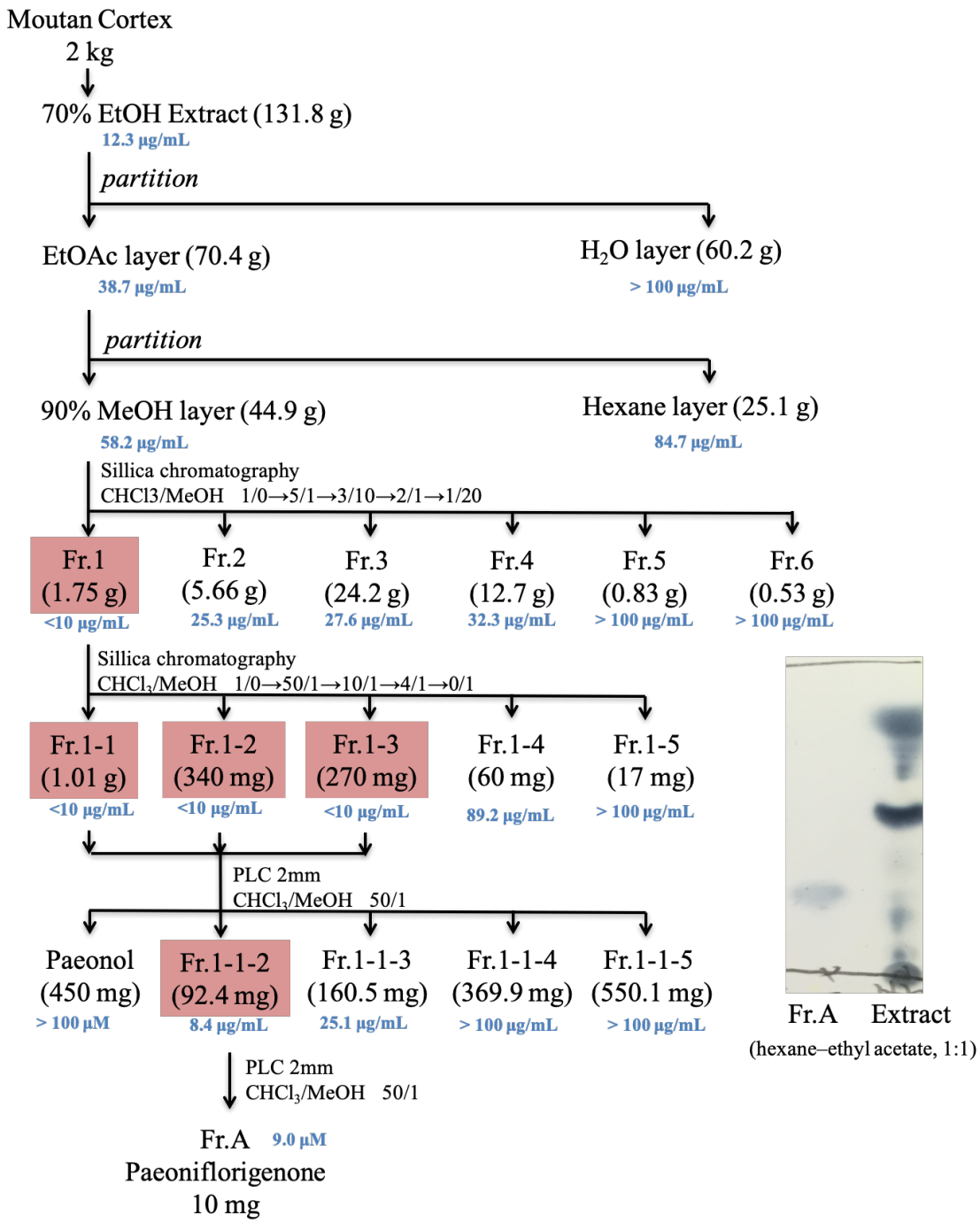
表 2　増殖抑制活性が微弱な(左)及び無い(右)生薬

Sample(群 2)	IC_{50}(μg/mL)	Samples (IC_{50} > 200 μg/mL、群 3)	
Leonurus artemisia	50.5±4.1	*Equisetum hyemale*	*Euryale ferox*
Pinellia ternata	51.3±3.2	*Panax notoginseng*	*Rehmannia glutinosa*
Asarum sieboldii	52.0±2.6	*Imperata cylindrica*	*Radix Asparagi*
Cornus officinalis	57.7±9.1	*Cyperus rotundus*	*Fritillaria cirrhosa*
Houttuynia cordata	61±9.2	*Achyranthes bidentata*	*Fructus Mori*
Atractylodes lancea	65.7±4.7	*Angelica sinensis*	*Tuber Onion Seed*
Chrysanthemum	68.0±5.6	*Celosia cristata flower*	*Cynomorium songaricum*
Pseudolarix kamepferi Gord	72.3±15.6	*Lonicera japonica*	*Coix lachryma-jobi*
Glehnia littoralis	73.7±11.9	*Sanguisorba officinalis*	*Isatis tinctoria*
Silktree Albizia Bark	74.0±4.6	*fritillary*	*Epimedium brevicornu*
Aconitum carmichaelii	74.3±2.1	*RadixStellariae*	*sliced deerhorn*
Daphne genkwa	75.0±6.0	*Gizzard*	*Phellodendron chinense Schneid.*
Sesamum indicum	76.2±5.9	*Broussoneria papyrifera fruit*	*Ophiopogon japonicus*
Dipsacales	78.0±2.0	*Poria cum Radix Pini*	*Garden Balsam Seed*
Serissa foetida	80.7±3.1	*Stamen nelumbinis*	*Fraxinus chinensis*
Cyrtomium Rhizome	83.7±6.0	*Fallopia multiflora*	*Xanthium sibiricum*
Spatholobus suberectus	86.3±5.5	*Rehmannia glutinosa Libosch*	*Dried Longan Pulp*
Cynanchum atratum	86.7±5.1	*Lycium barbarum*	*Glycyrrhiza uralensis*
Vaccaria pyramidata seed	87.3±7.6	*Astragalus complanatus Bunge*	*Adenophora tetraphylla*
Aconitum carmichaeli	91.3±5.7	*Semen pruni*	*Pueraria lobata*
Bletilla striata	122.7±11.0	*Lotus Leaf*	*Zizyphus jujuba*
Cimicifuga simplex	158.3±10.4	*Fritillaria thunbergii*	*Lilium brownii*
Sophora flavescens	166.0±11.1	*ostrea gigas thunberg*	*Paeonia lactiflora*
Lonicera japonica	187.7±6.7	*Magnolia officinalis flower*	

MTT 法による評価した細胞増殖抑制活性、IC_{50} が 50 μg/mL 以上の 71 種生薬を 2 群に分類した。

第二節　牡丹皮に含まれる細胞増殖抑制物質の単離

前節の活性試験で最も高い活性を示した牡丹皮(表 1)に含まれる細胞増殖抑制物質について、ヒト骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞増殖抑制活性を指標に単離することを試みた(スキーム 1)



スキーム 1

2 Kg の牡丹皮(Moutan Cortex)から得た 70%EtOH 抽出物をスキーム 1 のように水と酢酸エチルで分配した後、酢酸エチル画分をさらに 90%MeOH 水溶液とヘキサンで分配し、各画分のヒト骨髄性白血病細胞 HL60 に対する細胞増殖抑制活性を MTT アッセイで評価した。酢酸エチル画分と 90% MeOH 画分は 70%EtOH 抽出物より活性が弱かった。90% MeOH 画分を順層シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより 6 画分に分離したところ、Fr.1 に 70%EtOH 抽出物より強い活性を確認できた。Fr.1 を再度順層シリカゲルカラムクロマトグラフィーで 5 画分に分離したところ、Fr.1-1、Fr.1-2、Fr.1-3 に強い活性を確認できた。この 3 画分をまとめて PLC による分離と精製を進めた結果、強い細胞増殖抑制活性を示す無色油状物質として化合物 A 10 mg を単離した。また、牡丹皮に特有成分 Paeonol 450 mg も単離した。

第三節　細胞増殖抑制活性物質 A の同定

単離した活性物質 A の構造解析を行った。活性物質 A の分子式は、高分解能質量スペクトル([M+H]$^+$, *m/z* 319.1171, calcd for 319.1182)より $C_{17}H_{18}O_6$ であることがわかった。また、旋光度$[\alpha]_D$ + 6.3°(c = 4.5, MeOH)であった。

次に、各種 NMR スペクトルの解析を行なった。活性物質 A の平面構造は、^{1}H-NMR および HMQC の解析により、メチル基が 1 個(δ_H 1.31 (s, 3H))、メチレンが 2 個(δ_H 2.21, 2.38 (each dd, J = 13.6, 2.4 Hz, 1H) と 2.68 (q, J = 14.5 Hz, 2H))、メチンが 2 個(δ_H 2.38–2.41 (m, 1H) と 2.90–2.91 (m, 1H))、オキシメチレンが 1 個(δ_H 4.05 and 4.38 (each dd, J = 11.6, 5.6 Hz, 1H))、アセタールが 1 個(δ_H 5.47 (s, 1H))およびベンゼン環が 1 個(δ_H 7.41–8.19 (m, 5H))存在することがわかった(図 2)。また、^{13}C-NMR スペクトルにおいては、メチル炭素のシグナル 1 本(δ_C 21.27)、 メチレン炭素のシグナル 3 本 (δ_C 34.32, 46.93, 62.70)、 メチン炭素のシグナル 3 本 (δ_C 43.15, 46.39, 99.82)、 四級炭素のシグナル 2 本 (δ_C 78.69, 101.77)、 ベンゼン環炭素のシグナル 4 本 (δ_C 128.56, 129.76, 129.85, 133.33)、 エステルカルボニルのシグナル 1 本 (δ_C 166.25) および ケトン炭素のシグナル 1 本 (δ_C 209.65)、計 15 本のシグナルが観察された(図 3)。

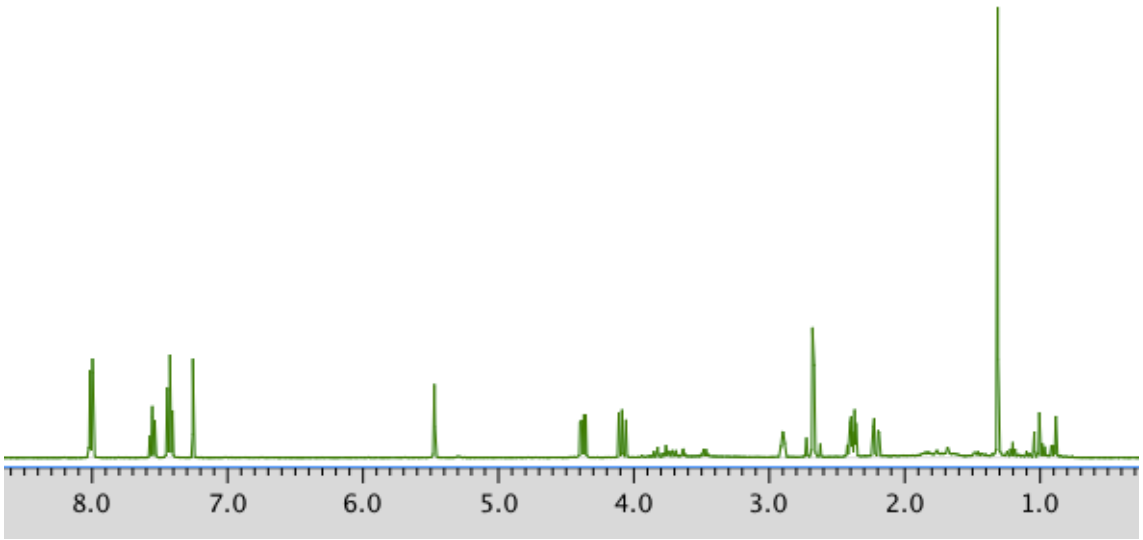


図 2　活性物質 A の ^{1}H-NMR スペクトル(500 MHz、 $CDCl_3$)

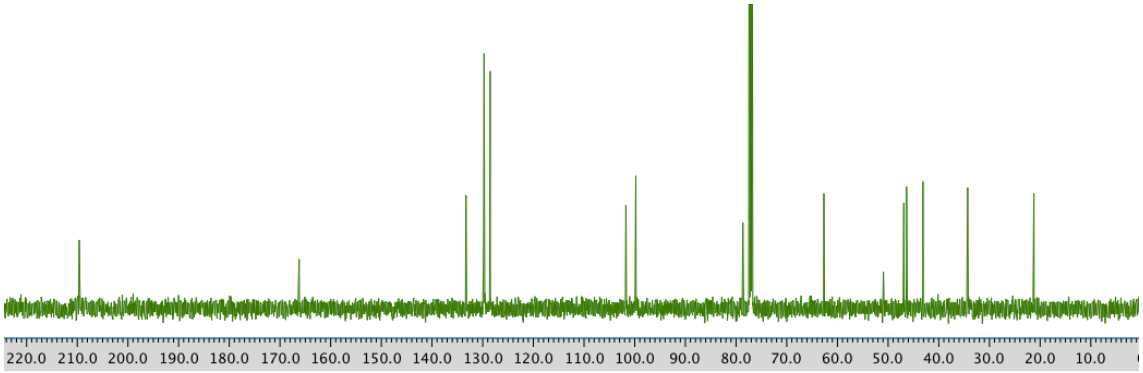


図 3　活性物質 A の ^{13}C-NMR スペクトル(500 MHz、 $CDCl_3$)

これらのスペクトル結果は Shimizu M らが 1983 年に生薬の芍薬から新規に単離同定した Paeoniflorigenone [51]と完全に一致した。

以上の結果から活性物質AはPaeoniflorigenone(PFG)と同定した(図 4)。

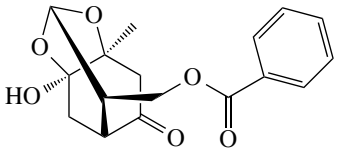


図 4　活性物質Paeoniflorigenoneの構造式

PFG は多数の牡丹科植物に含まれ [51] [52] [53] 、カエルとマウスに対する神経筋遮断効果 [54]および N9 ミクログリア細胞に対する細胞毒性 [55]があると報告された。ただし、メラノーマ M-14 細胞に対して細胞毒性を示さないことが報告されていた [53]。このように、PFG の生物活性についての研究が少なく、作用機序についても未解明であった。本研究において、PFG の細胞増殖抑制活性評価と構造活性相関(第二章)と続く作用機序研究(第三章)に着手することとした。

第二章

PFG の抗腫瘍活性の評価

第一節　正常細胞とがん細胞に対する抗腫瘍活性

PFG について、がん細胞のヒト骨髄性白血病細胞 HL60、ヒト子宮頚がん細胞 HeLa、ヒト T 細胞性白血病細胞 Jurkat と正常細胞のヒト正常二倍体線維芽細胞 TIG-1 およびマウス線維芽細胞 3T3-L1 に対する細胞増殖抑制活性(MTT)および細胞毒性活性(Trypan Blue)を評価した(図 5)。72 時間各濃度 PFG で処理した 5 種類の細胞について、正常細胞よりがん細胞の方が高い感受性を示した。また、3 種類のがん細胞の中、浮遊細胞の HL60 と Jurkat が特に高い感受性を示した(図 5)。

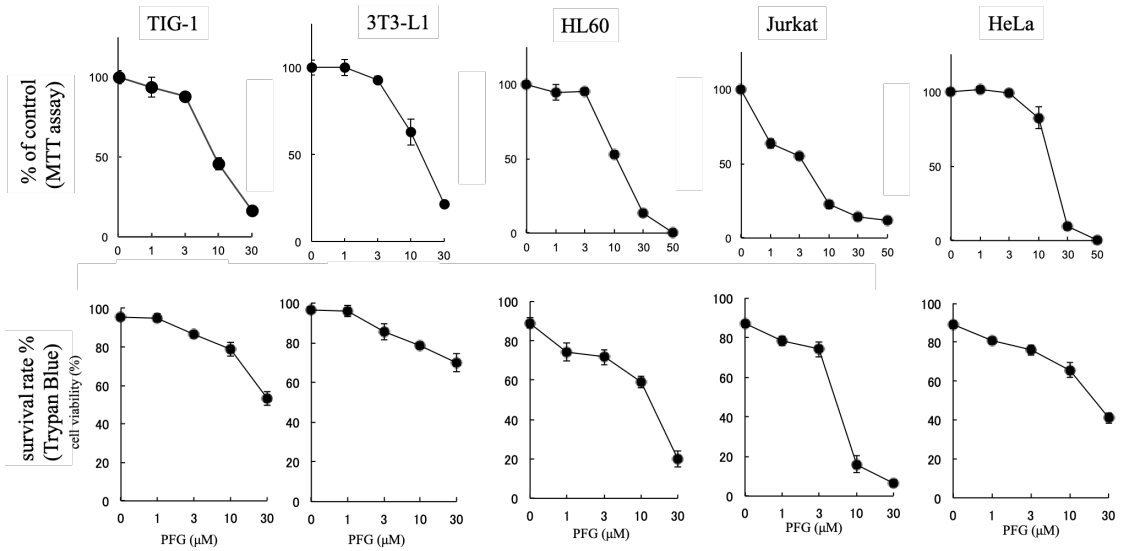


図 5　5 種細胞に対する PFG の増殖抑制活性(上)および細胞毒性(下)

次に、PFG で処理した 0 時間、24 時間、48 時間、72 時間時の細胞増殖の様子を MTT アッセイで評価した。0 時間目の細胞数を 100%に、各濃度および各時間の増殖倍数を図 6 に示した。30 μM PFG により、正常細胞(TIG-1、 3T3-L1)は 48 時間から細胞増殖(cell proliferation rate)が減少し始めた。一方、がん細胞(HL60、 Jurkat、 HeLa)は 24 時間処理した時細胞増殖がすでに大幅に減少していたが、48 時間から微弱な「細胞増殖」の回復が観察された。ここの「細胞増殖」は MTT 法で測定した吸光度の値の計算により得られた数値である。MTT 法では細胞の呼吸を指標に細胞数と対応させるので、場合によって、大きな細胞は小さな細胞より細胞呼吸が強く、MTT 法により大きな値を得られる。今回観察された「細胞増殖の回復」は第三章の「がん細胞の細胞分裂が阻害され、細胞のサイズが約２倍になった」結果と合致した。

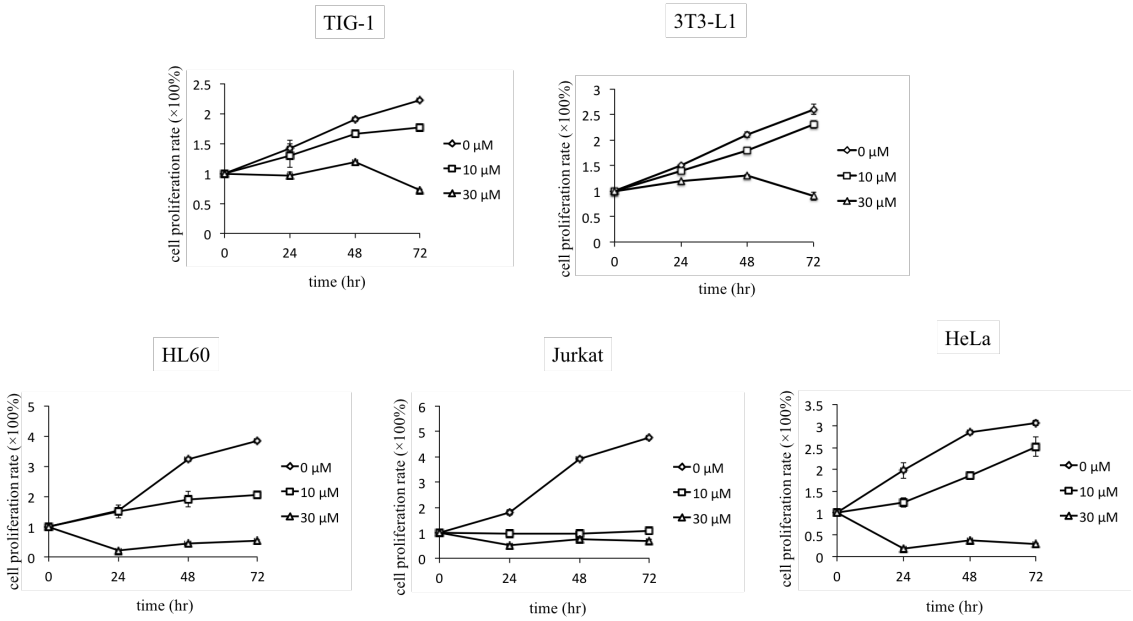


図 6　時系列における PFG の増殖曲線

単離した PFG はがん研究会がん化学療法センターの協力により、39 種のヒトがん細胞に対するパネルスクリーニング(JFCR39 [56])が行われた。その平均 IC_{50} は 14.1 μM とやや高いが、いくつのがん種細胞株(ヒト卵巣がん細胞 SK-OV-3 (GI50: 2.24 μM)、ヒト前立腺がん細胞 PU-145 (GI50: 4.68μM)およびヒト腎腺がん細胞 ACHM (GI50: 4.79 μM))に対し顕著な有効性が見られた。次に、10 μM PFG のヒストン脱アセチル化酵素活性(HDAC)、上皮間葉転換(EMT)、アンドロゲン受容体(AR)および低酸素誘導(HIF)などの阻害活性を調べた結果、いずれも閾値を超えるようなポジティブの活性は確認できなかった。興味深いことに、低酸素誘導(HIF)の阻害効果を調べた実験では、低酸素条件下において、PFG の添加による HIF の発現量はコントロールの 232%になっており、PFG が HIF 誘導効果を持つことがわかった。

PFG で処理された各がん細胞の薬剤感受性プロファイルをデータベース上の抗がん剤を含む 100 種類以上の薬剤と比較(COMPARE プログラム)したところ、類似な薬剤がデータベース上にはないことから、PFG は新規の作用機序を持つことが示唆された。

第二節　がん細胞選択的なアポトーシス誘導活性

次に、PFG のアポトーシス誘導活性を評価した。アポトーシスが誘導されると、初期では細胞膜の変化、中期から後期に細胞質や核の凝縮、DNA ヌクレオソーム間の切断、最終的にアポトーシス小体への断片化、食細胞による除去が起こる [57] [58] [59]。

アポトーシス中期における核の凝縮と切断は、24 時間 PFG 処理した細胞を Hoechst 33342/PI 染色により観察した(図 7)。その結果、PFG 処理したがん細胞(HL60、Jurkat、 HeLa)において顕著な核の凝縮と切断が確認できた。一方、PFG 処理した正常細胞では、処理なしの細胞と同様な組織構造を示し、30 μM により死んだ細胞(赤く染色)においても、完全な核組織を有していた。

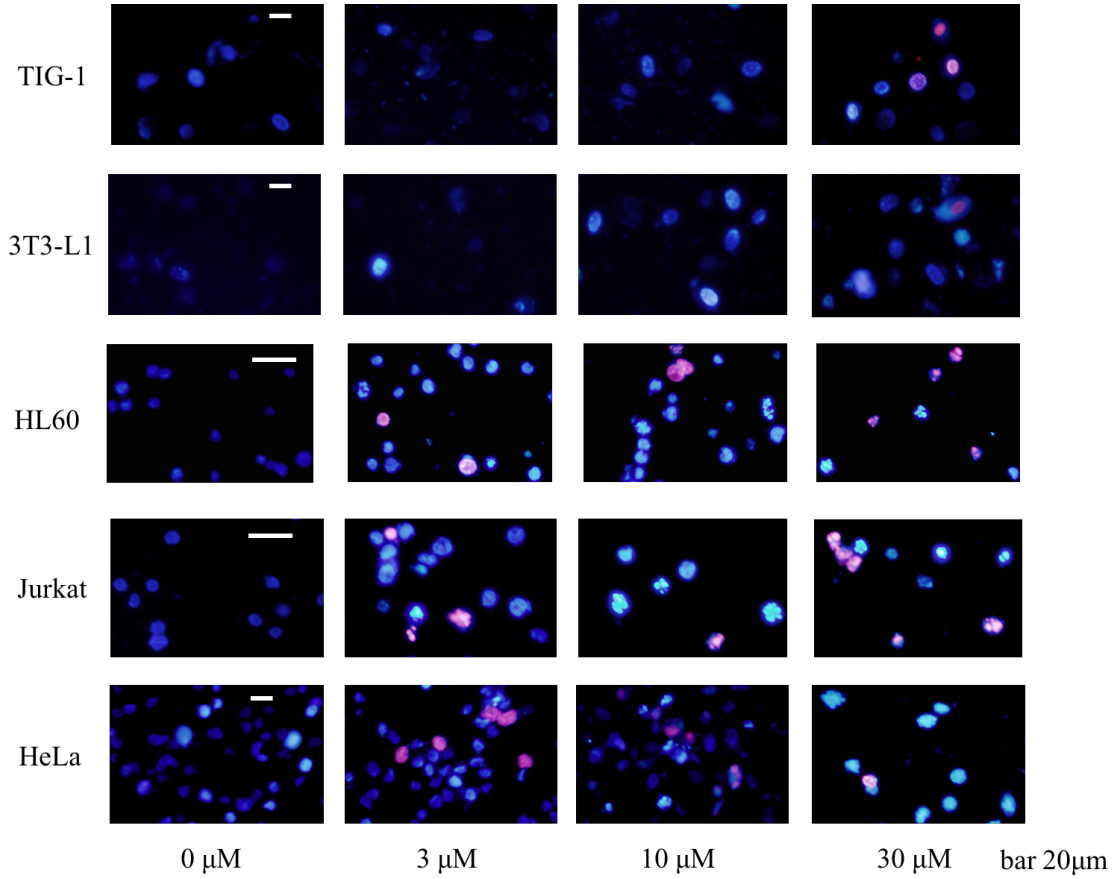


図 7　PFG によるがん細胞選択的の核の凝縮と断片化

細胞を各濃度の PFG で 24 時間処理し、Hoechst 33342/PI で染色した結果。

アポトーシス後期の細胞では、DNA 分解酵素である CAD(caspase-activated DNase)によりクロマチン DNA がヌクレオソーム単位で断片化され、断片化された DNA が ladder 状に検出される [60] [61]。そこで、５種の細胞に対して DNA ladder 解析を行った

結果、PFG 処理したがん細胞(HL60、 Jurkat、 HeLa)においては明瞭な DNA ladder が観察された。一方で、正常細胞(TIG-1、 3T3-L1)においては DNA の断片化が観測されなかった(図 8)。

以上の結果より、PFG はがん細胞選択的にアポトーシスを誘導することが明らかになった。

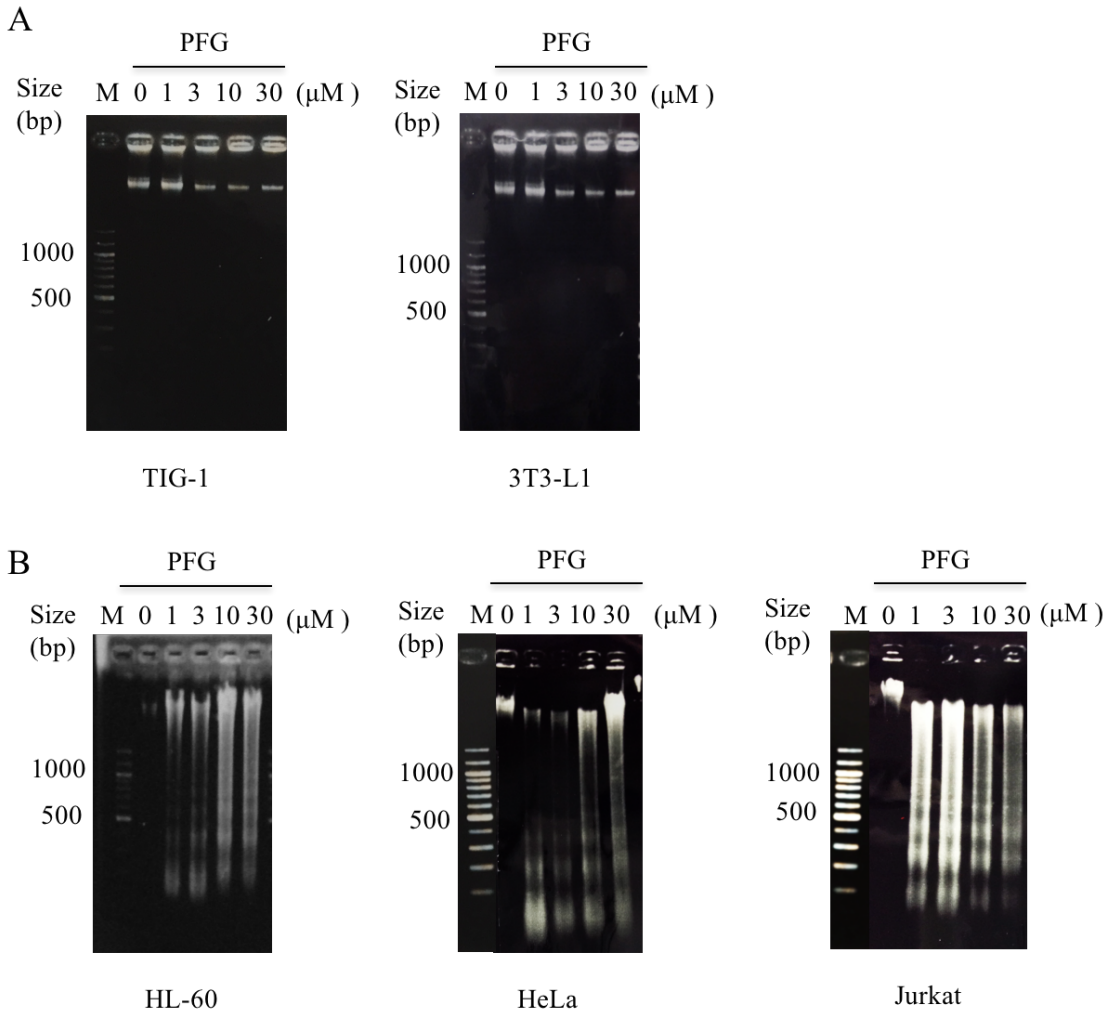


図 8　PFG によるがん細胞選択的の DNA の断片化

細胞を各濃度の PFG で 72 時間処理し、抽出した DNA を電気泳動した結果。(A)正常細胞(TIG-1 と 3T3-L1)の場合。(B)がん細胞(HL60、 Jurkat、 HeLa)の場合。

第三節　PFG による Csapase-3 の活性化

アポトーシスが起こる過程において、カスパーゼと総称される一連のプロテアーゼが中心的な働きをし、下流のカスパーゼを順に切断・活性により実行される [62]。そこで、全カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK を併用して PFG の Trypan Blue 細胞外排出試験を行った結果、3 種のがん細胞(HL60、 Jurkat、 HeLa)の細胞死は、いずれも Z-VAD-FMK により顕著に回避された。一方、2 種の正常細胞の細胞死は、カスパーゼ阻害剤により回避されなかった(図 9)。よって、PFG はがん細胞に対してカスパーゼ依存型の細胞死を引き起こすことがわかった。

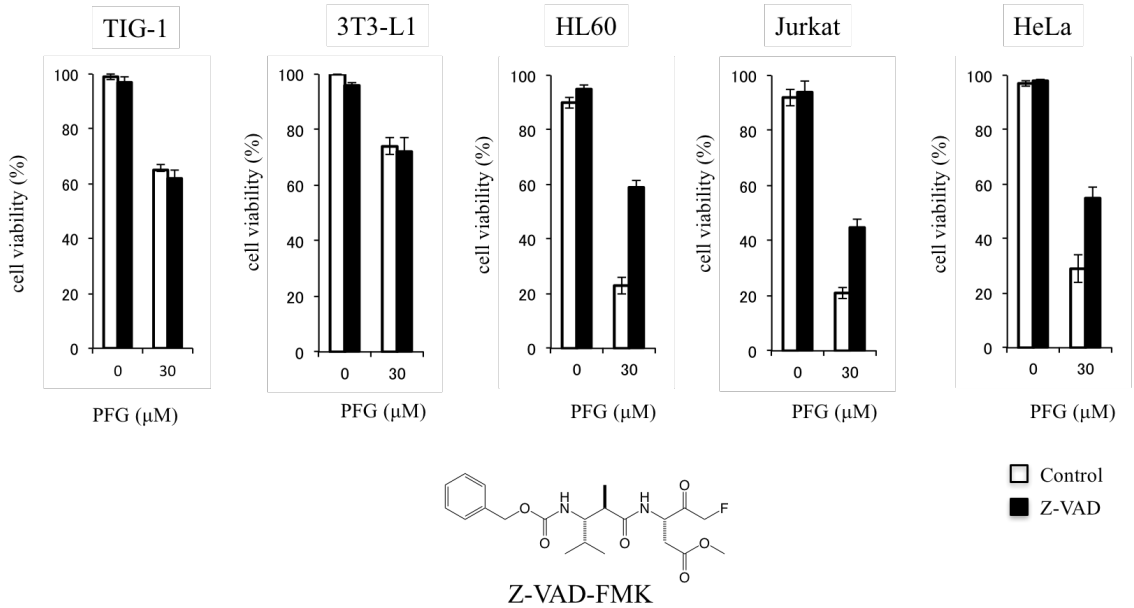


図 9　PFG が誘導するがん細胞選択的なカスパーゼ依存型の細胞死

PFGで処理後の細胞生存率(Trypan Blue染色)とZ-VAD-FMKの構造を共に示した。白抜き：30 μM PFGのみ 、黒抜き：25 μM Z-VAD-FMKによる30分前処理後にPFGで24時間処理。TIG-1のみを48時間PFG処理。

アポトーシスは、主に受容体媒介経路および細胞ストレス経路を介して誘導される。そして、2 つの経路はカスパーゼ-3 の活性化で合流する。活性化カスパーゼ−３は、DNA 修復酵素 PARP(poly(ADP-ribose) polymerases)を切断し、DNA 分解酵素 CAD を活性化することが知られており、それは修復することなく核 DNA 損傷をもたらし、アポトーシスを引き起こす [63]。ここで、NucView^{TM} 488 Caspase-3 Assay Kit を用いて、24 時間 PFG 処理後の 4 種ヒト細胞(TIG-1、 HeLa、 Jurkat、HL60)のカスパーゼ−３の活性を調べた。その結果、がん細胞(HeLa、 Jurkat、HL60)において、顕著な

カスパーゼ 3 の活性化効果が見られた。TIG-1 正常細胞においては、高濃度での微弱な活性増加が見られた(図 10)。

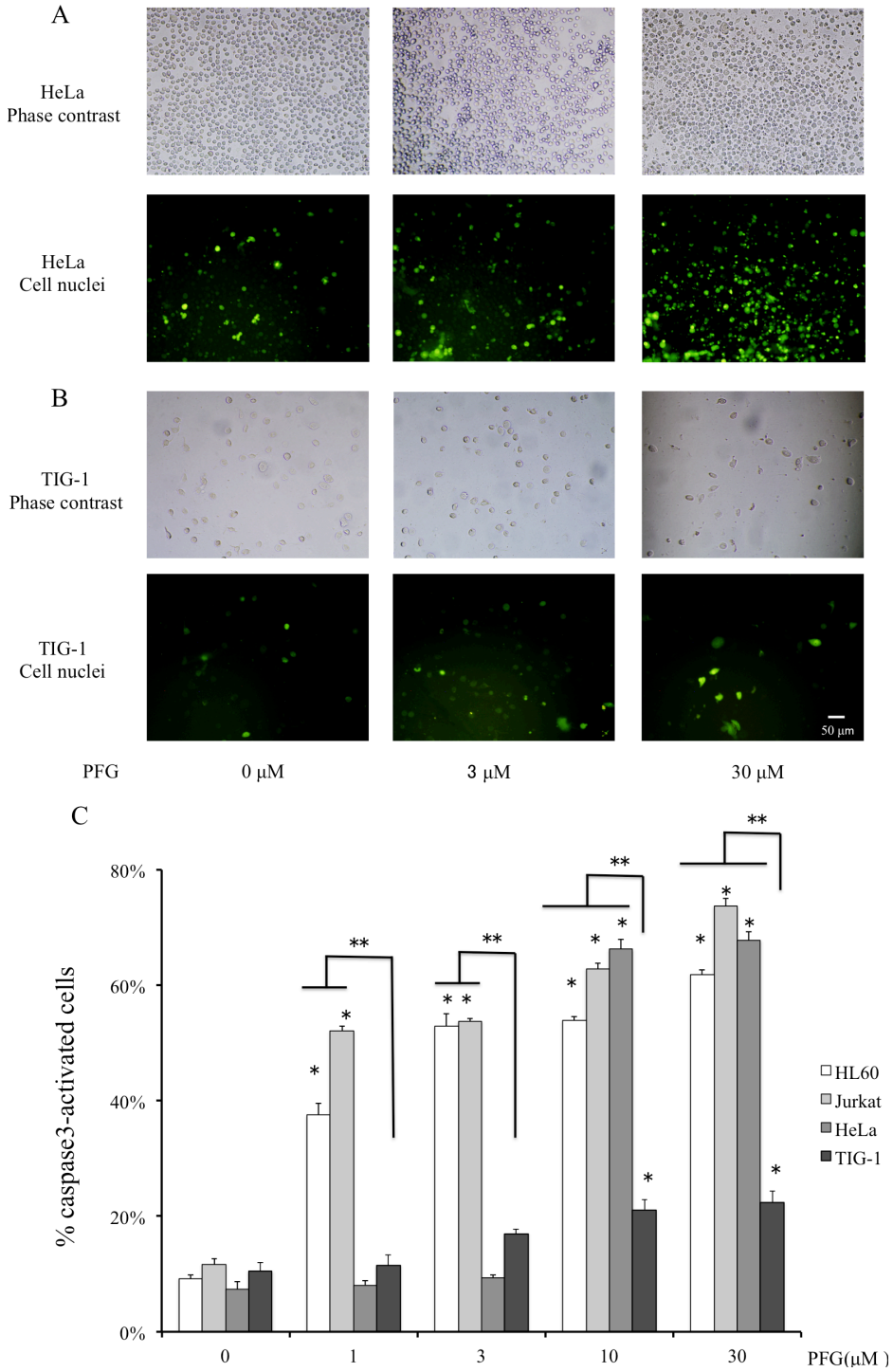


図 10　PFG のカスパーゼ−３の活性化効果

以上の結果より、がん細胞において、PFG はカスパーゼ 3 を活性化し、カスパーゼ依存型の細胞死を誘導したことがわかった。

第四節　PFG の構造活性相関

PFG は牡丹科植物特有なモノテルペン成分として、各種の牡丹および芍薬から単離されている。PFG と構造的に類似しているのは Paeoniflorin(以下 PF、図 11)が知られている。PF はモノテルペン配糖体であり、PFG と同じく立体的なケージ構造を有する。両者のケージ構造の違いは、PFG のアセタール基の二つの酸素 a、b は六員環の 4、3 位の炭素とそれぞれ結合するに対して、PF の場合では 4、6 位の炭素と結合すること、そして 6 位の酸素 d に PFG はケトン基、PF は水酸基であることである。また、PF の 3 位の酸素 c が糖と結合している。

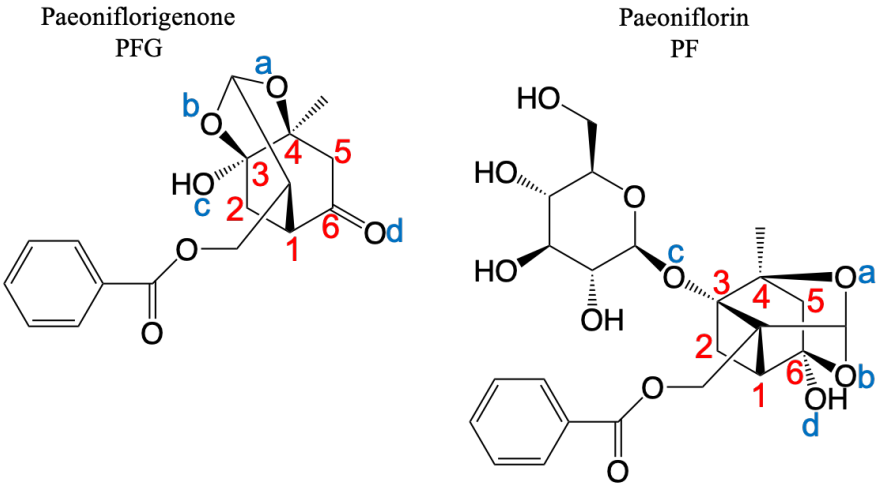


図 11　Paeoniflorigenone と Paeoniflorin の構造

PF は牡丹科植物の主要な薬用活性成分として、生物活性についてよく研究されてきた。PF の抗腫瘍効果についての研究では、肺がん細胞 A549 に対して強い細胞毒性 (IC_{50}：11.4 μM) [64]を示したが、ほとんどのがん細胞に対する IC_{50} は mM オーダーと弱い結果になった [65]。例えば、HeLa 細胞に対する IC_{50} は 5 mM である [66]。

一方、39 種のヒトがん細胞に対するパネルスクリーニングの結果(第二章第一節)により、PFG の平均 IC_{50} は 14.1 μM となり、A549 細胞に対して 100 μM 濃度では 38%の細胞増殖抑制効果を示し、39 種のヒトがん細胞の中で最も感受性が低かった。 HeLa 細胞に対する IC_{50} は 10.6 μM であった。よって、PFG の抗がん効果は PF よりはるかに上回っていることがわかった。その原因について一つは配糖体、もう一つはケージ構造の違いが考えられる。

PFG の構造活性相関を調べるために、**1**～**5** を合成し、HeLa 細胞に対する細胞増殖抑制活性を測定した(図 12)。

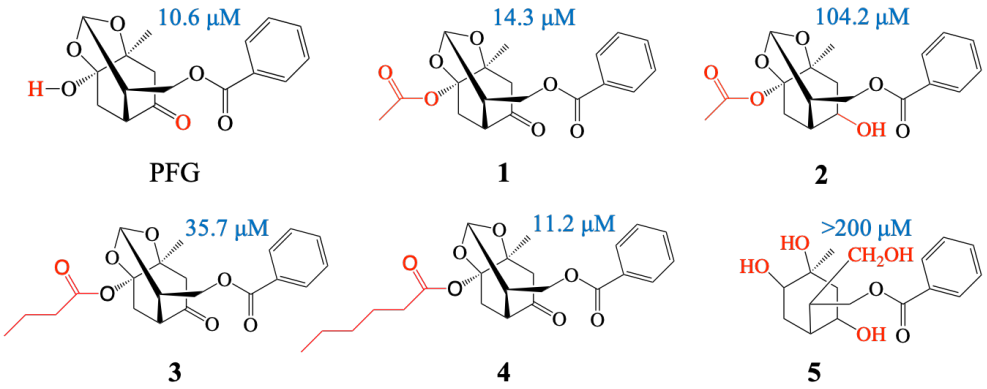


図 12　PFG と合成した誘導体の構造と IC_{50}(青)

その結果、PFG 類の構造活性相関は、HeLa 細胞に対する増殖抑制活性に顕著に現れている。**5** は還元反応によりアセタール基が崩れ、ケトン基は水酸基に還元され、細胞増殖抑制活性が失った。また、**1**、**3**、**4** はヘミアセタールの水酸基をアシル化したものである。**1**、**4** は PFG と同程度の活性を保持しており、**3** の活性は PFG より低かった。**3** の活性が弱い理由として水溶性が落ち、細胞への取り込みが低下であることが考えられる。**4** の活性が低下しない理由としては、側鎖が長くなって、細胞膜のリン脂質との親和性が良くなり、細胞内へ入りやすくなることが考えられる。一方、**2** は **1** のケトンを水酸基に還元し、その活性は PFG と **1** より 10 倍低い値であった。

以上より、PFG 類のケージ構造およびケトン基は細胞増殖抑制活性に重要であるという知見が得られた。

第三章

PFG の作用機序の検討

前章では、PFG は正常細胞とがん細胞の両方ともに細胞増殖抑制効果を示した。また、がん細胞において、PFG はカスパーゼ-3 経由のアポトーシスを誘導することで細胞増殖を抑制したことが明らかにした(図 13)。

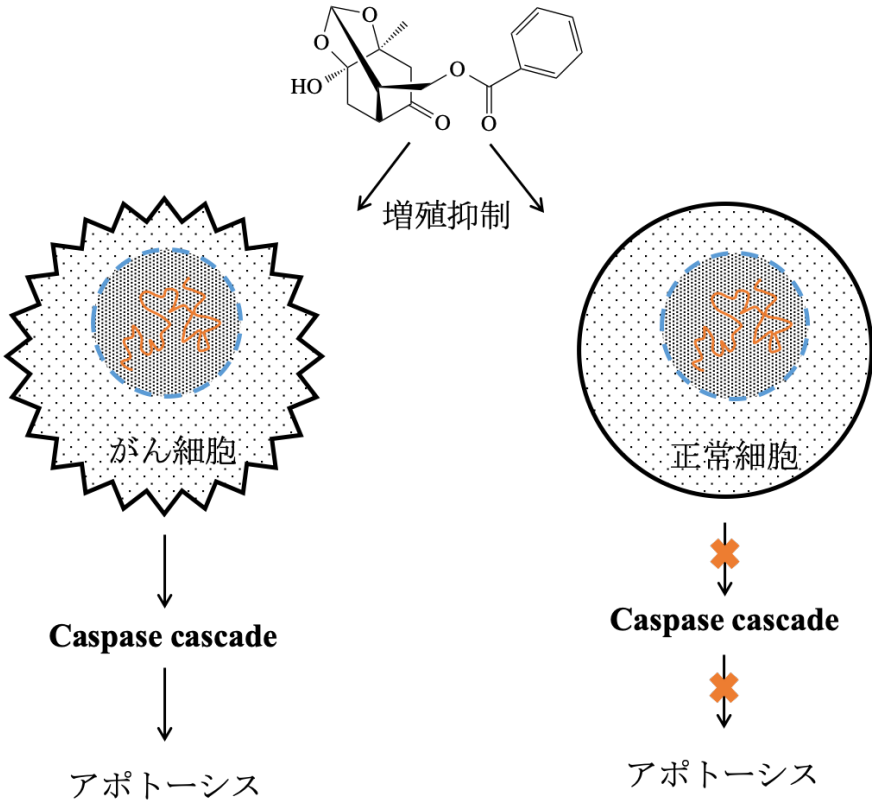


図 13　PFG の細胞増殖抑制効果模擬図

本章では、PFG の正常細胞における増殖抑制メカニズム、およびがん細胞におけるアポトーシス誘導機序について研究を行った。具体的に、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa とヒト正常二倍体繊維芽細胞 TIG-1 を対象に、細胞の形態、細胞周期、細胞 DNA 傷害応答について調べた。

第一節　細胞の形態変化

前章では、３種のがん細胞と２種の正常細胞について PFG の細胞増殖抑制活性を調べた結果、がん細胞は正常細胞より、PFG に対する感受性が高かった。浮遊がん細胞(HL60 と Jurkat)は接着がん細胞(HeLa)より PFG に対する感受性が高かった。また、浮遊細胞の培地と接着細胞の培地が異なり、実験の操作も若干違うので本章では、ヒト接着細胞である正常二倍体繊維芽細胞 TIG-1 と子宮頸がん細胞 HeLa を対象に研究を行った。

TIG-1 正常細胞と HeLa がん細胞における 0-50 μM PFG で 72 時間処理した後の細胞増殖抑制効果(MTT)とおよび細胞毒性(Trypan Blue)を調べた。TIG-1 と HeLa において、10-20 μM PFG は細胞毒性が低く、細胞増殖抑制効果が強かった(図 14)。

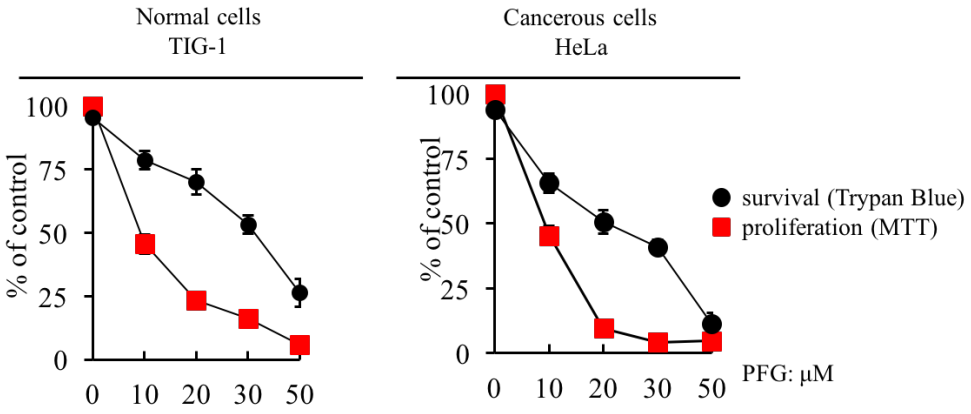


図 14　正常細胞(左)とがん細胞(右)における PFG の増殖抑制効果

次に、20 μM PFG で処理した細胞を顕微鏡で観察した。図 15-A に示すように、正常細胞 TIG-1 は PFG 処理により、コントロール細胞の光沢があり細長い形態から扁平かつ太短い形態への変化を観察できた。正常細胞 TIG-1 を浮遊させて観察してみると、目視で、PFG 処理した細胞のサイズはコントロールより多少大きかった(図 15-B)。懸濁した TIG-1 細胞をフローサイトメトリーで細胞サイズを測定した結果、確かに、PFG 処理した細胞の方が大きいことが分かった(図 15-C)。

がん細胞 HeLa は同様に、PFG 処理した場合には、接着時の肥大化および扁平化が観察された(図 16-A)。浮遊させた細胞サイズは顕著に増加した(図 16-B)、フローサイトメトリーの結果より細胞サイズは約 2 倍になることが明らかになった(図 16-C)。PFG の細胞増殖抑制効果および細胞の扁平肥大化効果より、細胞周期停止を引起した可能性を示唆した。

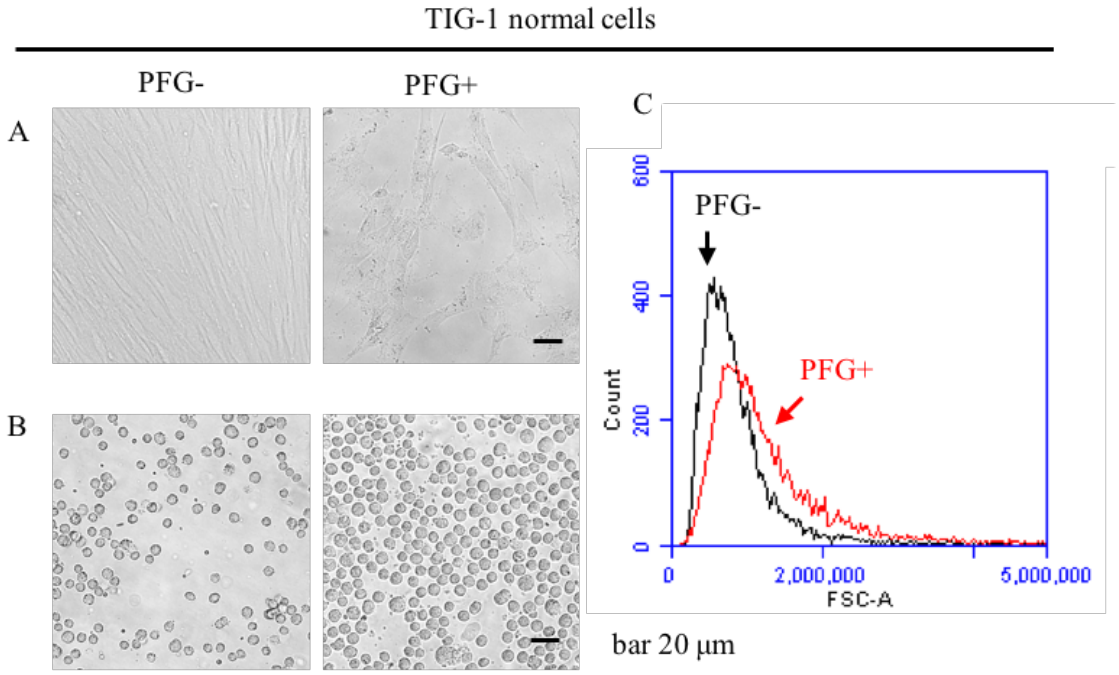


図 15　20 μM PFG で 72 時間処理した正常細胞の形態変化(A：接着時、B：浮遊させた)および細胞サイズ(C)の変化。

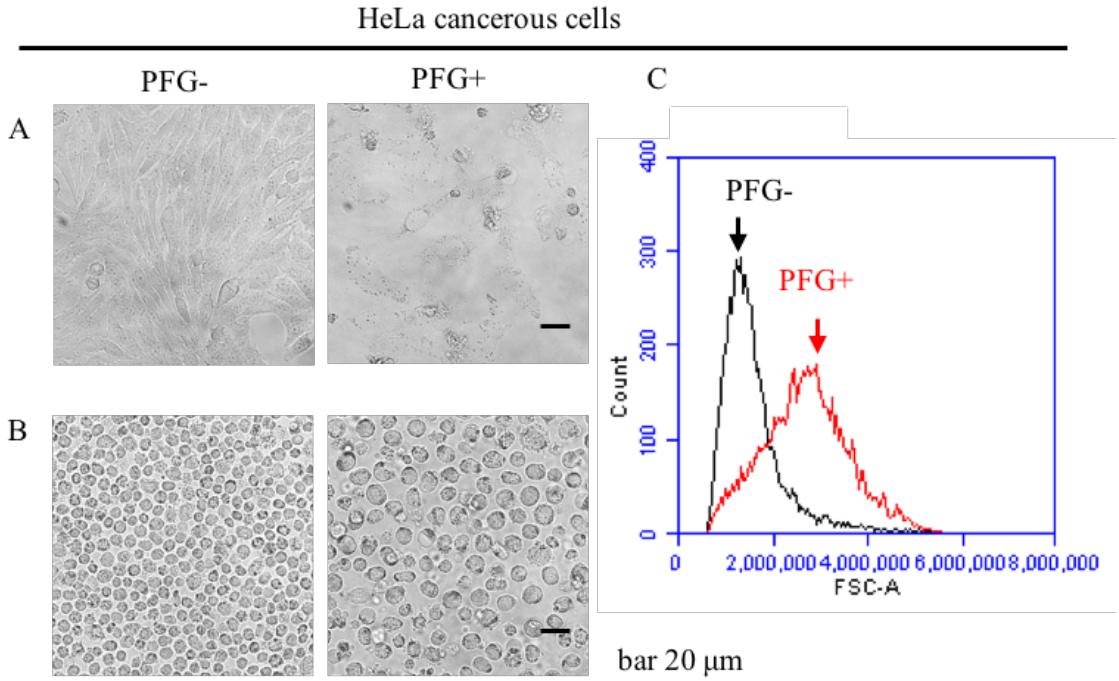


図 16　20 μM PFG で 72 時間処理したがん細胞の形態変化(A：接着時、B：浮遊させた)および細胞サイズ(C)の変化。

次に、前章の PFG のがん細胞選択的なアポトーシス誘導活性を検証するために、24 時間 PFG 処理した細胞を浮遊させた後に、Annexin-V/PI 二重染色し、1 時間以内にフローサイトメトリーでアポトーシス検出試験を行った。

TIG-1 正常細胞においては、PFG 20 μM と 40 μM で処理した場合では、Annexin-V-/PI+(ネクロース、左上、1.2%と 3.2%)、Annexin-V+/PI-(アポトーシス前期、右下、5.5%と 5.7%)および Annexin-V+/PI+(アポトーシス後期、右上、1.3%と 1.4%)の細胞数がコントロールより微弱に増加した。100 μM 高濃度で処理した場合、ネクロース細胞が 10.1%、アポトーシス細胞(前期+後期)が 66.4%大幅に増加した(図 17 上)。

一方、HeLa がん細胞の場合では、10 μM と 20 μM において、21.2%と 20.6%のアポトーシス細胞を検出した。50 μM 高濃度で処理した場合では、ネクロース細胞を 20.4%、アポトーシス細胞を 36.4%として検出された(図 17 下)。

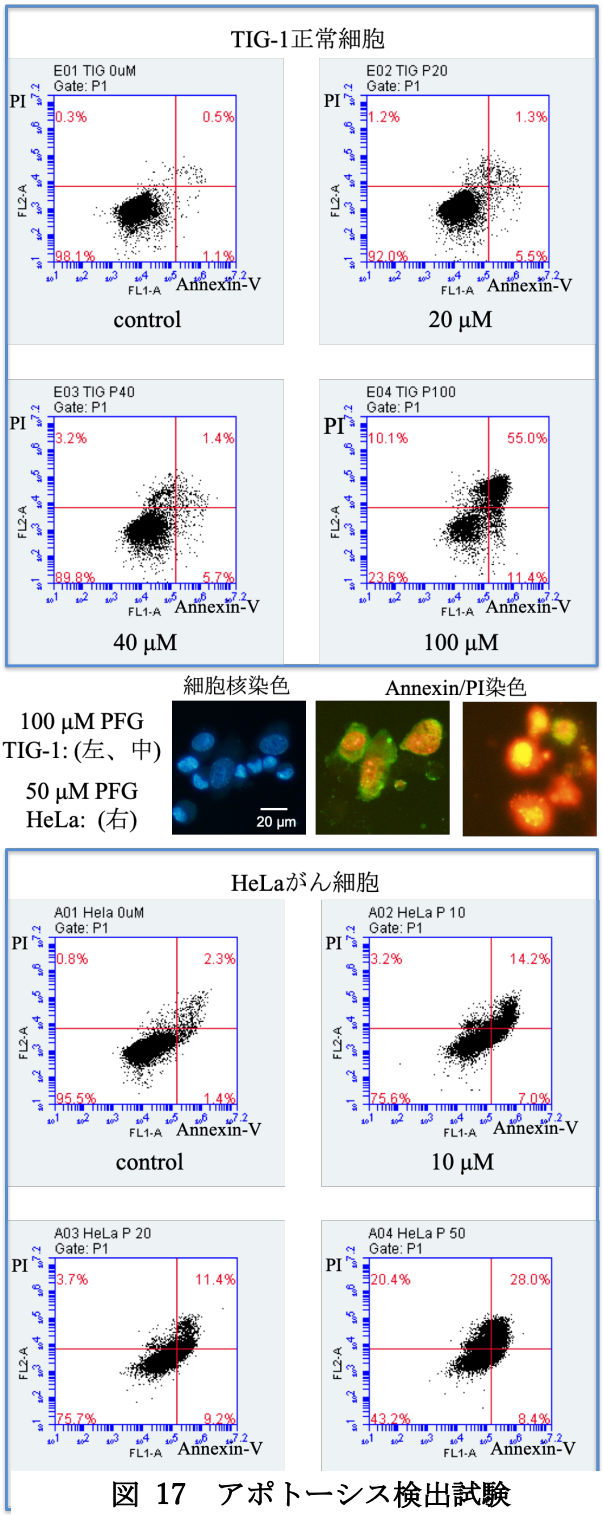


図 17　アポトーシス検出試験
(Annexin-V/PI)

この結果より、PFG はがん細胞選択的にアポトーシスを誘導することを明らかになり、前章と一致した結論となった。また、高濃度 PFG では、正常細胞、ネクロースを誘導することがわかった。

第二節　PFG による細胞周期停止

前節の結果より PFG は細胞周期停止に関与する可能性が示されたので、細胞周期について調べた。PFG 処理した細胞を懸濁し固定化処理した後に、PI(Propidium Iodide)染色しフローサイトメトリーで各細胞周期の細胞の割合を測定した(図 18)。その結果、TIG-1 正常細胞においては、G0/G1 期と G2/M 期の細胞割合が増え、S 期の細胞割合が減少した。HeLa がん細胞においては S 期と M 期の細胞割合が増え、G0/G1 期の細胞割合が減少した。

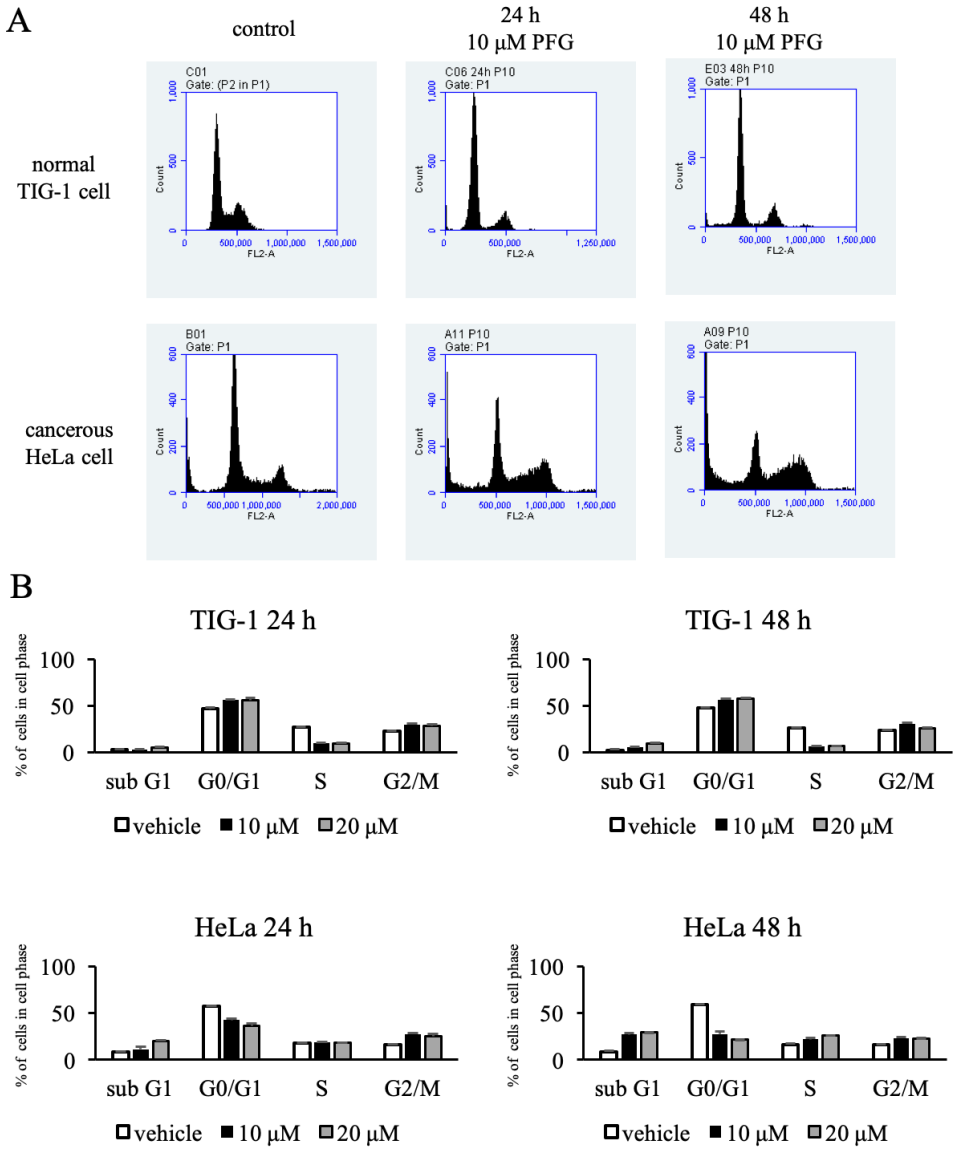


図 18　PFG による細胞周期停止

第三節　がん細胞における細胞分裂阻害効果

PFG による HeLa がん細胞のサイズ倍増(図 16)および S、G2/M 細胞周期停止(図 18)の結果より、細胞分裂を阻害することが明らかとなった。

本節では、PFG ががん細胞分裂阻害を起すタイミングについて検討を行った。HeLa 細胞に 50 μM PFG を添加した直後に、顕微鏡で細胞分裂を観察した。HeLa 細胞の細胞周期は広く知られており、G2/M 期は 3 時間とされている [64]。コントロール細胞は約 3 時間で細胞分裂が完了したこと対して、PFG 処理した分裂期細胞は３パターンに分かれた。図 19 に示したように、分裂後期の細胞は細胞分裂が正常におこった (２段)。分裂中期の細胞は、染色体が紡錘体赤道面に並び、姉妹染色分体が分離できなかった (３段)。そして、分裂前期の細胞は染色体が紡錘体赤道面に並びに失敗した(４段)。この結果より、PFG は分裂後期から分裂完成までに阻害効果はなかった(２段)。また、G2 期(接着状態)から M 期(丸める状態)への移行に対して阻害を見えず、M 期に入ったら、染色体の無秩序な移動が見えた(４段)。よって、PFG は分裂細胞に対して、前期から中期までの間に強く作用したことがわかった。

そこで、PFG 感受性のより高いヒト骨髄性白血病細胞 HL60 を再び用いて、PFG による細胞分裂阻害を起すタイミングを調べた。その結果、分裂後期の細胞に対して直ちに阻害を引き起こした(図 20)。さらに興味深い現象として、PFG により複数の収縮環が一時的に形成し、HL60 細胞は 3 つ以上に分裂しようとした。その後、収縮環が緩み、細胞は丸い形態に戻り、細胞分裂を阻害した。この現象から、PFG はがん細胞に過剰に存在する中心体と紡錘体に作用する可能性を示した。

よって、PFG により細胞分裂を阻害したことはアポトーシス誘因の一つだと考えられる。

将来の展望として、PFG の細胞分裂阻害の分子的なメカニズムを明らかにしたい。

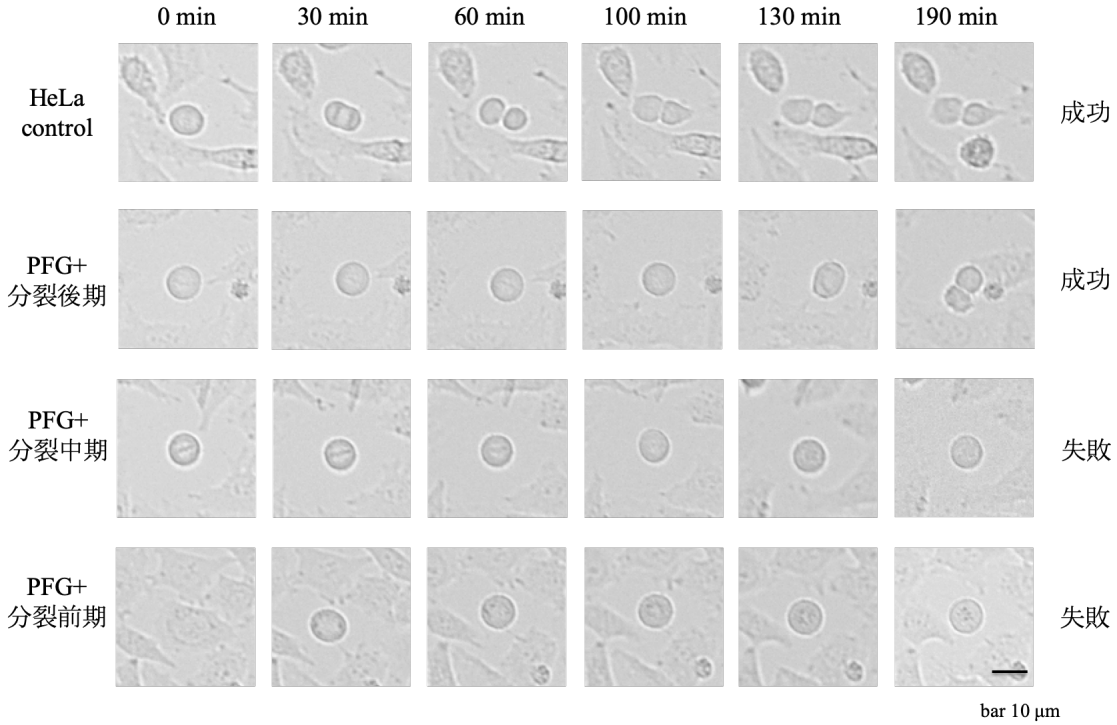


図 19　PFG による HeLa 細胞の分裂阻害様子

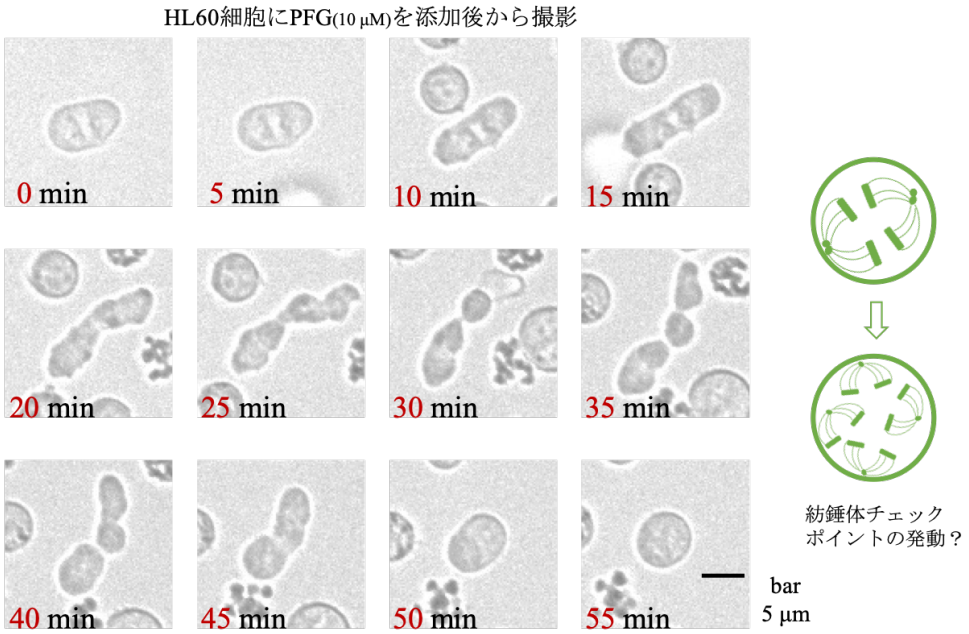


図 20　PFG による分裂終期 HL60 細胞の分裂阻害様子

第四節　正常細胞における早期老化誘導効果

体細胞の多くでは細胞分裂の回数に限界があり、加齢とともに細胞もまた老化することが知られている。一部の幹細胞を除き、ヒトの正常な体細胞が示すこの分裂回数の限界は“細胞老化”とよばれ、細胞が過度に増殖してがん化することを防いでいるものと考えられている。また、分裂寿命に達する以前の細胞が発がんの危険性のあるストレス(DNA の損傷 [65]、テロメアの短小化 [66]、酸化ストレス [67]、がん遺伝子の活性化 [68]など)に曝露された場合にも、すみやかに細胞老化と同様の不可逆的な分裂停止を起こすことが明らかになってきている。よって、細胞老化はアポトーシスと同様に、異常をもつ細胞の増殖を抑制する重要ながん抑制機構としてはたらいているものと考えられている [69]。老化した細胞は増殖刺激応答能を失い、G1 あるいは G2 期に停止しており、扁平で広がった細胞形態、SA-β ガラクトシダーゼ(senescence associated β galactosidase)活性の上昇、DNA 修復反応の実行を反映するヒストン H2AX のリン酸化(γH2AX)などの特徴を示す [70]。

TIG-1 正常細胞に対して、PFG は細胞増殖を抑制できるが、アポトーシスを誘導しなかった(第一節)。そこで、PFG で長時間処理した TIG-1 正常細胞の形態は老化細胞(扁平肥大化、第一節)と一致し、細胞周期は G0/G1 と G2/M で停止した結果(第二節)も細胞老化誘導効果を示唆した。老化誘導効果を検証するため、β-galactosidase(β-gal)活性を指標に、老化細胞の検出試験を行った。結果、TIG-1 正常細胞において、PFG 処理により顕著な老化染色陽性細胞を検出し(図 21、positive control: H_2O_2)、さらに PFG 濃度依存的に、老化染色陽性細胞の割合が増えた(図 23)。一方、HeLa がん細胞においては PFG による老化染色陽性細胞が検出されなかった(図 22、23)。

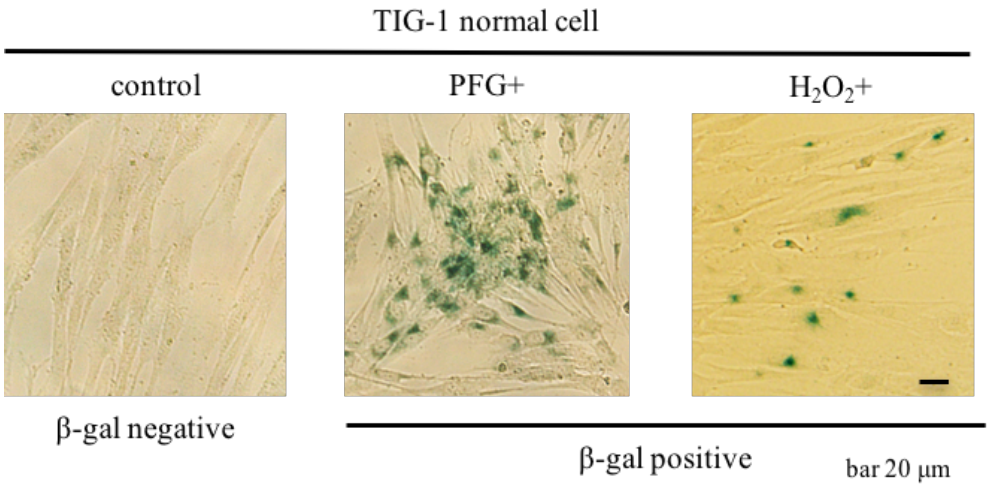


図 21　PFG 処理による TIG-1 正常細胞に老化細胞の検出

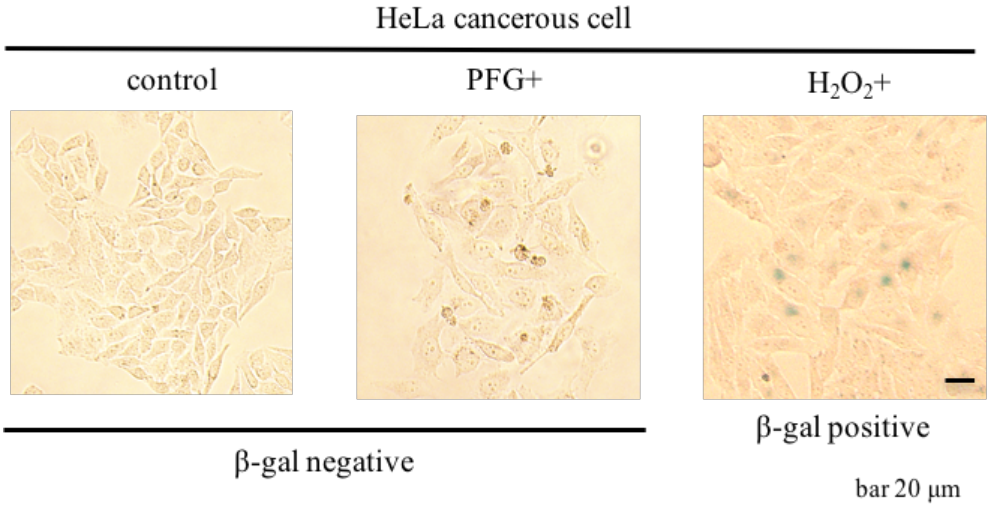


図 22　PFG 処理による HeLa がん細胞に老化細胞の不検出

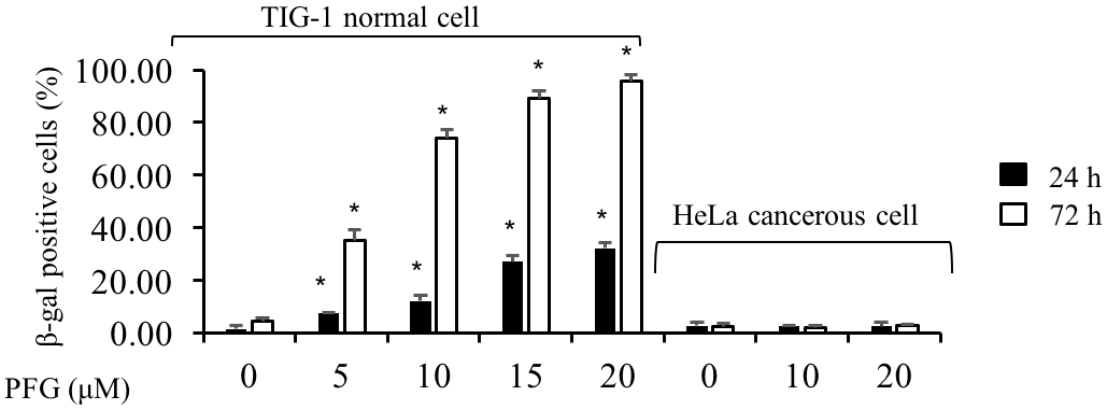


図 23　PFG による老化染色陽性細胞の割合

また、PFG による分裂停止は可逆であるかどうかを調べた。3 時間 PFG で前処理後、細胞を洗浄して、PFG ありと PFG なしで 72 時間培養した。前処理 3 時間および培養 72 時間の時点で MTT 法により細胞増殖を測定し、培養 72 時間のコントロール細胞数を 100%にした。図 24 に示したように、PFG を除去しても、正常細胞では分裂の再開は出来ない結果となった。この結果は、正常細胞に老化誘導が起こっていることをサポートした。

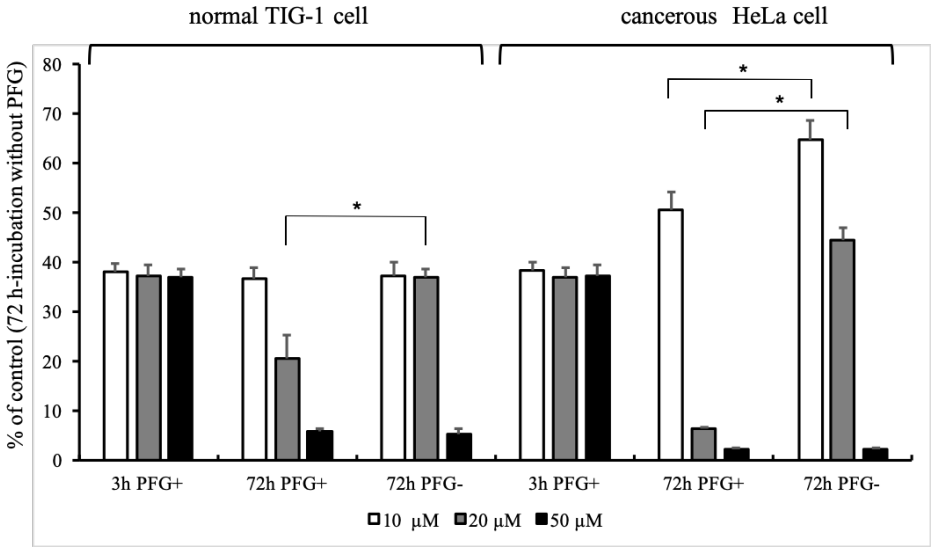


図 24　正常細胞における PFG の不可逆な分裂停止

第五節　DNA 損傷の誘導

DNA 損傷応答機構としては、DNA 修復や細胞周期停止、細胞老化、アポトーシスによる細胞死などを制御していることが知られている [71] [72]。損傷を受けた細胞は、DNA 障害チェックポイントを活性化させることで、細胞周期を G1/S 移行期、S 期、G2/M 移行期で停止させることによって、細胞は傷害 DNA を修復することが可能になる。修復が困難である状態では、細胞周期の進行を半永久的に停止(細胞老化)もしくは、細胞死を誘導(アポトーシス)して、損傷細胞を増殖細胞集団から排除することで、変異が入った遺伝情報が親から子へ伝わるのを防いでいる [73]。

染色体 DNA が損傷を受けると、真核生物では ATM (ataxia telangiectasia mutated)と ATR(Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein)という 2 つのチェックポイントキナーゼの活性化を介して、DNA 損傷フォーカス(γ-H2AX フォーカス)の形成と p53-p21 経路の活性化を引き起こす [74]。ATM は DNA 二本鎖切断(DNA double-strand breaks; DSBs)を認識し、主に、G1/S チェックポイントで機能しており、ATR は DNA 一本鎖切断(DNA single-strand breaks; SSBs)などを認識し、主に、S 期の DNA 複製チェックポイントと G2/M チェックポイントで機能している [75] [76] [77] [78] [79]。 DNA 二本鎖切断 DSBs は、細胞内で発生する様々な DNA 損傷の中でおそらく最も危険であり、電離放射線(IR)のような外因的作用や活性酸素種などの内在的な要因によって発生する。DSBs に対する細胞応答の非常に初期の段階では、ヒストン H2A バリアントである H2AX の serine 139 がリン酸化され、DNA 損傷部位で γ-H2AX (phosphorylated H2AX)を生じる [70]。ここで、PFG による二本鎖切断(DSB)の発生について、γ-H2AX を用いてマイクロプレート上の細胞で免疫蛍光染色により DSBs の検出試験を行った。

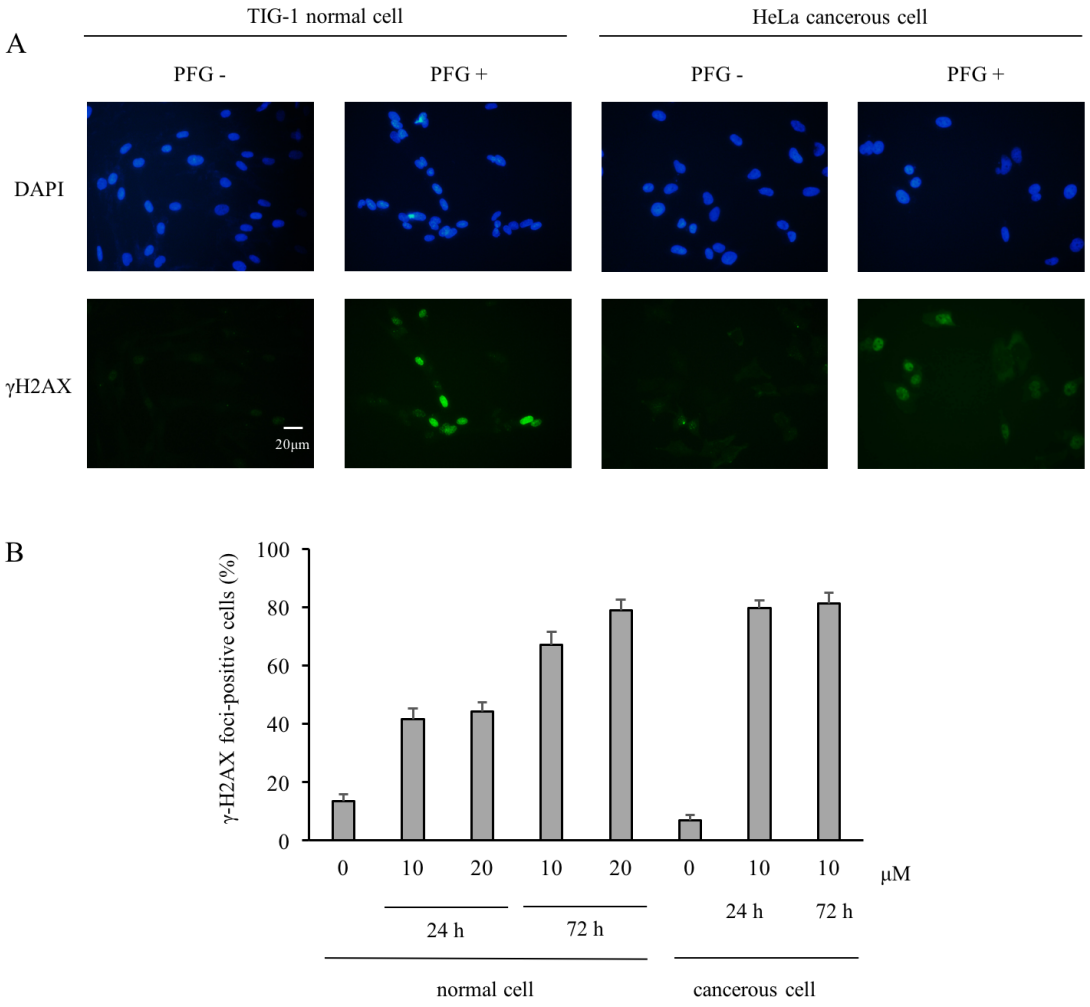


図 25　PFG による DNA 二本鎖切断(DSBs)の形成

図 25 に示したように、 PFG 処理した正常細胞とがん細胞いずれも、DNA の二本鎖切断を検出した。また、正常細胞において、時間および濃度依存的に DSBs が増加した。

γ-H2AX は ATM および DNA-PKs(DNA-dependent protein kinase)の基質として知られている [80]。PFG 誘導した DSBs は ATM に対する依存性を調べるために、ATM 阻害剤 KU55933 [69]または DNA-PKs 阻害剤 NU7026 と PFG の併用における γ-H2AX 発現の変化を測定した。図 26 に示したように、正常細胞における PFG 誘導した γ-H2AX 検出量増加は阻害剤添加により回避した。一方がん細胞においては回避できなかった。よって、正常細胞において PFG 誘導した DSBs には ATM が関与し、がん細胞では ATM が関与しない結果となった。

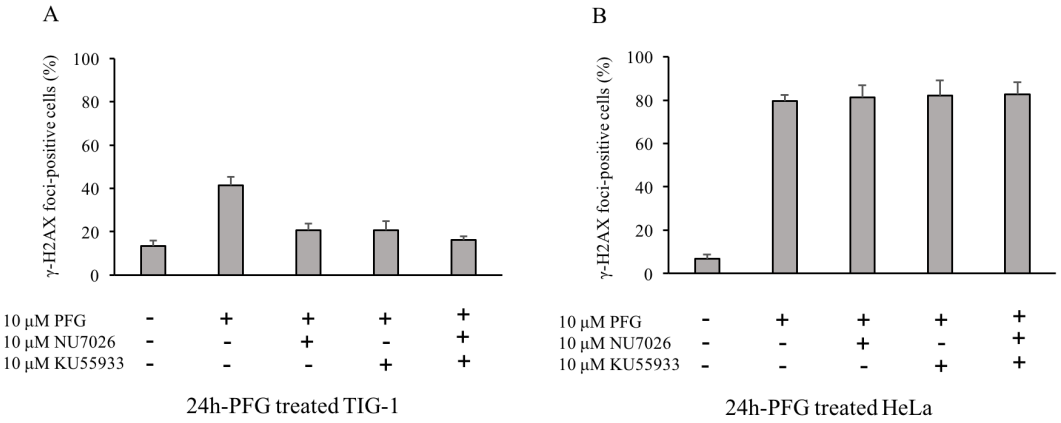


図 26　ATM 阻害剤による PFG 誘導 DSBs 修復の回避

第六節　活性酸素種消去効果

活性酸素種(Reactive Oxygen Species：ROS)は生体内において、脂質、核酸、蛋白質などの高機能生体分子と反応し、その結果脂質過酸化、DNA 変異、蛋白質の変性などをもたらす [81]。一方、生体内には活性酸素種を消去する抗酸化機構(抗酸化酵素と抗酸化物質より構成)が備わっており、活性酸素種による酸化から生体を守っている。DNA 損傷や細胞死などの細胞機能不全は、酸化力(pro-oxidant)と抗酸化力(anti-oxidant)のバランスの崩壊により引き起こす [82]。

活性酸素種(ROS)はシグナル伝達経路を調節することによってアポトーシスおよび老化の重要な調節因子と見なされており、細胞内で ROS の過剰産生はしばしば DNA 損傷の蓄積をもたらす [83] [84]。ここで、PFG は DNA 損傷を起こす過程に、過剰な(ROS)が産生したかどうかを調べた。72 時間 PFG 処理した細胞を 5 μM CellROX® Deep Red Reagent (Thermo Scientific)と反応させて、フローサイトメトリーで測定した結果、正常細胞とがん細胞は、コントロール細胞群と同程度な ROS レベルを示した(図 27-A)。次に、1 時間 PFG 処理した細胞の ROS レベルを測定したところ、コントロール細胞群より微弱に下げた結果となり(図 27-B)、PFG は ROS 消去能を持つことを示唆した。

そこで、PFG の ROS 消去能を検証するために、細胞を 1 時間 PFG で前培養し、酸化剤 t-BHP (tert-butyl hydroperoxide)により ROS を誘導した後、細胞の ROS レベルを測定した。その結果、PFG は酸化剤により誘導した ROS を消去した。また、30 μM は 10 μM より ROS 消去能が大きかった(図 27-C)。

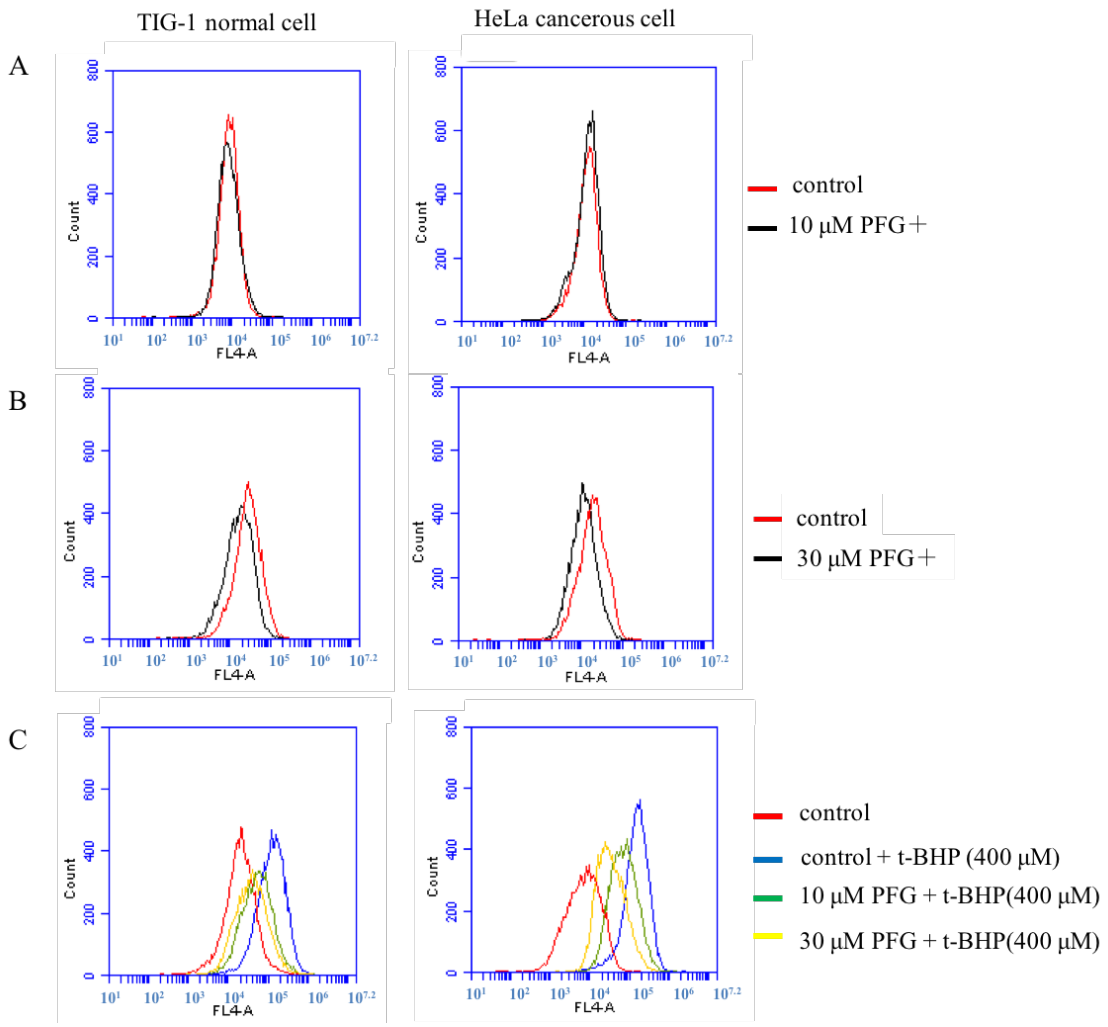


図 27　PFG の ROS 消去効果

また、cell-free で PFG の ROS 消去能を検証するために、DPPH ラジカル消去試験を行い、抗酸化物質 trolox の活性と比較した。その結果、各濃度の trolox は素早く DPPH ラジカルを消去し 20 分～24 時間の間変化は少ない結果に対して、PFG は穏やか且つ持続に DPPH ラジカルを消去していく結果となった(図 28)。

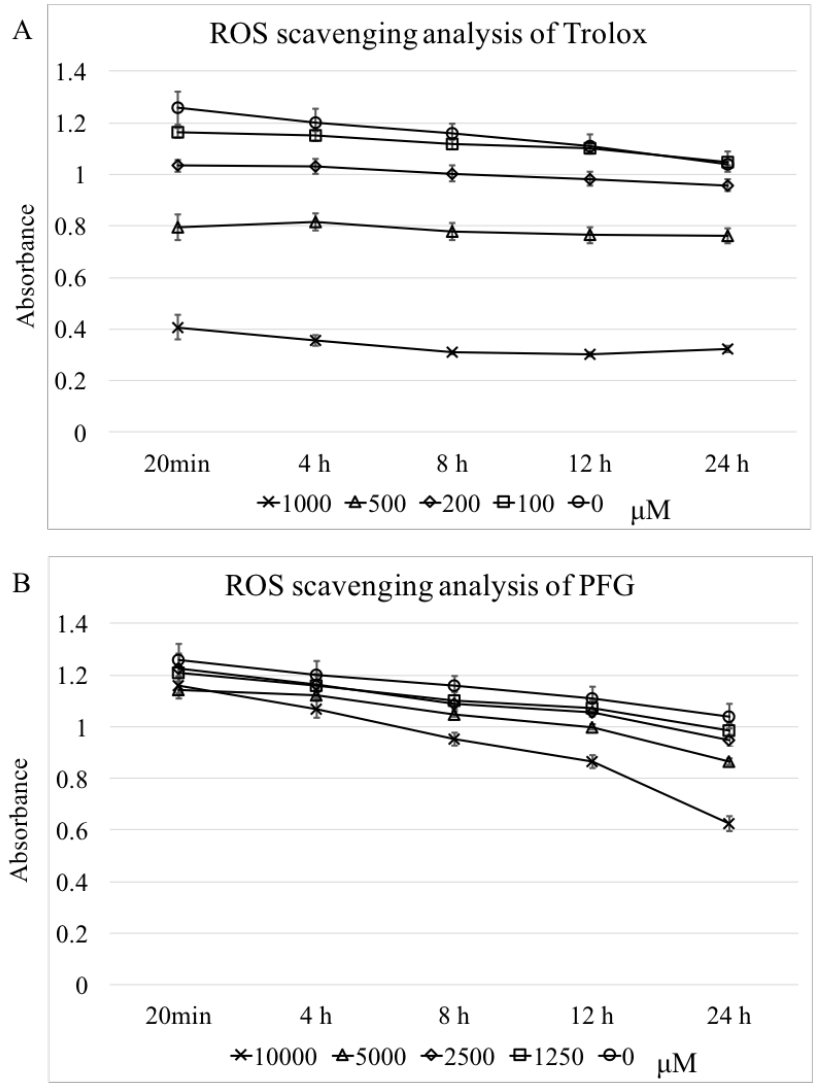


図 28　PFG の DPPH ラジカル消去活性

以上の結果から、細胞老化またはアポトーシスを誘導する過程に、PFG による ROS 恒常性の妨害が関与することを示唆した。

第七節　PFG の増殖抑制メカニズムの推測

第二章第一節より PFG は低酸素誘導性因子 HIF の誘導効果があることがわかった。HIF は、酸素恒常性の主調節因子として [88] [89]、800 個以上の遺伝子発現を調節する [90]。具体的に、低酸素環境細胞の嫌気的解糖系を亢進させる機能 [91]、ミトコンドリア電子伝達系の機能を低下させて、ROS の産生を抑制する機能 [92]、細胞内 pH 調整機能 [93]、および血管新生促進機能 [94]などが挙げられる。HIF は様々ながん種で過剰発現しており、腫瘍内部の低酸素環境への適応を図り、がんの進展に強く関わっている [95] [96]。近年 HIF はがん転移の誘発 [97]および放射線や抗がん剤治療に対する抵抗性 [98] [99] [100]との関連性が明らかになり、HIF はがん治療のターゲットとして非常に有望視されている。

しかし、HIF-1 は時に腫瘍増殖に対して抑制的に働くといった報告もある。例えば、HIF-1 はアスパラギン酸生合成の阻害を介して腫瘍細胞増殖を抑制する [101]、遊離 HIF-1 α は DNA 複製を阻害する [102]、HIF は細胞分裂を促進する MCM タンパク質と直接結合することで細胞分裂を阻害する [103]ことが明らかになった。本研究の PFG は HIF 活性化効果を持ちながら、がん細胞の分裂阻害、増殖抑制、アポトーシスを誘導した。また、PFG は ROS 抑制効果を持ち、HIF 活性化と関連する ROS 抑制効果と一致となった。以上のことから、PFG の抗腫瘍メカニズムは HIF の活性化経路に関与することを強く示唆した。

総括

第一章　漢方生薬に由来する細胞増殖抑制物質の探索

第一章では、漢方生薬における活性物質のスクリーニングおよび Paeoniflorigenone の単離と構造決定について述べた。がん細胞を用いたスクリーニング系を構築し、90 種薬用植物の中に、19 種の生薬粗抽出物に IC_{50} が 50 μg/mL 以下の細胞増殖抑制活性を確認した。この 19 種の生薬は、止血、止痛または消炎いずれの効用を有する。19 種の生薬の粗抽出物を用いて細胞毒性を測定して、細胞毒性 IC_{50} と細胞増殖抑制 IC_{50} の比を指標に、活性を評価した結果、牡丹皮(moutan cortex)は最も活性強かった(図 29)。

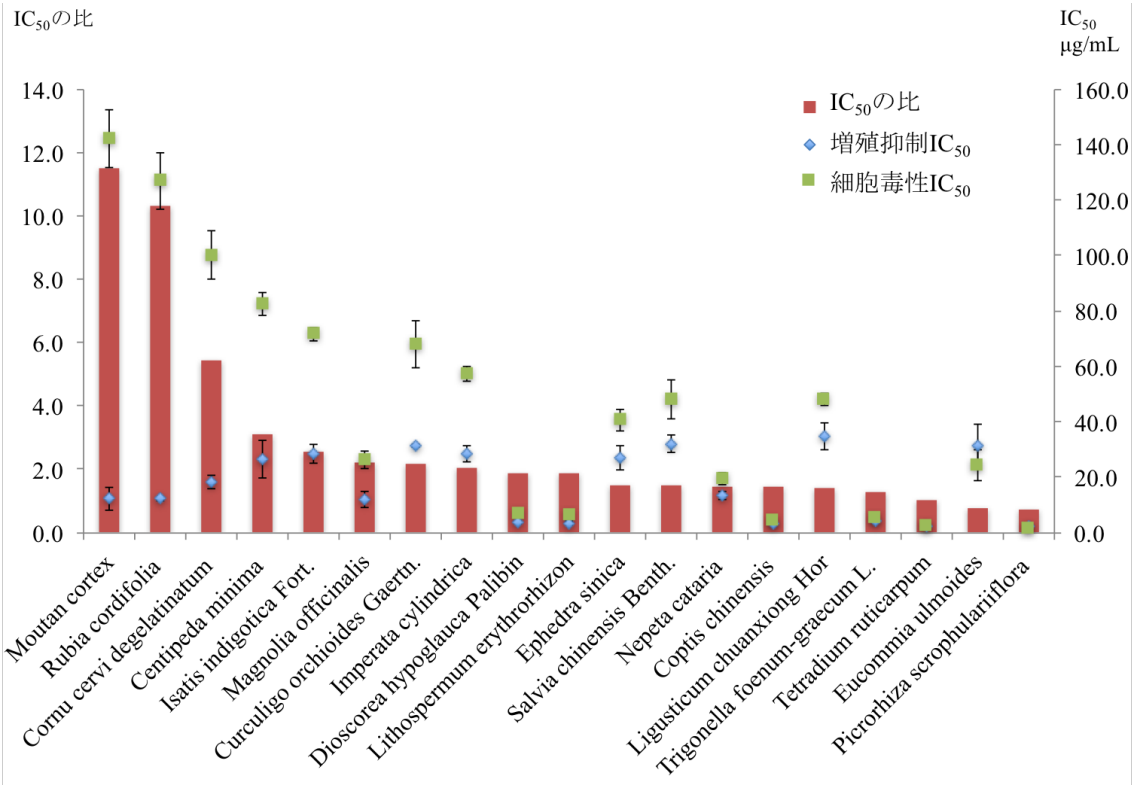
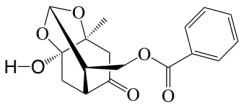


図 29　スクリーニングの結果

牡丹皮の抽出物からボタン科植物特有成分である Paeoniflorigenone を活性物質として単離・同定に成功した(図 30)。

牡丹皮（Moutan cortex）



Paeoniflorigenone(PFG)

図 30　牡丹皮および Paeoniflorigenone の構造式

第二章 PFG の抗腫瘍活性の評価

第二章では、Paeoniflorigenoneの抗腫瘍活性の評価について述べた。3種類のがん細胞と2種類の正常細胞を用いてPFGの増殖抑制活性をMTT法およびTrypan Blue法により評価した結果、PFGは全ての細胞株に対して細胞増殖抑制活性を示した。また、細胞核の染色(Hoechst33342/PI)およびDNA Ladder試験により、PFGはがん細胞選択的なアポトーシスを誘導したことが分かった。がん細胞のアポトーシスを引き起こす過程に、カスパーゼ-3の依存性を確認した。

次に、ヒトがん細胞パネルスクリーニングの結果により有効濃度は GI_{50} が 14.1 μM とやや高いが、いくつのがん細胞株(ヒト卵巣がん細胞 SK-OV-3、ヒト前立腺がん細胞 PU-145 およびヒト腎腺がん細胞 ACHM)に対し顕著な有効性が見られた。COMPARE プログラムにより、サンプル物質の Finger Print をデータベース中の既存の抗がん剤全てと比較した結果、似た Finger Print のものがないため、PFG に新規作用機序を持つことを示唆した。また、PFG は低酸素誘導因子 HIF の誘導活性があることが分かった。

PFG の構造活性相関を調べた結果、PFG のケージ構造の保持に欠かせないアセタール基そしてケトン基が細胞増殖活性に重要であるという知見が得られた。

第三章 PFG の作用機序の検討

第三章では、Paeoniflorigenone の細胞増殖抑制機序について述べた。正常細胞とがん細胞において、PFG 処理により細胞は肥大扁平化した結果から、細胞分裂阻害および細胞老化誘導の可能性を示唆した。

次に、フローサイトメトリーを用いて、PFG 処理した細胞の細胞周期の変化を調べた。正常細胞では、細胞老化の特徴的な G0/G1 と G2/M 期の細胞周期停止が見られ、細胞老化染色試験により老化陽性細胞を PFG 濃度・時間依存的に検出された。がん細胞では、S 期と G2/M の細胞周期停止が見られて、細胞分裂を阻害されたことが分かった。また、顕微鏡で PFG により分裂期細胞が複数の収縮環の形成を観察されたため、PFG はがん細胞にある過剰な中心体と紡錘体に作用する可能性を示した。

細胞周期停止の原因となる DNA 損傷を調べたところ、がん細胞と正常細胞に DNA 二本鎖切断(DBSs)が見られた。DBSs 誘導因子である活性酸素の産生を調べた結果、興味深いに、PFG は ROS 消去能を持つことがあった。抗酸化物質 trolox と比べて、より穏やか且つ持続的に抗酸化能力を示した。PFG の ROS 抑制効果は、PFG の HIF 誘導効果と合致し、PFG の抗腫瘍効果は HIF 活性化経路との関連性を示唆した。

以上の結果より、PFG は DNA 損傷を起こし、正常細胞が早期老化、がん細胞が分裂阻害を誘導することにより細胞増殖を抑制したと結論付けた。

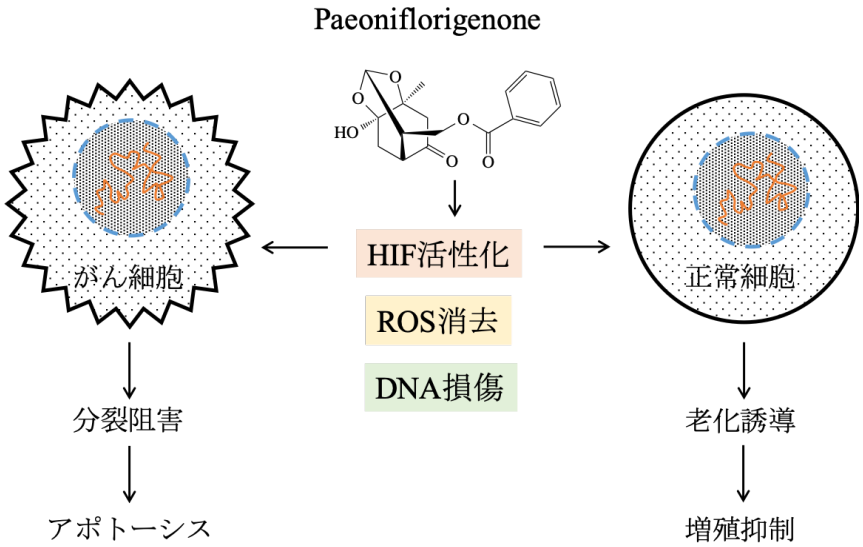


図 31　PFG の細胞増殖抑制機序の模擬図

実験項

一般操作

1.　分析機器

・H 核磁気共鳴スペクトル(^{1}H NMR)の測定には、日本電子 JEOL JNM AL-300 (500 MHz)フーリエ変換核磁気共鳴スペクトル測定装置を使用した。

・ESI-MS の測定は、LCT premier EX spectrometer (Waters, Milford, MA)を用いて測定した。

・吸光度の測定には、CORONA ERECTRIC 製コロナマイクロプレートリーダー(SH-1000Lab)を使用した。

・細胞生存率の測定には、ライフサイエンス　TC10™ 全自動セルカウンターを使用した。

・細胞写真は、蛍光顕微鏡(Eclipse E600; Nikon, Tokyo, Japan)により撮影した。

・フローサイトメトリーは BD Accuri™ C6 Plus personal flow cytometer (BD Biosciences)を使用した。データ解析は FCS Express 4 software (version 2.2, BD Biosciences)を使用した。

2.　クロマトグラフィー

・分析用薄層クロマトグラフィー(TLC)

TLC板は、Merck 1.05715 20PLC plates 20x20 cm silica gel 60 F254を用いた。

・分析用薄層クロマトグラフィー(PLC)

PLC板は、Merck 1.05744 PLC plates 20x20 cm silica gel 60 F254を用いた。

・カラムクロマトグラフィー

順相シリカゲルは富士シリシア化学(株)製シリカゲル BW-60 を用いた。

・HPLC

逆層分析用カラムはナカライテスク(株)製 COSMOSIL 15C18-AR-II Packed Column 4.6mml.D.×250mm　を用いた。逆層分取用カラムはナカライテスク(株)製 COSMOSIL 15C18-AR-II Packed Column 10mml.D.×250mm を用いた。

3.　細胞培養

HL60細胞およびJurkat細胞は、浮遊細胞用培地で５%炭酸ガスー空気、飽和水蒸気下、37℃で培養した。浮遊細胞用培地：RPMI 1640培地(Thermo Scientific, Tokyo, Japan)、10%非働化牛胎児血清(FBS; Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan)、100 units/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin、300 mg/mL L-glutamine。HeLa細胞、TIG-1細胞および3T3-L1細胞は、接着細胞用培地で５%炭酸ガスー空気、飽和水蒸気下、37℃で培養

した。接着細胞用培地：MEM培地(Thermo Scientific, Tokyo, Japan)、10%非働化牛胎児血清(FBS; Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan)、100 units/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin、300 mg/mL L-glutamine。

4. 細胞増殖試験および細胞毒性試験

細胞を96-wellプレートに5000(3T3-L1細胞、HeLa細胞とTIG-1細胞)または10000(HL60細胞とJurkat細胞)cells/wellの濃度で播種し、抽出物又は化合物を添加し72時間培養した後に、細胞増殖率をMTT assay、細胞生存率をTrypan Blue assayで評価した。

・ 細胞増殖試験(MTT assay)

培養終わった試験プレートにMTT水溶液(3.5 mmol/L: 1.44 g/L)を各wellに20 μLずつ加え、CO_2インキュベーターで2-4時間培養する。培養後ストレートマニホールドを用い培地を除去し、DMSO 150 μLを加えて30分ほど放置し色素を溶解させる。各ウェルの吸光度(測定波長550 nm、参照波長630 nm)をマイクロプレートリーダーで測定する。

・ 細胞毒性試験(Trypan Blue assay)

培養終わった試験プレートから、細胞全体(接着細胞ではトリプシンで懸濁した後)をマイクロチューブに移し、30 秒間軽く遠心し、細胞を底面に沈殿させた。上清の培地を全部取り除く、Trypanblue (10 μL 0.4% w/v)を入れ混ぜた後に、TC10™全自動セルカウンター専用のスライドに注入し、生存率を測定した。

薬用植物抽出物及び化合物は MeOH で溶解しているため、1.5% MeOH を vehicle control として使った。先行研究において、1.5% MeOH では細胞増殖へ影響がないことを確認した。

5. 統計分析

データは3回の独立した実験の統計に平均±SDの形で示されている。群間の統計的比較は、ANOVAに続いてBonferroniパラメトリック t 検定を用いて行った。$p<0.05$の場合、差異は有意と見なした。

第一章

1.　薬用植物の抽出

乾燥させた薬用植物は、中国の北京市にある漢方薬店「同仁堂」により10 gずつ購入された。乳鉢で粉砕した後に70% (v/v) EtOHでそれぞれ抽出を行った。抽出液を吸引ろ過により得られた濾液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をMeOHで20 mg/mLの試験サンプルに調整した。

2.　PFGの単離

牡丹皮(*Peaonia suffruticosa* Andrews)2 kgを70% (v/v) EtOHで抽出を行った。吸引ろ過により得られた濾液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物は、活性成分分離のためEtOAcとH_2Oを用い常法にて分配した。EtOAc層について、さらにHexaneおよび90%MeOHを用い分配を行った。90%MeOHをシリカゲルオープンクロマトグラフィーで６画分($CHCl_3$, 0, 20, 30, 50 and 95% MeOH)に分けて、最も活性強いFr.1を更にシリカゲルオープンクロマトグラフィーで5画分($CHCl_3$, 0, 2, 10, 25 and 95% MeOH)に分けた。活性の最も強いFr.1-1、Fr.1-2及びFr.1-3を合わせてPLC($CHCl_3$: MeOH 50:1)で精製をし、Fr.1-1-1をPaeonol(450mg)として得られた。また、Fr.1-1-2をPLC($CHCl_3$: MeOH 50:1)で精製を行なったところ、PFG(10 mg)を精製できた。

3.　PFGの大量抽出

PFGの活性評価試験及び細胞増殖抑制メカニズムの研究には、大量なPFGが必要である。そこで、Shimizuらが報告したPFGの抽出法 [51]を参考に、芍薬(*Paeonia albiflora* Pallas)500 gを1.5 L水で1日室温抽出を行った。吸引ろ過により得られた水溶液をEt_2Oで抽出し、Et_2O画分を減圧濃縮し、茶色い粗抽出物(3.02 g)を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(100 , 4.0× 15 cm, hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.27～0.32のほぼ単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮してPFG-in画分(143 mg)を得た。PFG-in画分を更にHPLC(MeOH 7:3 H_2O、流速2.0 mL/min、 250 × 10 mm i.d. 5C18-AR-II Packed Column、 COSMOSIL)を用いてPFG(135 mg, t_R = 11.0 min)を精製した。

4.　PFGのスペクトルデータ

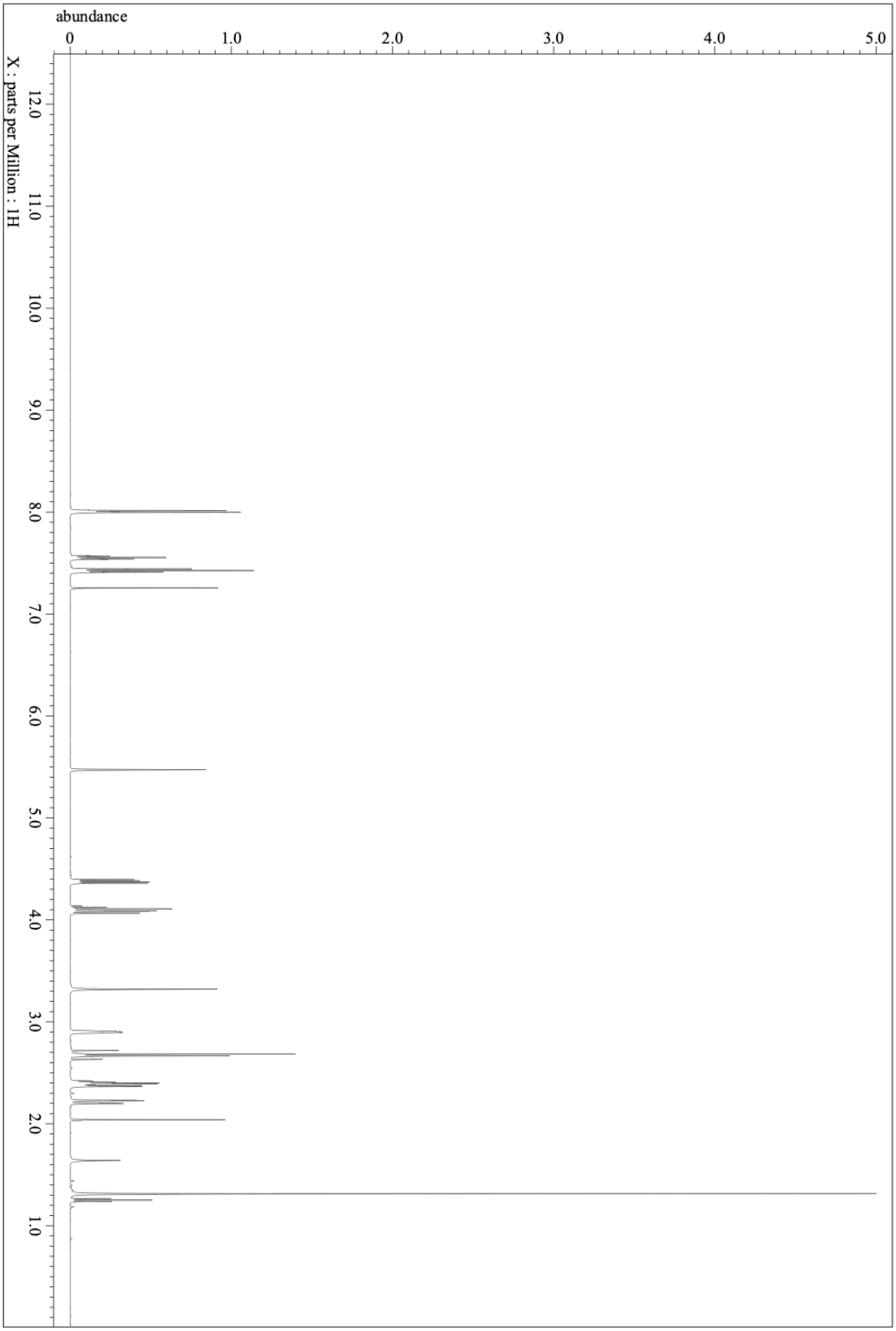


図 32　PFG の ^{1}H-NMR スペクトル

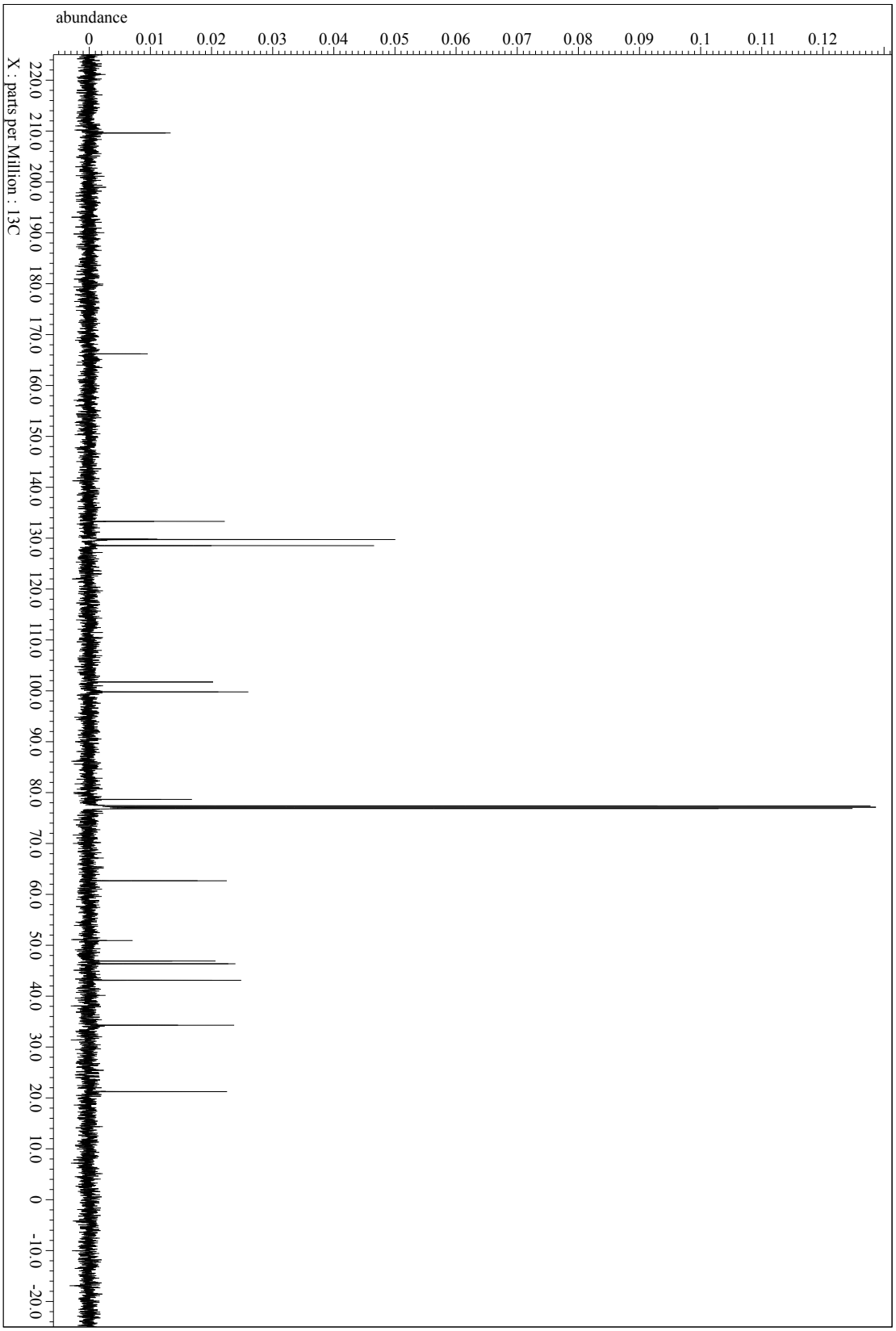


図 33　PFG の ^{13}C-NMR スペクトル

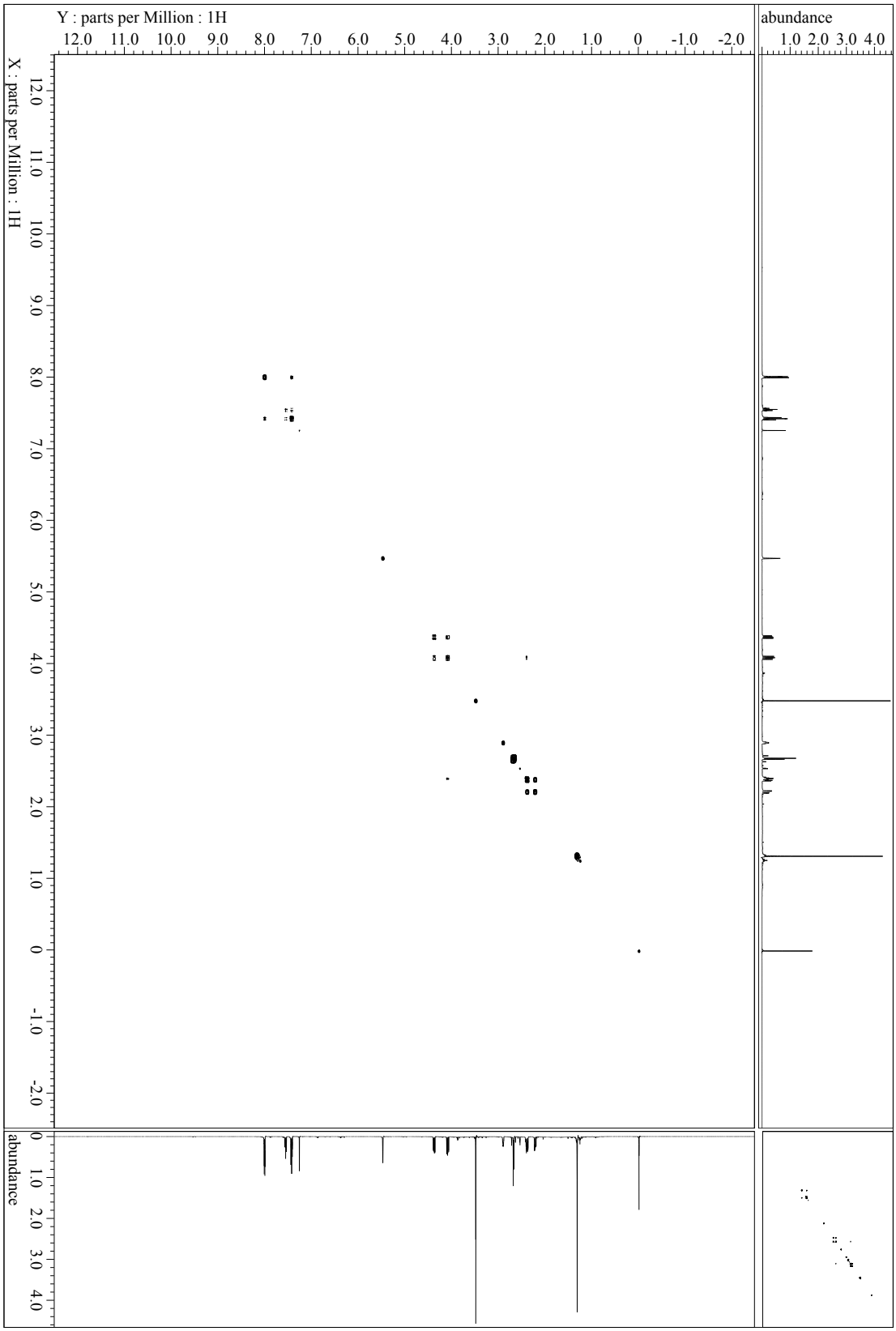


図 34　PFG の COSY スペクトル

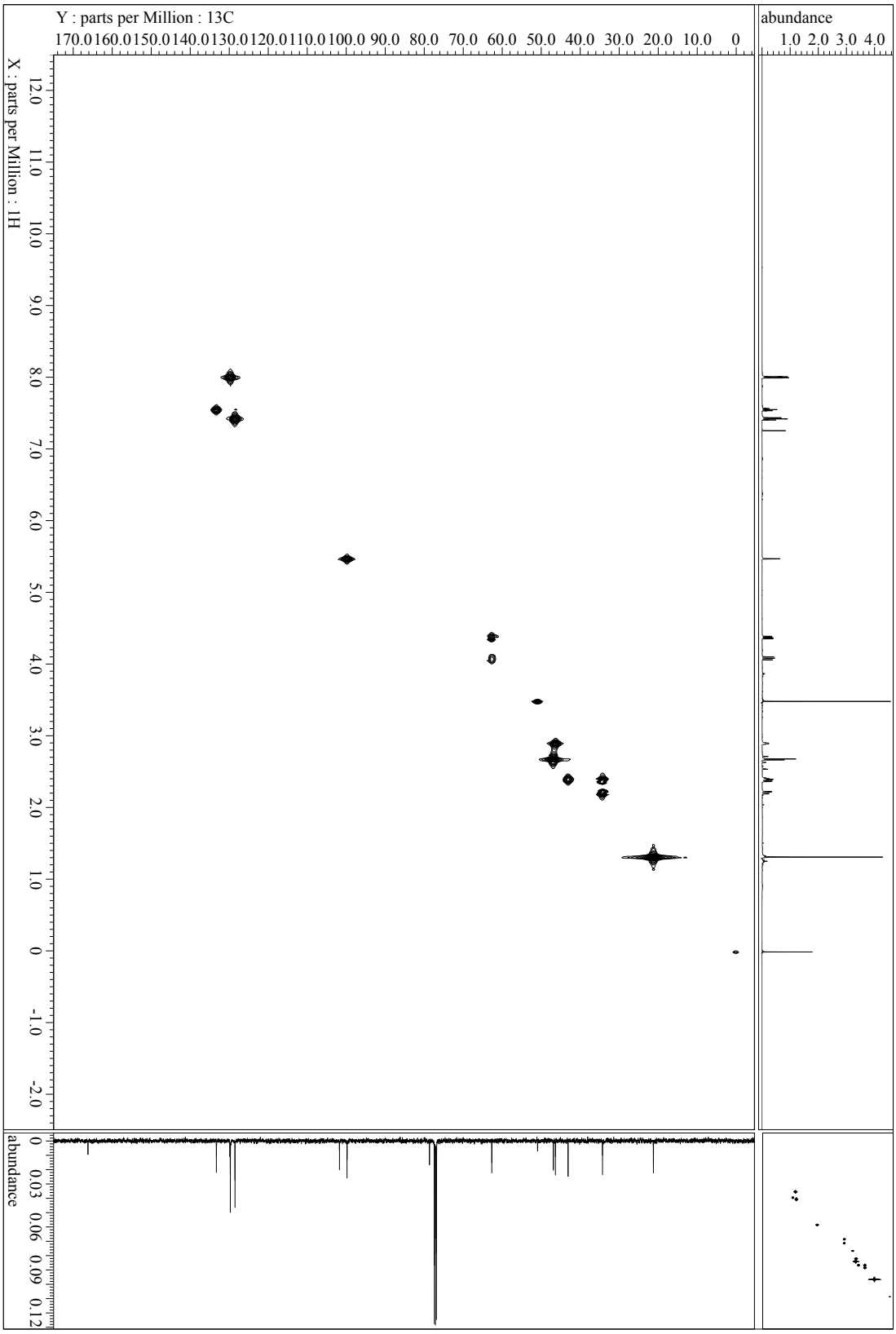


図 35　PFG の HMQC スペクトル

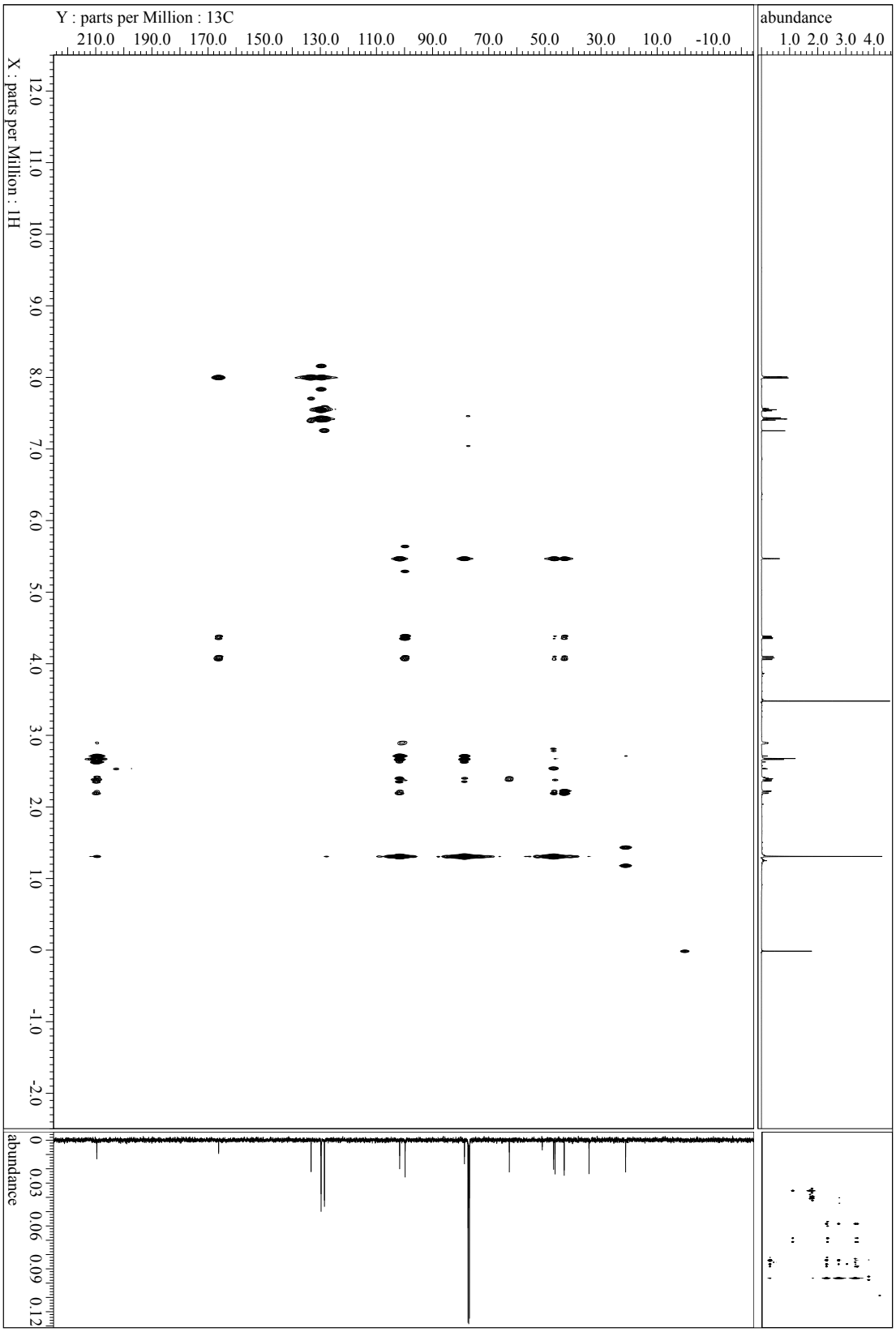


図 36　PFG の HMBC スペクトル

第二章

1. カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKによるアポトーシスの回避試験

24ウェルプレートにHL60細胞及びJurkat細胞を6×10^4 cells/well、HeLa細胞、TIG-1細胞及び3T3-L1細胞を8×10^4 cells/wellを播種し、一晩培養した。細胞をZ-VAD-FMK(25 mMまたは0 mM)で30分前培養した後に、PFG(30 μMまたは0 μM)で24時間処理(TIG-1細胞は48時間)後、細胞生存率をTrypan Blue assayで評価した。

2. 二重染色によるアポトーシス検出試験

細胞を24時間PFGで処理した後に、細胞全体(接着細胞ではトリプシンで懸濁した後)をマイクロチューブに移し、30秒間軽く遠心し、細胞を底面に沈殿させた。上清の培地を全部取り除く、細胞ペレットをPBSで洗浄たあと、再び遠心し、細胞を底面に沈殿させた。Double Stain Apoptosis Detection Kit (Hoechst 33342/PI)を利用し、30分染色したあとに、細胞をPBSで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

3. DNAラダー分析

各濃度PFGで72時間処理した細胞をPBSで洗浄した後に、Lysis Buffer(10mM Tris-HCl [pH 7.4], 10mM EDTA, 0.5% Triton X-100, pH 7.4)に4℃10分間溶解させた。17、700 gで遠心し、上清に0.2 mg/mL RNase Aまで添加し1時間で37℃処理した後に、0.2 mg/mLプロテアーゼ Kにより30分50℃で処理した。ライセートに同量の2-プロパノールを添加し一晩-20℃で処理した後、17、700 g 15分遠心し、得られたペレット(抽出したDNA)をTEバッファー(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.5%, pH 7.4)で溶解した。DNAを2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロミド染色した。アガロースゲルを紫外線で可視化させ、撮影した。

4. カスパーゼ-3の活性測定

生細胞内でカスパーゼ3(DEVDase)の活性をView™ 488 Caspase-3 Assay Kit (Biotium, Inc.)によりリアルタイムで測定した。DEVD-NucView™ カスパーゼ3 基質は、インタクトな細胞内でカスパーゼ3活性をリアルタイムに追跡できる蛍光基質である。反応前は、カスパーゼ3 基質ペプチドであるDEVDがDNA結合色素に付加されており、色素がDNAに結合できないため非蛍光性である。基質が細胞の細胞質に入り、カスパーゼ-3により切断されると、DNAに高い親和性を示す蛍光色素が放出され、細胞核に移動して核を染色する。24時間PFG処理した細胞をPBSで洗浄し、NucView™ 488 Caspase-3基質を細胞懸濁液に添加し、30分培養した。反応後、細胞をPBSで洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光染色細胞の写真を撮影し、カスパーゼ-3活性化細胞の割合を計算した。

5. PFG誘導体の合成

1はPFGのアセチル化産物である。PFG(50/55 mg)をAc_2O(0.5 mL)とピリジン(0.5 mL)に溶かして一晩静置した。そして、反応混合物をEt_2Oにより抽出した後、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(10 g, 1.0× 15 cm, hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.46～0.49のほぼ単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮して**1**-in画分を得た。**1**-in画分を更にHPLC(MeOH 7:3 H_2O、流速2.0 mL/min、 250 × 10 mm i.d. 5C18-AR-II Packed Column、 COSMOSIL)を用いて**1**(53/63 mg, t_R = 17.5 min)を精製した。

1の高分解能質量スペクトル([M+H]+, m/z 361.1267, calcd for 361.1282)より分子式はC19H20O7であることがわかった。**1**の構造は、1H-NMR解析により、メチル基が1個(δH 1.29 (s, 3H))、アセチルのメチル基(δH 1.29 (s, 3H))、 メチレンが2個(δH 2.47, 2.84 (each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H) と 2.73, 3.16(each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H)、メチンが2個(δH 2.43–2.48 (m, 1H) と 2.88–2.92 (m, 1H))、メチレンオキシ基が1個(δH 4.09, 4.38 (each dd, J = 11.6, 5.6 Hz, 1H))、アセタールが1個(δH 5.56 (s, 1H))およびベンゼン環が1個(δH 7.39–8.06 (m, 5H))存在することがわかった。

2は**1**の$NaBH_4$による還元産物である。**1**(53 mg)をEtOH-CH_2Cl_2(2 mL)に溶かした後、NaBH4(10 mg)を添加して室温1 h反応させた。AcOH(50 μL)を入れ反応を停止させ、反応混合物をCH_2Cl_2で抽出し、H_2Oで３回洗浄した後にNa_2SO_4で乾燥した。そしてCH_2Cl_2抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(10 g, 1.0× 15 cm, hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.39～0.41のほぼ単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮して**2**-inを得た。**2**-in画分を更にHPLC(MeOH 7:3 H_2O、流速2.0 mL/min、 250 × 10 mm i.d. 5C18-AR-II Packed Column、 COSMOSIL)を用いて**1**(20 mg, t_R =20.4 min)を精製した。

2の高分解能質量スペクトル([M+H]+, m/z 363.1437, calcd for 363.1444)より分子式はC19H22O7であることがわかった。**2**の構造は、1H-NMR解析により、メチル基が1個(δH 1.22 (s, 3H))、アセチルのメチル基(δH 2.10 (s, 3H))、 メチレンが2個((δH 2.47, 2.84 (each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H) と 2.73, 3.16(each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H))、メチンが2個(δH 2.42–2.51 (m, 1H) と 2.70–2.80 (m, 1H))、メチレンオキシ基が1個(δH 4.52-4.66 (m, 1H))、メチンオキシ基が1個(δH 4.26-4.40 (m, 1H)) 、アセタールが1個(δH 5.56 (s, 1H))およびベンゼン環が1個(δH 7.39–8.05 (m, 5H))存在することがわかった。

3はPFGのアセチル化産物である。PFG(35 mg)をAc_2O(0.5 mL)とピリジン(0.5 mL)に溶かして48 h静置した。そして、反応混合物をEt_2Oにより抽出した後、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(10 g、 1.0× 15 cm、hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.78〜0.82のほぼ単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮して**3**-in画分を得た。**1**-in画分を更にHPLC(MeOH 7:3 H_2O、流速4.0 mL/min、 250 × 10 mm i.d. 5C18-AR-II Packed Column、 COSMOSIL)を用いて**1**(18 mg, t_R = 17.0 min)を精製した。

3の高分解能質量スペクトル([M+H]+, m/z 389.1575, calcd for 389.1600)より分子式はC21H25O7であることがわかった。**3**の構造は、1H-NMR解析により、メチル基が2個(δH 0.89 (t, 3H)とδH 1.29 (s, 3H))、アセチルのエチル基(δH 2.41 (t, 2H))、 メチレンが3個(δH 1.60–1.70 (m, 2H)、 2.47, 2.84 (each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H) と 2.73, 3.16(each dd、 J = 21.6、 1.8 Hz、 1H))、メチンが2個(δH 2.45–2.49 (m、 1H) と 2.88–2.91 (m、 1H))、メチレンオキシ基が1個(δH 4.05, 4.38 (each dd, J = 11.6, 5.6 Hz, 1H))、アセタールが1個(δH 5.56 (s, 1H))およびベンゼン環が1個(δH 7.41–8.19 (m, 5H))存在することがわかった。

4はPFGのアセチル化産物である。PFG(54 mg)をAc_2O(0.5 mL)とピリジン(0.5 mL)に溶かして72 h静置した。そして、反応混合物をEt_2Oにより抽出した後、抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(10 g, 1.0× 15 cm, hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.92〜0.95のほぼ単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮して**4**-in画分を得た。**4**-in画分を更にHPLC(MeOH 7:3 H_2O、流速4.0 mL/min、 250 × 10 mm i.d. 5C18-AR-II Packed Column、 COSMOSIL)を用いて**4**(19 mg, t_R = 22.5 min)を精製した。

4の高分解能質量スペクトル([M+H]+, m/z 417.1899, calcd for 417.1913)より分子式はC23H28O7であることがわかった。**4**の構造は、1H-NMR解析により、メチル基が2個(δH 0.89 (t, 3H)とδH 1.29 (s, 3H))、アセチルのエチル基(δH 2.41 (t, 2H))、 メチレンが5個(δH 1.29-1.36(m, 4H)、 1.60–1.70 (m, 2H)、 2.47, 2.84 (each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H) と 2.73, 3.16(each dd, J = 21.6, 1.8 Hz, 1H))、メチンが2個(δH 2.45–2.49 (m, 1H) と 2.88–2.91 (m, 1H))、メチレンオキシ基が1個(δH 4.05, 4.38 (each dd, J = 11.6, 5.6 Hz、1H))、アセタールが1個(δH 5.56 (s, 1H))およびベンゼン環が1個(δH 7.41–8.19 (m, 5H))存在することがわかった

5はPFGの$NaBH_4$による還元産物である。PFG(30 mg)をEtOH-CH_2Cl_2(2 mL)に溶かした後、NaBH4(10 mg)を添加して室温1 h反応させた。AcOH(50 μL)を入れ反応を停止させ、反応混合物をCH_2Cl_2で抽出し、H_2Oで3回洗浄した後にNa_2SO_4で乾燥

した。そしてCH_2Cl_2抽出液を減圧濃縮し、粗抽出物を得た。粗抽出物をシリカゲルオープンクロマトグラフィー(10 g, 1.0× 15 cm, hexane 1:1 EtOAc)により、TLC上で*Rf* 0.08～0.11の単一のスポットを示す画分を合わせ、減圧濃縮して**5**(10 mg)を得た。

5の高分解能質量スペクトル([M+H]+, m/z 325.1685, calcd for 325.1651)より分子式はC17H22O6であることがわかった。**5**の構造は、1H-NMR解析により、メチル基が1個(δH 1.25 (s, 3H))、 メチレンが2個(δH 1.67, 1.78(each m, 1H)と2.10, 2.19 (each , dd, J = 13.6, 2.4 Hz, 1H))、メチンが2個(δH 1.85-1.91(m, 1H) と2.01-2.04(m, 1H))、メチレンオキシが2個(δH 3.75(d, J = 12.5, 2H)と4.11, 4.38 (each dd, J = 11.6, 5.6 Hz, 1H))、メチンオキシが2個(δH 3.43(dd, J = 11.0, 5.0 Hz, 1H)と4.06-4.08 (m, 1H))およびベンゼン環が1個(δH 7.41–8.05 (m, 5H))存在することがわかった。

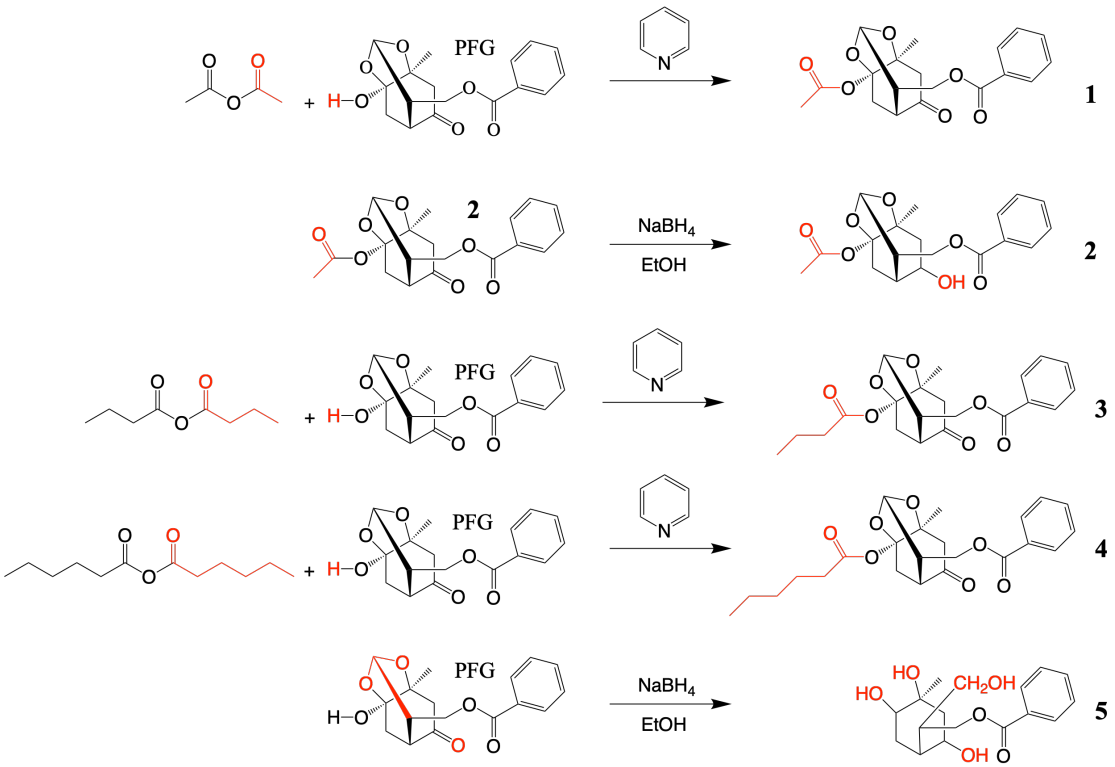


図 37　化合物 **1**～**5** の合成スキーム

6.　PFG誘導体のスペクトルデータ

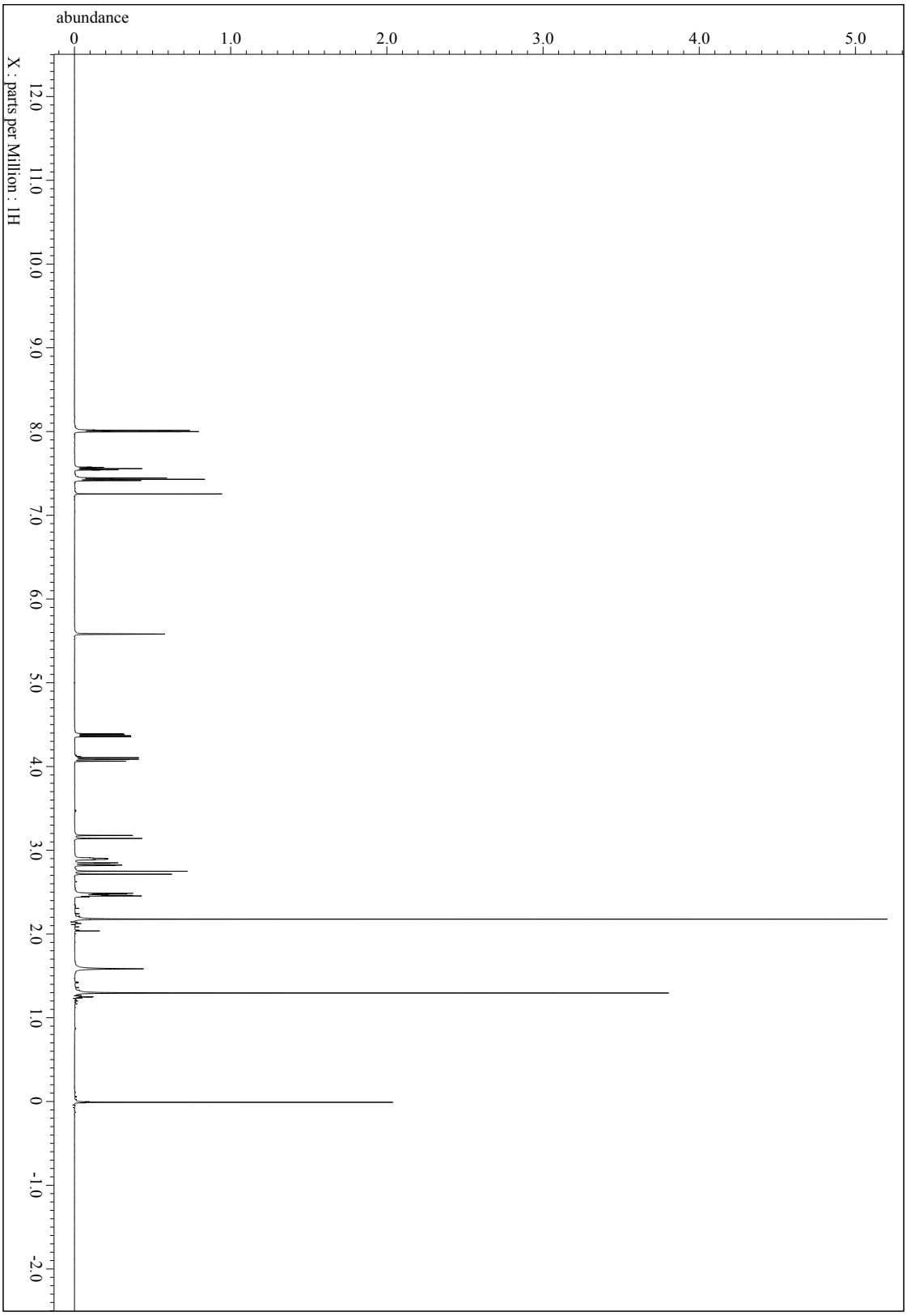


図 38　Ac-PFG (1)の ^{1}H-NMR スペクトル

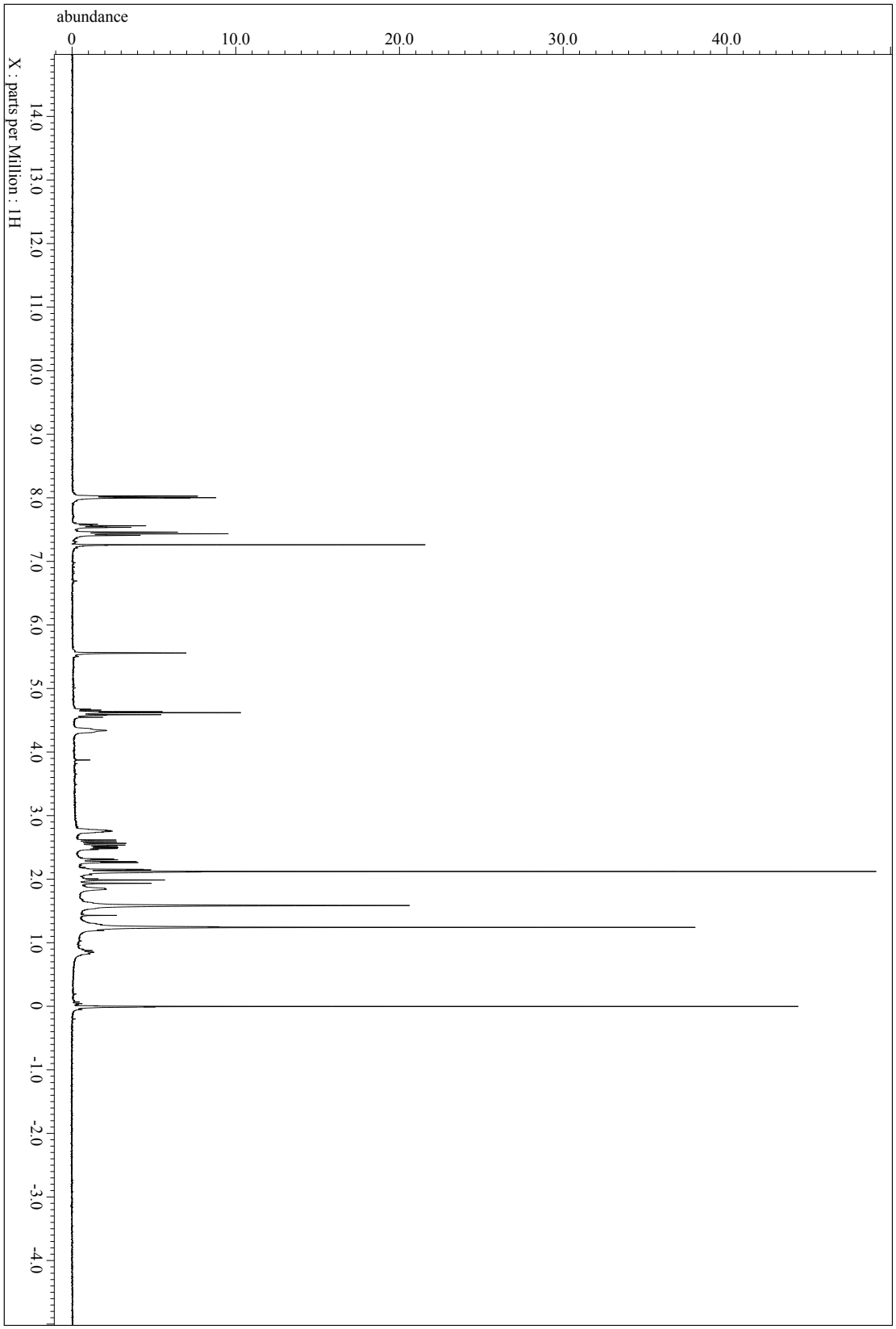


図 39　Ac-PFG-OH (2)の ^{1}H-NMR スペクトル

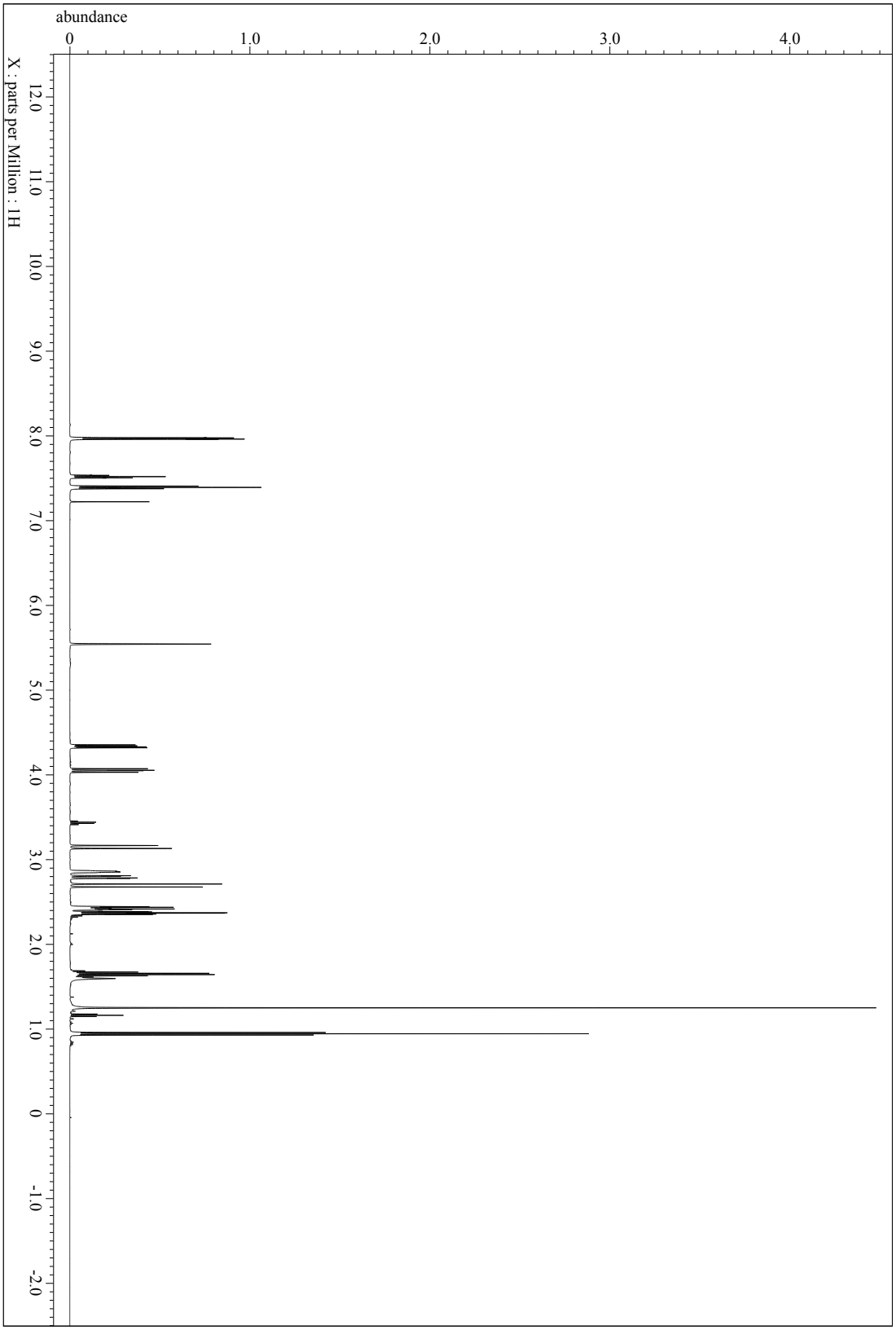


図 40　C_3CO-PFG (3)の ^{1}H-NMR スペクトル

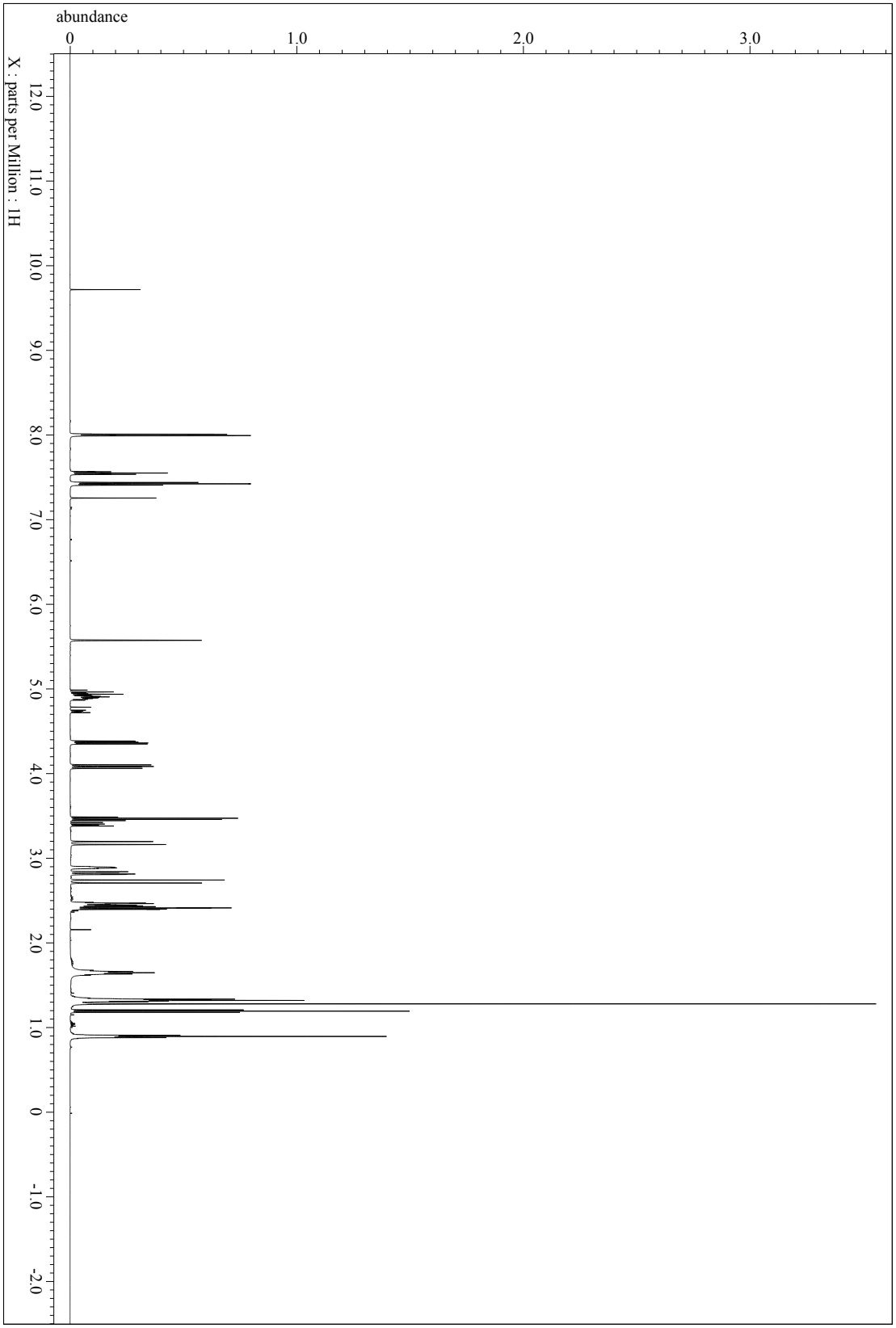


図 41　C_5CO-PFG (4)の ^{1}H-NMR スペクトル

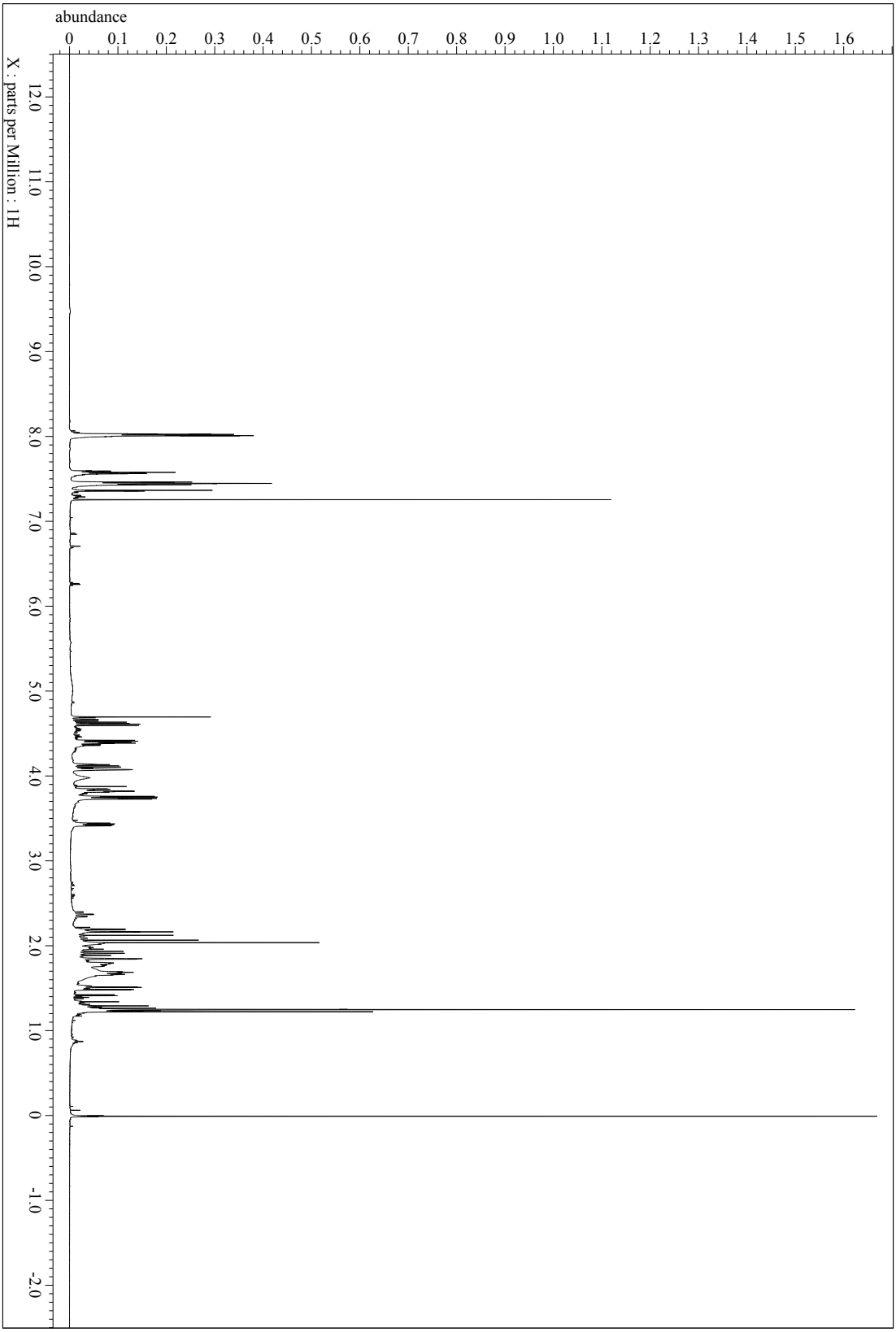


図 42　OH-PFG (5)の ^{1}H-NMR スペクトル

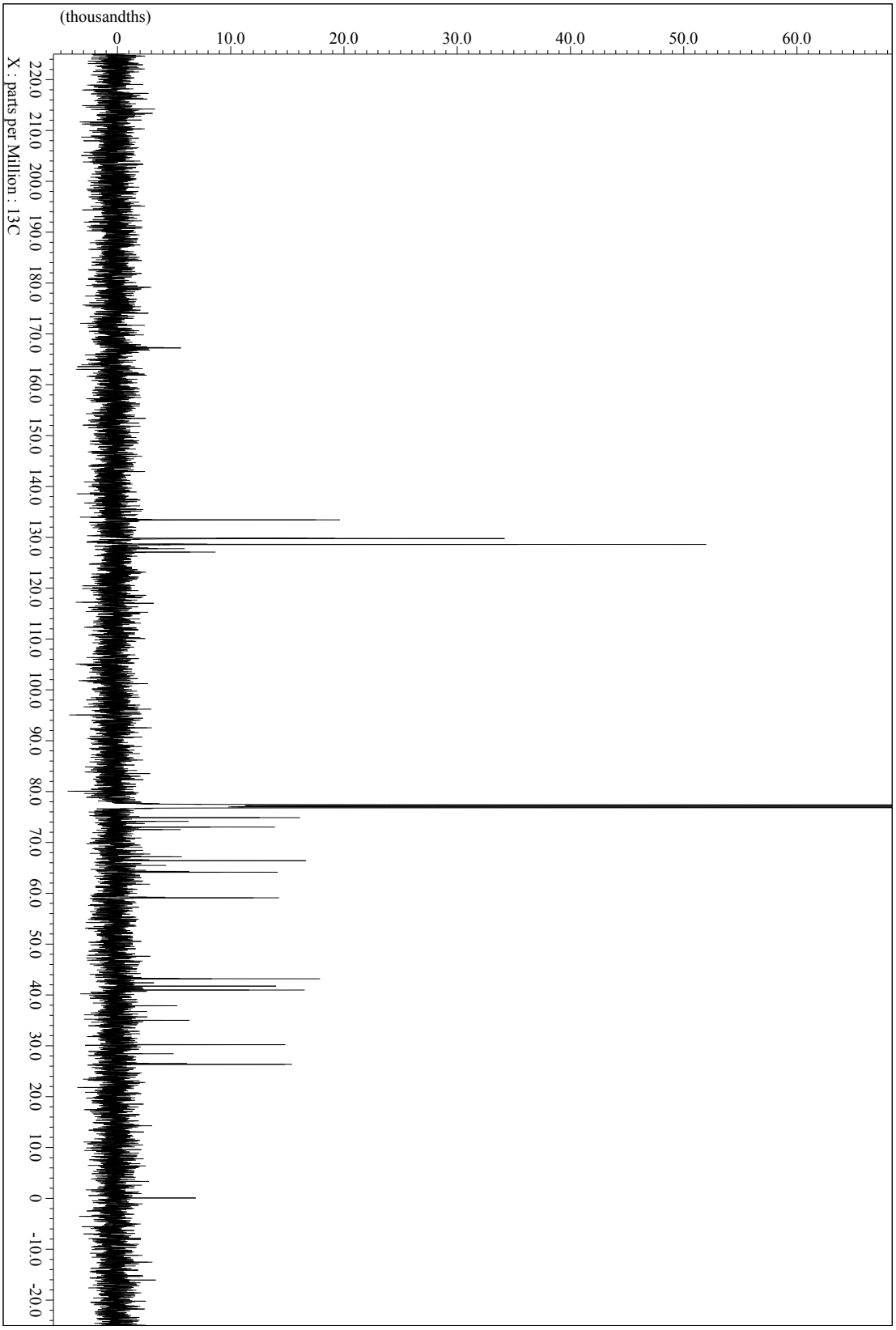


図 43　OH-PFG (5)の ^{13}C-NMR スペクトル

第三章

1. 細胞周期分析

9-cm^2ディッシュに細胞を20,000 cells/wellで播種し、PFGにより24-48時間で処理した。処理後の細胞をPBSで洗浄し、トリプシン/EDTAで浮遊化させ、遠心し、PBSで懸濁した。細胞液を70%EtOH(-20°C)で固定化し、-20°Cにて分析まで保存した。固定化された細胞をPBSで洗浄し、10 μg/mL RNaseにより37°C30分間処理した後に、PI(50μg/mL)で染色した。細胞をPBSで洗浄し、BD AccuriTM C6 Plus personal flow cytometer (BD Biosciences)により、細胞周期(DNAの量)を分析した。

2. 老化細胞検出試験

老化細胞は老化染色キット(Clontech Laboratories, Inc.)により評価した。24ウェルプレートに細胞を10000 cells/wellで播種し、化合物により24-72時間処理した。細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで15分間固定化した後に、PBSで2回洗浄した。そして、1 mg/mL X-galが含む染色液で17時間染色し、顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

3. 免疫蛍光染色

96ウェルプレートに細胞を5000 cells/wellで播種し、化合物により24-72時間処理した。細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで15分間固定化した。その後、細胞に0.3% Triton X-100を添加し、15分静置した後に、PBSで3回洗浄した。ウェルに3% BSA (in PBS)を添加し、1時間室温でブロッキングした後に、一次抗体の抗γH2AX antibody (1:1000; Invitrogen)を添加し、一晩4°Cで反応させた。その後、PBSで３回洗浄し、蛍光色素に結合する二次抗体FITC488 goat anti-mouse IgG (H + L) (1:500、Invitrogen)を添加し、1.5時間室温で反応させた。ウェルにFluoro-KEEPER Antifade Reagent containing DAPI (Nakarai tesque, Japan)一滴を滴下し、蛍光顕微鏡で観察を行った。5 foci以上の細胞はγH2AX focus-positiveと判断した [85]。

4. 活性酸素種の検出

PFGで72時間処理した細胞の活性酸素種のレベルを評価するために、処理後の細胞に、5 μM CellROX® Deep Red Reagent (Thermo Scientific)を添加し、37°Cで30分反応させた。その後、細胞をトリプシン/EDTAで浮遊化させて、PBSで洗浄し、フローサイトメトリーに(BD AccuriTM C6 Plus, BD Biosciences)より分析した。

5. PFGの抗酸化能の評価

細胞はPFGで1時間前培養した後に、PBSで3回洗浄して、酸化剤t-BHP 400 μMで１時間処理した。その後、細胞5 μM CellROX® Deep Red Reagent (Thermo Scientific)を添

加し、37°Cで1時間反応させた。その後、細胞をトリプシン/EDTAで浮遊化させて、PBSで洗浄し、フローサイトメトリー(BD AccuriTM C6 Plus, BD Biosciences)により分析した。

6. PFGのDPPHラジカル消去活性

96ウェルプレートに100 μL DPPHラジカル溶液(500 μM in EtOH)および80 μL MES buffer (pH 7.4)を添加し、20 μL のPFG(in EtOH)、trolox(in EtOH, positive control)およびEtOH(negative control)を入れて反応させた。反応開始後20分、4時間、8時間、12時間および24時間の時に各ウェルの吸光度(520 nm)を測定した。

参考文献

[1] Shoeb M. *Bangladesh J Pharmacol*. **2006**, 1, 35.

[2] Samuelsson G. Drugs of natural origin: A textbook of pharmacognosy. 4th ed., *Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press* **1999**.

[3] Leung AY, Janick J & Simon JE. *Chinese medicinalsAdvances in New Crops*.**1990**.

[4] Kappor LD. *CRC Press* **1990**, 416.

[5] Krueger RJ. Drugs of natural origin: A textbook of pharmacognosy. 5th ed., *Stockholm, Swedish Pharmaceutical Press*, **2005**.

[6] Yang B, Xu FY, Sun HJ, Zou Z, Shi XY, Ling CQ & Tang L. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. **2004**, 11, 101.

[7] Werneke U, Earl J, Seydel C, Horn O, Horn O, Crichton P & Fannon D. *Br J Cancer* **2004**, 90, 408.

[8] Bodeker G & Kronenberg F. *Am J Public Health* **2002**, 92, 1582

[9] Azaizeh H, Saad B, Cooper E & Said O. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2010,** 4, 419.

[10] Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD & Guo Z. *Bull World Health Organ* **1985**, 63, 965.

[11] Pan S, Zhou S, Gao S, Yu Z, Zhang S, Tang M, Sun J, Ma D, Han Y, Fong W & Ko K. *Evid Based Complement Alternat Med*. **2013**.

[12] Siegel RL & Miller KD. *CA Cancer J. Clin*. **2017**, 67, 7.

[13] 政府統計の総合窓口(e-Stat)（https://www.e-stat.go.jp/).

[14] American Cancer Society. Cancer facts & figures 2016. Atlanta, GA: American Cancer Society; **2016.**

[15] Siegel RL, Miller KD & Jemal A. *CA Cancer J Clin*. **2016**, 66, 7.

[16] Nwodo JN, Ibezim A, Simoben CV & Ntie-Kang F. *Anticancer Agents Med Chem*. **2016**, 16, 108.

[17] Habli Z, Toumieh G, Fatfat M, Rahal ON & Gali-Muhtasib H. *Gali-Muhtasib H Molecules* **2017**, 22, 2.

[18] Hartwell JL. Plants used against cancer: A survey. *Quarterman Publications* **1982**, 438.

[19] Alves-Silva JM, Romane A & Efferth T. *Salgueiro L. Front Pharmacol*. **2017**, 8, 383.

[20] Tariq A, Sadia S, Pan K, Ullah I, Mussarat S, Sun F, Abiodun OO, Batbaatar A, Li Z, Song D, Xiong Q, Ullah R, Khan S, Basnet BB, Kumar B, Islam R & Adnan M. *Phytother Res*. **2017**, 31, 202.

[21] Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, Tohme R & Darwiche N. *Apoptosis*. **2015**, 20, 1531.

[22] Greenwell, M & Rahman, PK. *Int J Pharm Sci Res*. **2015**, 6, 4103.

[23] Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK, Bedi YS, Taneja SC & Bhat HK. *Current Drug Metabolism published by national institute of health* **2008**, 9, 581.

[24] Kinghorn A, Douglas FH & Kobayashi JI. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 100, **2015**.

[25] Cragg GM, Newman DJ & Snader KM. *J Nat Prod*. **1997**, 60, 52.

[26] Cragg GM & Newman DJ. *J Ethnopharmacol*. **2005**, 100, 72.

[27] Newman DJ & Cragg GM. *J Nat Prod*. **2016**, 79, 629.

[28] Tewey KM, Rowe TC, Yang L, Halligan BD & Liu LF. *Science* **1984**, 226, 466.

[29] Di Marco A, Silvestrini R, Di Marco S & Dasdia T. *J Cell Biol*. **1965**., 27, 545.

[30] Yang F, Teves SS, Kemp CJ & Henikoff S. *Biochim Biophys Acta*. **2014**, 845, 84.

[31] Feinstein E, Canaani E & Weiner LM. *Biochemistry* **1993**, 32, 13156.

[32] Gigant B, Wang CG, Raimond BG, Raimond BG, Ravelli, Roussi F, Steinmetz MO, Curmi PA, Sobel A & Knossow M. *Nature* **2005**, 435, 7041.

[33] Akhtar MS & Swamy MK. Anticancer Plants: Clinical Trials and Nanotechnology. **2017**, 3.

[34] Mishra BB & Tiwari VK Eur. *J Med Chem*. **2011**, 46, 4769.

[35] Enioutina EY, Salis ER, Job KM, Gubarev MI, Krepkova LV & Sherwin CM. *Expert Rev Clin Pharmacol*. **2017**, 10, 327.

[36] Zhou X, Li CG, Chang D & Bensoussan A. *Medicines* **2019**, 6, 14.

[37] Zhu YP. Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications; *Harwood Academic: Amsterdam, The Netherlands*. **1998**.

[38] Ergil KV, Kramer EJ & Ng AT. *West. J. Med*. **2002**, 176, 275.

[39] Hsiao WL & Liu L. *Planta Med*. **2010**, 76, 1118.

[40] Zhang Y, Liang Y & He C. *Chin Med*. **2017**, 12, 20.

[41] Farrell MP & Kummar S. *Clin Colorectal Cancer* **2003**, 2, 253.

[42] Yen Y, So S, Rose M, Saif MW, Chu E, Liu SH, Foo A, Jiang Z, Su T & Cheng YC. *Anticancer Res.* **2009**, 29, 4083.

[43] Hu K & Yao X. *Planta Med* **2002**, 68, 297.

[44] Hsiao WL, Li YQ, Lee TL, You MM & S Chang ST. *Carcinogenesis*. **2004**, 25, 1177.

[45] Wu PK, Shing C, Tai, Liang ZT, Zhao ZZ & Hsiao L. *Life Sci*. **2009**, 85, 113.

[46] Kubo Y, Tani T, Kosoto H & Arichi S. *Shoyakugaku Zasshi* **1979**, 33, 155.

[47] Li Q. *Chin Trad Herb Drugs* **1988**, 19, 276.

[48] Hirai A, Terano T & Hamazaki T. *Thromb Res.* **1983**, 31, 29.

[49] Okubo T, Nagai F, Seto T, Satoh K, Ushiyama K & Kano I. *Biol Pharm Bull*. **2000**, 23, 199.

[50] Tanaka T, Kataoka M, Tsuboi N & Kouno I. *Chem Pharm Bull*. **2000**, 48, 201.

[51] Shimizu M, Hayashi T, Morita, Kikuchi K, Noguchi H, Inaka Y & Sankawa U. *Chem Pharm Bull.* **1983**, 31, 577.

[52] Papandreou V, Magiatis P, Kalpoutzakis E, Akaltsounis AL & Harvala CZ. *Z Naturforsch.* **2002**, 57, 235.

[53] Mencherini T, Picerno P, Festa M, Russo P, Capasso A & Aquino R. *J Nat Prod*. **2011**, 74, 116.

[54] Kimura M, Kimura I, Nojima H, Takahashi K, HAyashi T, Shimizu M & Morita N. Jpn *J Pharmacol*. **1984**, 35, 61.

[55] Duan WJ, Yang JY, Chen LX, Zhang LJ, Jiang ZH, Cai XD, Zhang X & Qiu F. *J Nat Prod*. **2009**, 72, 1579.

[56] Kong D & Yamori T. *Biooorg. Med.Chem*. **2012**, 20. 1947.

[57] Wyllie AH, Kerr JFR & Currie AR. *Int. Rev. Cytol.* **1980**, 68, 251.

[58] Nagata S. *Cell* **1997**, 88, 355.

[59] Earnshaw WC. *Curr. Opin. Cell Biol*. **1995**, 7, 337.

[60] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A & Nagata S. *Nature* **1998**, 391, 43.

[61] Sakahira H, Enari M & Nagata S. *Nature.* **1998**, 391, 96.

[62] Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM & Horvitz HR. *Cell* **1993**. 75, 641.

[63] Sugawara T, Fujimura M & Noshita N et al. *Neuro Rx*. **2004**, 1, 17.

[64] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, Kim GW, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM & Chan PH. *Clin Exp Pharmacol P.* **2008**, 35, 141.

[65] Deng LJ., Lei YH, Chiu TF, Qi M, Gan H, Zhang G, Peng ZD, Zhang DM, Chen YF & Chen JX. *Natural Product Communications.* **2019**.

[66] Zhang L & Zhang S. *Phytother. Res*. **2011**, 25, 1551.

[67] Cao G, Liu LM & Cleary SF. *Exp. Cell. Res*. **1991**, 193, 405.

[68] Harley CB, Futcher AB & Greider CW. *Nature* **1990**, 345, 458.

[69] Di Micco R, Cicalese A, Fumagalli M, Dobreva M, Verrecchia A, Pelicci PG & di Fagagna F. *Cell Cycle* **2008**, 7, 3601.

[70] Parrinello S, Samper E, Krtolica A, Goldstein J, Melov S & Campisi J. *Nat. Cell Biol* **2003**, 5, 741.”.

[71] Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D & Lowe SW. *Cell* **1997**, 88, 593.

[72] Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ & Peeper DS. *Genes Dev.* **2010**, 24, 2463.

[73] Narita M, Nu～nez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ & Lowe SW. *Cell* **2003**, 113, 703.

[74] Rozan LM & El-Deiry WS. *Cell Death Differ.* **2007**, 14, 3.

[75] Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA, Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C & Halazonetis TD. *Nature* **2005**, 434, 907.

[76] Kawabe, T. *Mol Cancer Ther.* **2004**, 3, 513.

[77] d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter

NP & Jackson SP. *Nature* **2003**, 426, 194.

[78] Jackson SP & Bartek J. *Nature* **2009**, 461, 1071.

[79] Ciccia A & Elledge SJ. *Mol. Cell* **2010**, 40, 179.

[80] Bartek J & Lukas J. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2007**, 19, 238.

[81] Medema RH & Macurek L. *Oncogene* **2012**, 31, 2601.

[82] Polo SE & Jackson SP. *Genes Dev.* **2011**, 25, 409.

[83] Zhou N, Xiao H, Li TK, Nur-E-Kamal A & Liu LF. *J Biol Chem*. **2003**, 278, 29532.

[84] Muriel P. *Hepatol Int*. **2009**, 3, 526.

[85] Auten RL & Davis JM. *Pediatr Res.* **2009**, 66, 121.

[86] Cheng WH, Muftic D, Muftuoglu M, Dawut L, Morris C, Helleday T, Shiloh Y & Bohr VA. *Mol Biol Cell* **2008**, 19, 3923.

[87] Circu ML & Aw TY. *Free Radicals Biol Med*. **2010**, 48, 749.

[88] Wang GL, Jiang BH, Rue EA & Semenza GL. *Proc Natl Acad Sci.* **1995**, 5510.

[89] Hirota K. *J Anesth*. **2002**, 16, 150.

[90] Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ & Mole DR. *Blood* **2011**, 117, 207.

[91] Majmundar AJ, Wong WJ & Simon MC. *Mol. Cell* **2001**, 40, 294.

[92] Tello D, Balsa E, Acosta-Iborra B, Fuertes-Yebra E, Elorza A, Ordóñez Á, Corral-Escariz M, Soro I, LópezBernardo E, Perales-Clemente E, Martínez-Ruiz A, Enríquez JA, Aragonés J, Cadenas S, & Landázuri MO. *Cell Metab*. **2011**,1.

[93] Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, Bussink J & Kaanders JH. *BMC Cancer* **2011**, 11, 167.

[94] Rey S & Semenza GL. *Cardiovasc. Res*. **2010**, 86, 236.

[95] Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL & Simons JW. *Cancer research* **1999**, 59, 5830.

[96] Brown JM & Wilson WR. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 437.

[97] Semenza GL. *Trends Mol. Med*. **2012**, 18, 534.

[98] Ji Z, Long H, Hu Y, Qiu X, Chen X, Li Z, Fan D, Ma B & Fan Q. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. **2010**, 29, 158.

[99] Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL & Dang CV. *J. Biol. Chem*. **2001**, 276, 7919.

[100] Harada H J. *Radiat. Res.***2011**, 52, 545.

[101] Meléndez-Rodríguez F, Urrutia AA, Lorendeau D, Rinaldi G, Roche O & Böğürcü-Seidel N. *Cell Rep*. **2019**, 26, 2257.

[102] Hubbi ME, Kshitiz Gilkes DM & Rey S et al. *Sci. Signal* **2013**, 6, 10.

[103] Hubbi ME, Luo W, Baek JH & Semenza GL. *Mol Cell* **2011**, 42, 700.

謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学研究科　生物機能化学研究室において、宮本憲二教授のご指導のもとに行ったものであり、ここに心より御礼申し上げます。日々の実験から研究の進め方、論文執筆まで貴重なお時間を割いて御指導いただき、海外で他分野にチャレンジする機会を与えていただいたお陰で、今後の研究活動の糧となる有意義な博士課程を送ることができました。

本論文を作成するにあたり、ご多忙のところ貴重なお時間を割いてくださいました慶應義塾大学理工学部　藤本ゆかり教授、慶應義塾大学理工学部　井本正哉教授、慶應義塾大学理工学部　清水史郎教授に厚く御礼申し上げます。

化合物の構造解析、細胞実験や論文執筆の御指導と御助言、そして日々暖かい励ましをくださいました慶應義塾大学理工学部　大野修助教（現工学院大学准教授）に厚く御礼申し上げます。本論文の細胞実験は大野助教の手厚く御指導によるものであり、深く感謝いたします。

化合物の構造決定に関して、NMR を貸与いただきました慶應義塾大学理工学部末永聖武教授に心より感謝致します。

標的分子の同定に関して、39 種のヒトがん細胞パネルスクリーニング試験を行っていただきました公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・分子薬理部旦慎吾博士、プロテインキナーゼ阻害の検定試験を行っていただきました国立感染症研究所・真菌部　深澤秀輔博士、EMT 制御活性試験を行っていただきました慶應義塾大学理工学部　井本正哉教授、低酸素誘導因子阻害活性の検定試験を行っていただきました京都大学大学院薬学研究科　掛谷秀昭教授、アンドロゲン受容体シグナル阻害活性試験を行っていただきました公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部　清宮啓之博士、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性試験を行っていただきました理化学研究所・吉田化学遺伝研究室　吉田稔博士に深く感謝いたします。

細胞実験御協力と御助力をいただきました慶應義塾大学理工学部　長谷純崇博士に心より御礼申し上げます。

標的分子の同定において、その試行錯誤の段階で惜しみない御指導と御助言を賜りました神奈川大学理学部　上村大輔教授、慶應義塾大学理工学部　吉田昭介助教（現奈良先端科学技術大学院大学准教授）、慶應義塾大学理工学部　岩崎有紘助教、慶應義塾大学理工学部　川上了史専任講師に御礼申し上げます。

宮本研究室の皆様には研究の御助言だけではなく、日々温かい励ましをいただきました。ここに心より御礼申し上げます。

また、国内外の学会で出会い切磋琢磨してきた友人達、惜しみない御助言や励ましをくださった先生方に、この場を借りて深く御礼申し上げます。

最後に、筆者の研究生活に支援を惜しまず、絶えず励まし支えてくれた夫　范靚、父　黄志林、母　郭明瑋、息子　范秋時に心から感謝致します。

黄穎