第一部：天然化合物の探索と活性評価

がん関連シグナル経路を標的とした植物由来天然物の探索

石橋正己

千葉大学大学院薬学研究院

がんはごく少数の自己複製能と多分化能をもつ細胞を頂点とする階層（ヒエラルキー）からなる不均一な細胞集団であり、この不均一性（ヘテロジェネティ）が治療抵抗性や再発の重要な要因となると認識されてきている。この頂点にあるごく少数の細胞（最近ではがん幹細胞と呼ばれている）は細胞周期の静止期にあるため、活発な細胞分裂を行うがん細胞を対象とした従来の抗がん剤や放射線治療には耐性を示し、生き残ることからがんの浸潤や再発を招く大きな要因となる。このようながんの進展と再発の制御に必須な細胞内シグナルとして、ウイント（Wnt）、ヘッジホッグ（Hh）、およびノッチ（Notch）シグナルなどが知られている^(1,2)。これらのシグナルは、正常な幹細胞の自己複製、胚の発生、分化、成人組織再生などにおいて重要な役割を担う一方で、がんの不均一性や治療抵抗性の解明と攻略に深くかかわっており、今まさに創薬標的としての開発が盛んに進められている。

当研究室では、がんの進展と再発を制御する細胞内シグナルを標的として天然物および天然物基盤化合物ライブラリーよりスクリーニングを行い、有用な低分子化合物を開拓することを目的とした研究を行っている。特に最近では、がん細胞の治療抵抗性の要因となる自己複製能と多分化能の獲得に必須な細胞内シグナルとして知られるWnt、Hhなど、およびがん細胞選択的にアポトーシスを誘導するデスリガンド・トレイル（TRAIL: TNF-

Related Apoptosis Inducing Ligand）を対象とし、活性化合物（低分子天然物）の探索、合成化合物ライブラリー構築、細胞アッセイ、細胞応答解析、活性作用発現に関する分子機構の解析などの一連の包括的研究（いわゆるケミカルバイオロジー研究）を展開し、それを通して、創薬・生命科学の進展に寄与する高活性低分子資源の創出を目指している⁽³⁾。天然物スクリーニング研究を行うための探索材料としては、日本国内で収集した変形菌⁽⁴⁾、日本国内の土壌や海水・海泥から採取した放線菌⁽⁵⁾、タイやバングラデシュ産の薬用植物など種々の天然資源を用いている。本稿では、植物由来成分を中心に、主にがんに関連するシグナル伝達経路に作用する化合物の探索について紹介する。

植物材料の調査・収集

天然物探索研究を行うには対象とする植物材料の調査・収集を行うことが必要である。当研究室ではこれまでに、タイおよびバングラデシュ産植物材料の調査・収集を行ってきた。タイでは東北部コンケン地方⁽⁶⁾、バングラデシュでは南部クルナ地区を中心に、いずれも現地研究者との長期にわたる国際共同研究により当研究室独自のサンプルコレクションを作成してきた⁽⁷⁾。現地住民に伝承される薬用植物に関する情報も尊重しつつ、カウンターパート研究者の努力によりこれまで数百種に及ぶ

植物を収集し抽出エキスを作成してきた。これら植物サンプルを有効に活用して、天然物探索研究を行っている。以下に、がんに関連するTRAIL, Wnt, Hhシグナルについて、この順に、当研究室で行っているスクリーニング研究の最近の結果を紹介する。

TRAIL

一般に、治療薬は標的とする細胞を選択的に傷害し、ほかの正常な細胞には影響しないものが望ましい。正常細胞の傷害を最小限に抑えるには、がん細胞で特異的に発現または機能している分子をターゲットとして選び、がん細胞の生存や増殖を維持するために必要な分子機構に狙いを定めることで高い有効性が得られると考えられる。TRAILは、デスリガンドと呼ばれるアポトーシス誘導タンパク質因子の一つであり、TRAILとその受容体であるデスレセプターを介したシグナル伝達経路は、種々のがん細胞にアポトーシスを誘導するのに対して、正常細胞には影響を与えないことが知られている。デスレセプターのうち、がん細胞に多く発現しているデスレセプターDR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5) は、デスドメインを有していることから、下流へアポトーシスシグナルを伝達することができる。一方、正常細胞においては、デスドメインをもたないTRAILレセプターであるデコイレセプター (DcR1, DcR2) が多く発現していることから、TRAILは正常細胞に傷害を与えることなくがん細胞選択的にアポトーシスを起こすことができる。したがって、TRAILシグナル経路は新たながん治療の標的として注目されている⁽⁸⁾。

しかしながら、その一方で、最近、胃がん、乳がん、肺がん細胞などの一部がTRAILに対して耐性を示すことが明らかとなり、TRAILの有効性の低下が問題となっている。このTRAILに対する耐性は、デスレセプターの発現の低下、アポトーシス誘導因子の発現現象、アポトーシス阻害因子の発現上昇などにより獲得される。TRAIL耐性を克服するためには、TRAILの感受性を高めることが有効であると考えられる。そこで、当研究室ではTRAILシグナル経路を活性化し、がん選択的アポトーシスを誘導する低分子化合物の創製を目的として、2つのスクリーニング研究を行った^(9,10)。一つはDR5の発現誘導作用、もう一つはTRAIL耐性克服作用を示す化合物のスクリーニングである。いずれも、化合物自身ががん細胞を傷害するのではなく、化合物がTRAILの働きを強化する(励ます)ことにより、

TRAIL本来の能力をフルに発揮させてがん細胞選択的に傷害を与えることを狙ったものである。

1. DR5の発現誘導作用に関するスクリーニング

デスレセプターの発現低下によりTRAILに対する耐性を獲得したがん細胞においては、デスレセプターの発現を上昇させれば、TRAILを併用処理すればTRAILへの感受性を高めることが可能となり、TRAIL誘導性のアポトーシスが增強されると期待される。そこでデスレセプターの一つであるDR5に着目し、DR5発現誘導作用をもつ天然物の探索を行った。スクリーニングには、DR5プロモーター領域およびルシフェラーゼ遺伝子を安定発現させたヒト大腸がん細胞株(DLD-1/SacI)を用いたルシフェラーゼアッセイシステムを用いた。このアッセイシステムでは試料によりDR5プロモーターが活性化されれば、DR5プロモーターの下流にコードされているルシフェラーゼが発現し、化学発光量が増大する。本システムを用いて、以前にもマメ科植物よりイソフラボン類⁽¹¹⁾、ショウガ科植物よりカルコン⁽¹²⁾などを単離していた。その後のスクリーニングにより良好な活性を示した植物抽出エキス2種について活性成分の探索を行った。

まず、タイ産シクンシ科*Combretum quadrangulare* 葉部からは新規シクロアルタン型トリテルペン9種および既知のジメトキシフラボノイドなどを単離した⁽¹³⁾。これらのうち、新規化合物combretanone G (**1**, 35 μ M), combretic acid B (**2**, 35 μ M), および既知化合物(**3**, 70 μ M) は各々2.5, 1.7, 6.7倍の活性上昇を示し、比較的顕著なDR5誘導作用をもつことが判明した(図1)。またこれらのうち特に化合物**3**はTRAILに耐性をもつヒト胃がんAGS細胞に対してTRAIL耐性克服作用を示した。すなわち、化合物**3** (12.5または17.5 μ M) をTRAIL (100 ng/mL) と併用すると化合物**3**のみを用いたときと比較してAGS細胞の細胞生存率を各々27.5%および24%より大きく低下させた。

一方、タイ産トウダイグサ科*Euphorbia neriifolia* 葉部からは新規シクロアルタン型トリテルペン7種(**4**など)、新規インゴールジテルペン(**5**)、および数種の既知化合物を単離した⁽¹⁴⁾。このうち化合物**4**および**5**は、2.2 μ Mにおいて各々7.5, 4.1倍の活性上昇を示し、比較的強いDR5誘導作用をもつことが判明した。

2. TRAIL耐性克服作用に関するスクリーニング

TRAILに対する耐性を克服するための戦略としては、上記のDR5のようなデスレセプターの発現を誘導する

図1 ■ DR5プロモーター活性に関するスクリーニングにより得られた天然物

図2 ■ TRAIL耐性克服作用に関するスクリーニングにより得られた天然物

方法以外にも、アポトーシス阻害因子（c-FLIP, Bcl-2 など）の抑制，アポトーシス促進因子（Bak, Bax など）の機能回復・発現亢進，デコイレセプターの発現抑制などの手法も考えられる．またそれらの複合的な効果により TRAIL への感受性が増大することも期待される．そこで，もう一つのスクリーニングとして次のような TRAIL 耐性細胞を用いる方法を取り入れた．TRAIL 耐性ヒト胃がん細胞株（AGS）を用い，試料単独ならびに試料と TRAIL とを併用処理した際の細胞生存率を比較することで評価した．すなわち試料単独処理に比べ，TRAIL との併用処理により細胞生存率が顕著に低下した場合，TRAIL 耐性克服作用をもつと判断した⁽¹⁵⁾．本方法により活性ありと判定された数種の植物について活性成分の探索を行った．

バングラデシュ産センダン科 *Amoora cucullata* 葉部のメタノール抽出物について上記活性試験を指標として分画を行った結果，新規化合物4種を含む11種の化合物を単離した（図2）．このうち新規化合物6および既知化合物（7～9）は比較的強い TRAIL 耐性克服作用を示した．特に化合物7（1-*O*-formylrocagloic acid）は1～

2 nM の低濃度にて TRAIL 耐性克服作用を示したが，がん細胞ではない293Tヒト胎児腎細胞に対しては試料単独，TRAIL との併用処理のいずれにおいても細胞生存率の低下を示さなかった．また7は，AGS細胞において TRAIL との併用処理により濃度依存的なカスパーゼ3/7の活性化およびヘキスト染色像におけるクロマチンの凝縮を示したことより，アポトーシスを引き起こしていることが判明した．併せて，デスレセプター発現についてリアルタイムPCR法による検討を行った結果，試料添加3時間において DR4, DR5 mRNA の発現上昇が認められた．さらに，DR4, DR5 のドミナントネガティブである DR4/Fc, DR5/Fc キメラタンパク質の添加実験により，TRAIL との併用による細胞生存率の低下が抑制された．以上のことから，化合物7の TRAIL 耐性克服作用には，デスレセプターの発現誘導が関与することが示唆された⁽¹⁶⁾．

タイ・コンケン地区で採取したクワ科 *Artocarpus champeden* の根部をメタノールにて抽出し，得られた抽出物についてヘキサン，酢酸エチル，*n*-ブタノールを用いて溶媒分配を行った．これらのうち酢酸エチル可溶

画分に顕著な活性が認められたため、本画分からシリカゲル、ODS (octadecylsilane)、セファデックス LH-20 を用いたカラムクロマトグラフィー、および逆相 HPLC を用いて分離精製を行い、6種のプレニルフラボン (**10** ~ **15**) を単離し、スペクトルデータに基づきこれらの構造を明らかにした (図2)。その結果、このうちの3種 (**10** ~ **12**) は新規化合物であった。単離した6種の化合物について TRAIL 耐性克服作用を検討したところ、特に化合物 **11**, **14**, および **15** に活性が認められた。特に **15** ($4\mu\text{M}$) は試料単独処理と比較して、TRAIL (100 ng/mL) を併用処理することにより細胞生存率を34%低下させた。次に化合物 **15** の処理による AGS 細胞のカスパーゼ活性の変化を測定したところ、未処理群と比較して6倍以上のカスパーゼ3/7活性の増強が見られた。また化合物 **15** と TRAIL を併用し、さらにカスパーゼ阻害剤を追加処理したところ、化合物 **15** と TRAIL との併用による細胞生存率の低下は打ち消された。同様に、化合物 **15** と TRAIL を併用し、さらに DR5/Fc キメラタンパク質または DR4/Fc キメラタンパク質を追加処理したところ、化合物 **15** と TRAIL との併用による細胞生存率の低下は打ち消された。さらに、リアルタイム PCR 解析により、化合物 **15** は $4\mu\text{M}$ において DR4 の mRNA 発現量を約1.8倍、DR5 の mRNA 発現量を約3.7倍、 $3\mu\text{M}$ において DR5 の上流因子である CHOP (CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein) の mRNA 発現量を約5.5倍上昇させることがわかった。これらの結果より、化合物 **15** は DR5, DR4 を介して、カスパーゼを活性化させ、アポトーシスを誘導することが示唆された⁽¹⁷⁾。

Wnt

Wnt は350 ~ 400 アミノ酸からなる分泌性の糖タンパク質であり、この Wnt リガンドタンパク質が Frizzled と LRP (low density lipoprotein receptor-related) 5/6 からなる受容体に結合すると、細胞内の β -カテニンが安定化する。細胞質に蓄積された β -カテニンは核内へ移行し転写因子である TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor) と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。Wnt シグナル経路は、初期発生のパターニング、細胞極性、細胞運動、細胞分裂、器官形成など非常に多くの生命現象にかかわっているが、一方で、がんをはじめとするさまざまな疾患の発症にも深く関与することが明らかとなっている⁽¹⁸⁾。また最近では Wnt/ β -カテニン経路の恒常的活性化が乳がん幹細胞や

白血病幹細胞の成立や維持、自己複製に重要な役割を果たしていると報告されている⁽¹⁹⁾。このような背景から、Wnt シグナルを制御する新たな低分子化合物が開発できれば、これら生命システムにかかわる基礎研究およびがんをはじめとする疾患治療薬や生活改善薬の創製へ大きく貢献することが期待される。

当研究室では、特に β -カテニンを介する本シグナル経路に着目し、本経路を阻害または活性化する天然物のスクリーニング研究を行っている。スクリーニングには本経路における転写因子 TCF に対する結合部位 (CCT TTG ATC) をもつルシフェラーゼレポータープラスミド SuperTOP-Flash を安定的に導入した細胞 (STF/293 細胞) を用い、試料添加時のルシフェラーゼ活性を測定することにより転写活性を評価する。なお、変異した TCF 結合部位 (CCT TTG GCC) をもつレポータープラスミド SuperFOP-Flash を導入した細胞を用いた試験も行い、こちらのルシフェラーゼ活性には影響を及ぼさない試料を TCF 転写活性に対して選択的に作用するものと判断している。

スクリーニングの結果、転写阻害活性を示したアヤメ科 *Eleutherine palmifolia* の抽出物より新規化合物 eleutherinoside B (**16**) およびそのアグリコン **17** をはじめとする数種のナフトレン化合物を単離した (図3)。これらは選択的な TCF 転写阻害活性を示した。化合物 **17** による β -カテニン、TCF および転写の標的タンパクの一つである c-myc の発現量の変化についてヒト大腸がん細胞 SW480 を用いて検討した結果、TCF 転写阻害活性が認められた $10\mu\text{g/mL}$ で c-myc の減少が確認された。また、核内の β -カテニンの減少が認められる一方、細胞質内の β -カテニンには変化が認められなかった。したがって化合物 **17** による TCF 転写阻害作用は核内の β -カテニン量の減少によることが示唆された。また **16** と **17** は Wnt シグナルが亢進しているヒト大腸がん細胞 (SW480, HCT116, DLD1) に対して顕著な細胞毒性を示したが、ヒト腎臓上皮細胞 293T に対する細胞毒性は低かった⁽²⁰⁾。

バングラデシュ産センダン科植物 *Xylocarpus granatum* の葉部の MeOH エキスについて溶媒分配を行い、活性の認められたヘキサン可溶部について、上記の活性試験を指標としてシリカゲル、ODS カラムなどを用いて分画を行った。その結果、新規化合物 xylogranin A, B (**18**, **19**) を含む4種の化合物を単離し、NMR, MS などの各種スペクトルデータの解析に基づき、これらの構造を決定した (図3)。単離した化合物について TCF/ β -カテニン転写阻害活性を検討したところ、**19** と **20** は

IC₅₀がそれぞれ48.9, 54.2 nMという非常に強いTCF/ β -カテニン転写阻害活性をもつことが判明した。一方、化合物**18**は活性を示さなかった。化合物**19**と**20**にはオルソエステル基が含まれるが化合物**18**には含まれない。化合物**19**（または**20**）と化合物**18**では、DFT計算による安定構造も異なっていたため活性との相関が示唆された。強力なWntシグナル阻害活性を有していた**19**について、ヒト大腸がん細胞（SW480細胞）を用いて、本シグナルの転写活性化因子である β -カテニンのタンパク質の発現量を検討したところ、細胞全体、細胞質では顕著な変化は認められなかったが、核内において β -カテニンの濃度依存的な減少が見られた。また、免疫染色法によりSW480細胞における β -カテニンの局在変化を検討したところ、化合物未処理群では核内にも存在した β -カテニンが化合物添加により核内から消失している傾向が認められた。したがって、**19**は核内の β -カテニンを減少させる作用をもつことがわかった。次に**19**によるWntシグナルの標的遺伝子である*c-myc*、*PPAR δ* の発現量の影響を検討した。まず、ウエスタンブロット法により、標的遺伝子産物の発現量を検討したところ、200 nMの濃度で*c-myc*は細胞全体、核内において、*PPAR*（peroxisome proliferator-activated receptor） δ は核内において減少が見られた。また、mRNAの発現量をリアルタイムPCR法により検討したところ、*c-myc*は化合物添加により低濃度では上昇したが、200 nMの濃度では減少し、また、*PPAR δ* も200 nMの濃度で減少した。したがって、**19**はWntシグナルの標的遺伝子の発現をmRNAレベルで抑制することが示された⁽²¹⁾。

バングラデシュ産ガガイモ科植物*Calotropis gigantea*の滲出液メタノールエキスを溶媒分配し、活性が認められた酢酸エチル可溶部について上記の活性試験を指標として、シリカゲル、ODSカラムによる分画を行った。その結果calotropin (**22**) (図3)を含む6種のカルデノリド類を単離し、NMRおよびMSスペクトルデータの解析および文献値との比較によりそれぞれの構造を決定した。単離した化合物を用いてTCF/ β -カテニン転写阻害活性を行ったところ、こらら6種の化合物はnM単位の強力なTCF/ β -カテニン転写阻害活性をもつことが判明した (IC₅₀ 0.7 ~ 3.8 nM)。特にcalotropin (**22**) のIC₅₀値は1.3 nMであった。また化合物**22**は3種のWntシグナル依存性ヒト大腸がん細胞 (DLD1, HCT116, SW480) に対して顕著な細胞毒性 (IC₅₀値2.0 ~ 2.8 nM) を示したがWntシグナル非依存性大腸がん細胞 (RKO) に対する細胞毒性は弱かった (IC₅₀値> 10 nM) ため、細胞毒性とWntシグナル阻害作用との関連が示唆され

た。次に、単離した化合物のうち、**22**が大腸がんSW480細胞においてWntシグナルの転写活性化因子である β -カテニンと標的遺伝子である*c-myc*のタンパク質の発現量へ及ぼす影響を検討した。その結果、**22**により β -カテニンのタンパク質量は細胞全体、核、細胞質で濃度依存的に減少することが認められた。また、標的遺伝子である*c-myc*の減少も確認された。しかし、**22**とプロテアソーム阻害剤であるMG-132と併用すると、 β -カテニンの減少は認められなかった。さらに**22**の添加により β -カテニンの分解シグナルであるCK1 α (casein kinase 1 α) およびGSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) による β -カテニンのリン酸化の促進が認められ、**22**は、 β -カテニンのリン酸化を促進することにより、その分解を促進することが示唆された。**22**により促進されたGSK3 β による β -カテニンのリン酸化はGSK3 β 阻害剤であるLiClの処理により抑制されたが、CK1 α によるリン酸化は抑制されなかった。また、促進されたCK1 α とGSK3 β による β -カテニンのリン酸化は、CK1 α 阻害剤であるCKI-7の添加により抑制された。またCK1 α RNAiにより β -カテニンの分解も抑制された。このことから**22**はCK1 α のタンパク質量の増加を誘導することで、 β -カテニンのリン酸化およびプロテアソーム系での分解を促進し、その結果、Wntシグナルを抑制することが示唆された⁽²²⁾。

一方、スクリーニングによりWntシグナル活性化作用を示す植物エキスも見いだされた。バングラデシュ産トウダイグサ科植物*Excoecaria indica*の葉部抽出物からは α -sapinine (**23**) (図3)を含むフォルボールエステルを3種単離した⁽²³⁾。**23**は95 nMの濃度でTCF転写活性を25倍増強させた。がん関連ではないが、たとえば、骨粗鬆症ではWntシグナルの低下が骨量の低下の主因であり、Wnt活性を増強させれば改善が期待される。またWnt活性化により幹細胞維持、分化に役立つ可能性もある。したがって、Wntシグナル活性化作用を示す低分子化合物についても、幹細胞研究や疾患治療への応用が期待される⁽²⁴⁾。

Hh

ヘッジホッグ (hedgehog; Hh) は分泌タンパク質であり、N末端断片がコレステロールとパルミチン酸の脂質修飾を受けて細胞外に放出される。放出されたHhは標的細胞の膜タンパク質であるPtch (Patched) に結合し、Ptchは同じく膜タンパク質であるSmo (Smooth-end) の抑制を解除し、Smoが細胞質内にシグナルを伝

図3 ■ Wntシグナルに関するスクリーニングにより得られた天然物

達する。その結果、Gli (glioma-associated oncogene homologue) ファミリー転写因子の核内移行を促し、標的遺伝子の転写を活性化する。Hhシグナル伝達経路は、胚発生と生体の恒常性のさまざまな過程を制御しており、組織・器官のパターン形成、細胞増殖、細胞分化、細胞移動、左右対非対称性の決定、幹細胞維持など、時間と場所に依存する重要な役割を果たしている。一方で本シグナルはがん、細胞増殖性疾患、神経障害、骨形成異常などにも関与することが報告されており、Hhシグナル経路を標的とした治療剤の開発が進んできている⁽²⁵⁾。これまでにSmo阻害剤としてユリ科コバイケイソウ（小梅蕙草）に含まれるステロイドアルカロイドcyclopamineなどが知られており、また転写因子GLIを阻害する合成化合物なども数種報告されている。2012年にはSmo阻害剤vismodegibが基底細胞がん治療薬として米国で承認された⁽²⁶⁾。

当研究室では本経路における転写因子Gli1の転写活性に関する細胞アッセイ系を構築した。まずプロモーター部に12個のGli結合部位（GAC CAC CCA）を有し、その下流にルシフェラーゼをコードする配列をもつレポーターベクターを作成した。次に本ベクターをテトラサイクリン（Tc）の添加によってGli1が発現する細胞（T-Rexシステム）に安定的に遺伝子導入した。樹立した細胞ではTcの添加によりGli1の増加に伴ってルシフェラーゼの発現が増大した。本細胞アッセイ系を用いてスクリーニングを行った結果、活性を示した数種の植物エキスから単離した活性成分について以下に紹介する。

ナス科ホウズキ属 *Physalis minima* のメタノール抽出

図4 ■ Hhシグナルに関するスクリーニングにより得られた天然物

物のヘキサンおよび酢酸エチル可溶画分から酸化分解型ステロイドphysalin F (24) およびB (25) を単離した(図4)。これらの転写阻害活性のIC₅₀値は各々0.66および0.62 μMであった。転写因子Gliの標的としてHhシグナル関連遺伝子 *Ptch* やアポトーシス関連遺伝子 *Bcl2* などが知られている。Gli1を過剰発現させた細胞に化合物24および25を作用させたところ、*Ptch* と *Bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma-2) のタンパク質発現量が減少することが明らかとなった。またHhシグナルが異常亢進している膵臓がん細胞PANC1においても化合物24および25は *Ptch* のタンパク質およびmRNAの発現を抑制した。また、これらの化合物はHhシグナルが亢進しているPANC1細胞および前立腺がん細胞DU145に対して顕

著な細胞毒性を示した⁽²⁷⁾。

バングラデシュ・シュンドルボーン地区で採取したトウダイグサ科 *Excoecaria agallocha* (現地名, Gewa) の地上部のメタノールエキス (20.5 g) について溶媒分配を行い、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、および水可溶画分を得た。Hh シグナル阻害作用が認められた酢酸エチル可溶画分に対して ODS およびシリカゲルカラムクロマトグラフィー、つづいて分取 HPLC を行い、活性成分として化合物 **26** を単離した (図4)。本化合物は各種スペクトルデータや加水分解実験の結果に基づき、3-O-メチル-L-ラムノースを含む新規フラボノイド配糖体であることが判明し、gewain と命名した。**26** は顕著な Gli1 転写阻害活性 (IC_{50} 0.5 μ M) を示し、Hh シグナルが亢進している PANC1 細胞 (IC_{50} 0.7 μ M) や DU145 細胞 (IC_{50} 0.8 μ M) に対して強い細胞毒性を示したが対照とした C3H10T1/2 細胞に対する細胞毒性は低かった ($IC_{50} > 100 \mu$ M)。**26** は PANC1 細胞において、Hh シグナルの標的タンパク質である Ptch や Bcl2 を減少させ、またその一方で、核内の Gli1 タンパク質を減少させた。このことから **26** は Gli1 タンパク質の細胞質から核への移行を阻害したと推定された。また化合物 **26** は siRNA により Smo をノックダウンした状態でも、Hh の標的遺伝子である Ptch の mRNA を減少させた。このことから、化合物 **26** による Hh シグナルの阻害は Smo とは無関係 (Smo 非依存的) に起こっていることが示唆された⁽²⁸⁾。

一方、バングラデシュ産クマツヅラ科植物 *Vitex negundo* (現地名, Nishinda) の葉部について活性成分の探索を行い、新規化合物 nishindanol (**27**) を含む9種のジテルペンやフラボノイド化合物を単離した (図4)。そのうち特に **27** や関連するジテルペン化合物 vitetrifolin D (**28**) などは顕著な Gli1 転写阻害活性を示した。これらは Hh シグナルが亢進しているがん細胞 (PANC1, DU145) に対して細胞毒性を示したが、比較対照細胞 (C3H10T1/2) に対する細胞毒性は弱かった。また顕著な活性を示した化合物 **28** は Hh シグナルで制御されているタンパク質 (Ptch や Bcl2) のタンパク質レベルを低下させることがウェスタンブロット実験の結果明らかとなった。また **28** はゲルシフトアッセイの結果、転写因子 Gli1 と DNA 結合サイトとの間の結合を阻害することが判明した⁽²⁹⁾。

おわりに

当研究室では、上述のシグナル伝達経路のほか、幹細

胞の分化および維持増殖にかかわる bHLH 転写因子についても標的として取り上げ、植物成分および放線菌を対象とした活性成分のスクリーニングを行っている⁽³⁰⁾。また一方で、天然物をモチーフとした多様性指向型合成にも取り組んでおり、スクリーニングに活用している⁽³¹⁾。このように今後も植物成分をはじめとする天然物および天然物基盤合成化合物を対象として、種々のシグナル分子に作用するスクリーニングを継続して行い、有用な活性低分子化合物の発見ならびに創製を行ってきたい。

謝辞：本研究は、千葉大学大学院薬学研究院活性構造化学研究室で行われたものであり、荒井 緑准教授、當銘一文助教をはじめとする研究室メンバーの努力に深く感謝します。また、本研究の遂行に当たりご支援を賜りました日本学術振興会科学研究費 (新学術領域研究、基盤研究、挑戦的萌芽研究)、東京生化学研究会、および上原記念生命科学財団に感謝いたします。

文献

- 1) 小沼貴晶, 岩間厚志: 実験医学, **29**, 3281 (2011).
- 2) N. Takebe, P. J. Harris, R. Q. Warren & S. P. Ivy: *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **8**, 97 (2011).
- 3) M. Ishibashi & M. A. Arai: 有機合成化学協会誌, **67**, 1094 (2009).
- 4) M. Ishibashi & M. A. Arai: *Heterocycles*, **85**, 1299 (2012).
- 5) 石橋正己: *Jap. J. Antibiot.*, **66**, 169 (2013).
- 6) M. Ishibashi, K. Toume, Y. Yamaguchi & T. Ohtsuki: *Recent Research Developments in Phytochemistry*, **8**, 139 (2004).
- 7) F. Ahmed, S. K. Sadhu & M. Ishibashi: *J. Nat. Med.*, **64**, 393 (2010).
- 8) C. T. Hellwig & M. Rehm: *Mol. Cancer Ther.*, **11**, 3 (2012).
- 9) 大槻 崇, 菊地博之, 石橋正己: 化学と生物, **47**, 630 (2009).
- 10) M. Ishibashi & T. Ohtsuki: *Med. Res. Rev.*, **28**, 688 (2008).
- 11) H. Kikuchi, T. Ohtsuki, T. Koyano, T. Kowithayakorn, T. Sakai & M. Ishibashi: *J. Nat. Prod.*, **70**, 1910 (2007).
- 12) T. Ohtsuki, H. Kikuchi, T. Koyano, T. Kowithayakorn, T. Sakai & M. Ishibashi: *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 6748 (2009).
- 13) K. Toume, T. Nakazawa, T. Ohtsuki, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *J. Nat. Prod.*, **74**, 249 (2011).
- 14) K. Toume, T. Nakazawa, H. Tahmina, T. Ohtsuki, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *Planta Med.*, **78**, 1370 (2012).
- 15) F. Ahmed, T. Ohtsuki, W. Aida & M. Ishibashi: *J. Nat. Prod.*, **71**, 1963 (2008).
- 16) F. Ahmed, K. Toume, S. K. Sadhu, T. Ohtsuki, M. A. Arai & M. Ishibashi: *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 3696 (2010).
- 17) T. Minakawa, K. Toume, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *Phytochemistry*, **96**, 299 (2013).
- 18) J. N. Anastas & R. T. Moon: *Nat. Rev. Cancer*, **13**, 11 (2013).
- 19) 南 晶洋, 下野洋平: 実験医学, **29**, 3247 (2011).

- 20) X. Li, T. Ohtsuki, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *Chem. Asian J.*, **4**, 540 (2009).
- 21) K. Toume, K. Kamiya, M. A. Arai, N. Mori, S. K. Sadhu, F. Ahmed & M. Ishibashi: *Org. Lett.*, **15**, 6106 (2013).
- 22) H.-Y. Park, K. Toume, M. A. Arai, N. Mori, S. K. Sadhu, F. Ahmed & M. Ishibashi: *ChemBioChem*, **15**, 872 (2014).
- 23) T. Yamaguchi, K. Toume, M. A. Arai, N. Mori, S. K. Sadhu, F. Ahmed & M. Ishibashi: *Nat. Prod. Commun.*, **7**, 475 (2012).
- 24) 坂中千恵: 実験医学, **26**, 391 (2008).
- 25) J. Briscoe & P. P. Thérond: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 416 (2013).
- 26) A. Dlugosz, S. Agrawal & P. Kirkpatrick: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 437 (2012).
- 27) T. Hosoya, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *ChemBioChem*, **9**, 1082 (2008).
- 28) Y. Rifai, M. A. Arai, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 718 (2011).
- 29) M. A. Arai, T. Fujimatsu, K. Uchida, S. K. Sadhu, F. Ahmed & M. Ishibashi: *Mol. BioSys.*, **9**, 1012 (2013).
- 30) M. A. Arai, K. Koryudzu, T. Koyano, T. Kowithayakorn & M. Ishibashi: *Mol. BioSys.*, **9**, 2489 (2013).
- 31) M. A. Arai, M. Sato, K. Sawada, T. Hosoya & M. Ishibashi: *Chem. Asian J.*, **3**, 2056 (2008).

プロフィール

石橋 正己 (Masami ISHIBASHI)

＜略歴＞1980年東京大学理学部化学科卒業／1985年同大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了／ハワイ大学, 三菱化成生命科学研究所, 北里研究所のポストドク, 東邦大学理学部講師, 北海道大学薬学部助教授を経て, 1997年より千葉大学薬学部教授＜研究テーマと抱負＞天然物化学＜趣味＞読書