抗腫瘍活性を中心とした新規生物活性天然物の探索研究

横須賀章人

Discovery of Novel Biologically Active Compounds of Natural Origin,
with a Focus on Anti-tumor Activity

Akihito Yokosuka

Department of Medicinal Pharmacognosy, School of Pharmacy, Tokyo University of Pharmacy and
Life Sciences; 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan.

(Received May 28, 2015)

Numerous clinically valuable medicines, including anticancer drugs, have been developed from biologically active natural compounds and their structurally related derivatives. This review discusses novel natural compounds with promising biological activities and those with novel chemical structures. Glaziovianin A, an isoflavone isolated from the leaves of *Ateleia glazioviana* (Legminosae), inhibited cell cycle progression at the M-phase with an abnormal spindle structure. AU-1 and YG-1, 5 β -steroidal glycosides isolated from the whole plants of *Agave utahensis* and the underground parts of *Yucca glauca* (Agavaceae), induced apoptosis of HL-60 cells via caspase-3 activation. Lycolicidinol, an alkaloid isolated from the bulbs of *Lycoris albiflora* (Amaryllidaceae), induced transient autophagy and morphological changes in mitochondria in the early stage of the apoptotic cell death process in HSC-2 cells. Taccasterosides isolated from the rhizomes of *Tacca chantrieri* (Taccaceae) and stryphnosides isolated from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum* (Legminosae) are steroidal and triterpene glycosides with unique chemical structures having novel sugar sequences.

Key words——natural product; anti-tumor activity; apoptosis; isoflavone; alkaloid; glycoside

1. はじめに

天然由来の生物活性化合物あるいはそれらの基本骨格を基にアナログ合成された化合物から、新規医薬品が開発された例は多い。特に抗がん剤においては、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) で 1981 年から 2010 年に承認された医薬品のうち約 40% が天然由来の化合物とそれらの誘導体である。¹⁾ したがって、医薬品のシードとなり得る新規生物活性天然物を探索することは現在でもなお意義ある研究課題と考えられる。筆者は、伝承生薬の基原植物を含めた高等植物から、ヒト腫瘍細胞に対して新規作用メカニズムにより選択的な細胞毒性を示す化合物の探索を中心に研究を展開してきた。本稿では、筆者の代表的な研究成果について紹介する。

2. 微小管ダイナミクスに作用する新規抗腫瘍活性イソフラボン

ブラジル原産のマメ科 *Ateleia glazioviana* の葉のエタノール抽出エキ스가 HL-60 ヒト白血病細胞に対して顕著な細胞毒性を示したことから、活性成分の分離・精製を行った。その結果、1 種の新規化合物を含む 4 種のイソフラボン (AG-1-AG-4) を単離した。化合物 AG-1-AG-4 はいずれも HL-60 細胞に対して細胞毒性を示した (IC₅₀ 0.29–23 μ M)。それらのうち、HL-60 細胞に対して最も強い細胞毒性 (IC₅₀ 0.29 μ M) を示した新規イソフラボン AG-1 を glaziovianin A と命名した (Fig. 1)。

Glaziovianin A について (財) 癌研究会・ヒトがん細胞パネルスクリーニングを行った結果、有効濃度が十分に低く、腫瘍細胞に対する感受性の差が認められた。²⁾ さらに、COMPARE 解析により、薬剤感受性パターン (フィンガープリント) を既存の抗がん剤や抗腫瘍活性物質と比較した。その結果、glaziovianin A は微小管重合阻害物質に類似した活性スペクトルを示したことから、作用点を微小管と

東京薬科大学薬学部漢方資源応用学教室 (〒192-0392 東京都八王子市堀之内 1432-1)

e-mail: yokosuka@toyaku.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Structure of Glaziovianin A (AG-1)

Fig. 2. Effects of Colchicine and AG-1 on Tubulin Cytoskeletons in 3Y1 Cells

3Y1 cells were treated with 1 μM of colchicine (B) and 3 μM of AG-1 (C) for 18 h. Tubulin cytoskeletons stained with anti- α -tubulin antibodies.

予想した。そこで、本化合物の作用メカニズムの解明のため、3Y1 ラット線維芽細胞を用いて、細胞周期及び微小管への影響を検討した。細胞分裂期の形態観察において、微小管阻害剤である colchicine は微小管を破壊し、紡錘体の形成を阻害したのに対し、glaziovianin A は微小管ダイナミクス（微小管の伸長と短縮）を阻害し、多極紡錘体が形成された。したがって、glaziovianin A は、colchicine とは異なる作用機序で細胞周期を分裂期（M 期）で停止させていることが示された (Fig. 2).³⁾

現在臨床応用されている抗がん剤のうち、微小管作用薬としては微小管の重合を阻害するビンカルカロイド類や、微小管の重合を過度に促進するタキサン類が知られている。いずれの化合物も微小管の広範囲に結合し、微小管ネットワークの破壊をもたらす。その一方、2010 年に海洋天然物 halichondrin B から開発された eribulin は、微小管ネットワークを破壊せずに微小管の伸長のみを阻害する微小管ダイナミクス阻害薬である。Eribulin は既存の微小管作用薬とは微小管への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ん患者に対しても低用量で奏功する。

Glaziovianin A は含窒素化合物でないにもかかわらず、微小管に作用を示す点で興味深い。さらに、微小管ネットワークにはほとんど影響を与えずに、分裂期に多極紡錘体構造を誘導して細胞周期を停止

させることから、eribulin とは作用メカニズムの異なった、微小管ダイナミクスを作用点とする新しい抗腫瘍活性物質と言える。その後、glaziovianin A の全合成の達成、⁴⁾ 類縁化合物の創製と構造活性相関が明らかとなった。^{5,6)} 最近では、本化合物が細胞のがん化により活性化した上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR) のエンドソームによる輸送・成熟化を阻害し、アポトーシスを誘導することが明らかになっている。⁷⁾

3. アポトーシス誘導活性を示すステロイド配糖体

筆者は、ユリ科やリュウゼツラン科などの主に観賞用として用いられる植物から腫瘍細胞毒性物質の探索を行い、これまでに数多くのステロイド配糖体を単離・構造決定し、それらの腫瘍細胞毒性を評価してきた。⁸⁻¹³⁾ その過程において、リュウゼツラン科 *Agave utahensis* の全草より HL-60 細胞に対してアポトーシスを誘導する 5β -スピロスタノール配糖体 (AU-1) を見出した (Fig. 3)。一般的に、ステロイド配糖体による細胞死は、化合物の持つ非特異的な膜破壊によるネクロシスとされていた。しかし、AU-1 は HL-60 細胞に対して caspase-3 を活性化し、アポトーシス型の細胞死（核クロマチンの凝縮と DNA の断片化）を誘導することを明らかにした。¹⁴⁾ さらに、同じくリュウゼツラン科 *Yucca glauca* の地下部から、HL-60 細胞に対して細胞毒性を示す 5β -スピロスタノール配糖体 (YG-1) と 5β -フロスタノール配糖体 (YG-16) を単離した (Fig. 4)。これらの化合物は、ステロイド骨格の F 環部分の構造のみが異なるが、同程度の細胞毒性 (YG-1: IC_{50} 2.5 μM ; YG-16: IC_{50} 4.4 μM) を示し、核クロマチンの凝縮が確認された。さらに、YG-1 と YG-16 の細胞生存率と caspase-3 の活性化を経時的に確認した結果、YG-1 は 6 時間で caspase-3 の活性化を伴った細胞死が確認された。一方、YG-16 は 16 時間で caspase-3 の上昇が確認され、それに

横須賀章人

東京薬科大学薬学部講師。1997 年東京薬科大学薬学部卒業、1999 年同修士課程修了後、同助手に着任、2004 年博士（薬学）取得、2007 年同助教、2011 年より現職。専門は、生薬学・天然物化学。

Fig. 3. Structure of AU-1

Fig. 4. Structures of YG-1 and YG-16

伴って細胞生存数が減少した (Figs. 5 and 6). したがって, F 環の開裂の有無によりアポトーシス誘導のメカニズムになんらかの違いがあることが示唆された.¹⁵⁾ 現在さらに, 一連のステロイド配糖体類の構造活性相関と作用メカニズムの検討を行っており, ステロイド配糖体の新規アポトーシス誘導剤としての展開が期待される.

4. オートファジーを伴った細胞死を誘導するアルカロイド

多くの抗がん剤は腫瘍細胞に対してアポトーシス型の細胞死を誘導することから, 抗がん剤の開発においてアポトーシスの誘導活性が重要視されてきた. 一方で, アポトーシスとは異なる形態の細胞死があることが数多く報告されており, その1つにオートファジーがある. オートファジーとは自己の細胞内のタンパク質をリソソームが分解し生きのびる現象 (自食現象) である. がん細胞においては, がん組織が拡大・増殖する際に栄養血管の発達が追いつかず, 低酸素・低栄養状態となり一時的にオートファジーが観察されるといった報告や, がん細胞

Fig. 5. Cell Viability of HL-60 Cells Treated with YG-1, YG-16, or Etoposide (E)

Cell viability was determined by an MTT assay after incubation with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of YG-1 or YG-16, or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of etoposide (E) at 6, 16, and 24 h. Data represent the mean $\pm$ S.E.M. of three experiments.

に直接的にオートファジー型の細胞死を誘導するいくつかの化合物の報告がある. しかしながら, オートファジーの誘導を作用機序とする抗がん剤は現在までに開発されていないことから, オートファジー

Fig. 6. Caspase-3 Activity in the YG-1, YG-16, or Etoposide-treated HL-60 Cell Lysates

HL-60 cells were incubated at 37°C for 6 h or 16 h with 20 µg/mL of YG-1, YG-16, or 10 µg/mL of etoposide (E). Data represent the mean ± S.E.M. of three experiments. Results with $p < 0.05$ were considered significantly different from the control group, and are marked with asterisk.

Fig. 7. Structure of Lycoricidinol

の誘導を作用点とする天然物の探索を行った。

ヒガンバナ科 *Lycoris albiflora* の鱗茎のメタノール抽出エキスから 22 種の化合物を単離した。これらのうち、フェナンスリジン型アルカロイドである lycoricidinol は、HL-60 細胞及び HSC-2 ヒト口腔扁平上皮がん細胞に対し強い細胞毒性 [IC_{50} 0.018 µM (HL-60), 0.05 µM (HSC-2)] を示した (Fig. 7)。HSC-2 細胞に対しては、24 時間の処理でアポトーシス型の細胞死を誘導することが明らかとなった。また、培養の初期段階 (3 時間接触時) にオートファゴソーム結合タンパク質である LC3 の集積、ミトコンドリアの萎縮と黒変化が観察され、さらに、オートファジー阻害剤である 3-methyladenine との併用により細胞毒性が減弱した。このことから、lycoricidinol は、HSC-2 細胞に対して一過性のオートファジー発現を経てアポトーシスを誘導し、この一過性のオートファジーの誘導が強力な細胞毒性に寄与していることが示唆された。¹⁶⁾

5. 複雑な糖鎖構造を有するステロイド及びトリテルペン配糖体

高等植物からの新規生物活性天然物を探索する過程で、構造的に興味深い化合物が単離されている。タシロイモ科 *Tacca chantrieri* は、中国ではその根茎を「蒟蒻薯」と称し、民間的に胃潰瘍、腸炎、肝炎などの治療に用いられている。*T. chantrieri* の根茎のメタノール抽出エキスより、ジアリルヘプタノイド、ジアリルヘプタノイド配糖体、エルゴスタン配糖体、スピロスタン配糖体、フロスタン配糖体、プソイドフロスタン配糖体、コレスタン配糖体、ウィザノライド配糖体など、新規化合物 39 種を含む計 41 種 (TC-1-TC-41) の化合物を単離し、それらの化学構造を明らかにした。¹⁷⁻²⁴⁾ 単離された化合物のうち、いくつかのジアリルヘプタノイド並びにそれらの配糖体、スピロスタン配糖体に HL-60 細胞に対する細胞毒性活性が認められ、構造活性相関に関する知見が得られた。新規エルゴスタン配糖体 (TC-18) は D-glucose のみからなる従来にない複雑な糖鎖構造を有しており、その構造を各種二次元 NMR [1H - 1H shift correlation spectroscopy (COSY), 1H -detected heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC), 1H -detected heteronuclear multiple-bond connectivity (HMBC), nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY), 1H -detected heteronuclear single-quantum coherence (HSQC)-totally correlated spectroscopy (TOCSY), the one-dimensional (1D)-selective-TOCSY 等] を含むスペクトルの解析と化学変換により決定した (Fig. 8)。

マメ科 *Styphnodendron fissuratum* は、ブラジルで民間的にその樹皮や葉を止血、止瀉薬として用いられている。*S. fissuratum* の果皮のエタノール抽出エキスより 13 種の新規トリテルペン配糖体 (SF-1-SF-13) を単離し、それらの化学構造を、二次元 NMR を中心としたスペクトル解析により明らかにした。その結果、一部の新規化合物 (SF-3-SF-6) において末端 L-arabinosyl 基が通常の 4C_1 型配座ではなく、 1C_4 型配座として存在していることを、 1H -, ^{13}C -NMR の化学シフト値、 1H -NMR のスピン結合定数 (J 値)、アノマーの $^1J_{C-H}$ 値、HMBC スペクトルにおける遠隔相関により確認した。今まで L-arabinose の 2 位水酸基に D-glucose などの 4C_1 型配座の糖が結合した場合、L-arabinose が 1C_4 型配

Fig. 8. Structure of **TC-18** Fig. 9. Structure of **SF-3**

座をとることが報告されているが、**SF-3**のように末端 arabinose が 1C_4 型配座をとる例はこれが初めてである (Fig. 9).^{25,26)}

これらの配糖体成分には現在のところ、顕著な生物活性は見つかっていないが、天然配糖体の化学構造という観点からは極めて興味深い。

6. おわりに

高等植物を含めた天然資源の成分探索研究の結果、現在でもなお、構造の多様性に富んだ新規化合物や、強い生物活性を有する化合物が数多く見い出されている。今後も様々な植物を対象として、構造的に興味深く、強い腫瘍細胞毒性を示す化合物を探索し、構造活性相関と作用メカニズムの解明を継続して行っていく予定である。

謝辞 本研究は、東京薬科大学薬学部漢方資源応用学教室において行われたものであり、三巻祥浩教授を始めとする教室スタッフ、大学院生、学生諸氏、並びに一連のご指導ご協力を頂きました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Newman D. J., Cragg G. M., *J. Nat. Prod.*, **75**, 311–335 (2012).
- 2) Yamori T., Matsunaga A., Sato S., Yamazaki K., Komi A., Ishizu K., Mita I., Edatsugi H., Matsuba Y., Takezawa K., Nakanishi O., Kohno H., Nakajima Y., Komatsu H., Andoh T., Tsuruo T., *Cancer Res.*, **59**, 4042–4049 (1999).
- 3) Yokosuka A., Haraguchi M., Usui T., Kazami S., Osada H., Yamori T., Mimaki Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3091–3094 (2007).
- 4) Hayakawa I., Ikedo A., Kigoshi H., *Chem. Lett.*, **36**, 1382–1383 (2007).
- 5) Ikedo A., Hayakawa I., Usui T., Kazami S., Osada H., Kigoshi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5402–5404 (2010).
- 6) Hayakawa I., Ikedo A., Chinen T., Usui T., Kigoshi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 5745–5756 (2012).

- 7) Chinen T., Kazami S., Nagumo Y., Hayakawa I., Ikeda A., Takagi M., Yokosuka A., Ima-
moto N., Mimaki Y., Kigoshi H., Osada H.,
Usui T., *ACS Chem. Biol.*, **8**, 884–889 (2013).
- 8) Yokosuka A., Mimaki Y., *Chem. Pharm.*
Bull., **55**, 145–149 (2007).
- 9) Yokosuka A., Mimaki Y., *Phytochemistry*,
69, 2724–2730 (2008).
- 10) Yokosuka A., Mimaki Y., *Phytochemistry*,
70, 807–815 (2009).
- 11) Yokosuka A., Sano T., Hashimoto K.,
Sakagami H., Mimaki Y., *Chem. Pharm.*
Bull., **57**, 1161–1166 (2009).
- 12) Yokosuka A., Suzuki T., Mimaki Y., *Chem.*
Pharm. Bull., **60**, 275–279 (2012).
- 13) Yokosuka A., Takagi K., Mimaki Y., *J. Nat.*
Med., **67**, 590–598 (2013).
- 14) Yokosuka A., Jitsuno M., Yui S., Yamazaki
M., Mimaki Y., *J. Nat. Prod.*, **72**, 1399–1404
(2009).
- 15) Yokosuka A., Suzuki T., Tatsuno S., Mimaki
Y., *Phytochemistry*, **101**, 109–115 (2014).
- 16) Jitsuno M., Yokosuka A., Hashimoto K.,
Amano O., Sakagami H., Mimaki Y., *Nat.*
Prod. Commun., **6**, 187–192 (2011).
- 17) Yokosuka A., Mimaki Y., *Chem. Pharm.*
Bull., **55**, 273–279 (2007).
- 18) Yokosuka A., Mimaki Y., Sakuma C., Sashi-
da Y., *Steroids*, **70**, 257–265 (2005).
- 19) Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., *Chem.*
Pharm. Bull., **52**, 1396–1398 (2004).
- 20) Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., *J. Nat.*
Prod., **66**, 876–878 (2003).
- 21) Yokosuka A., Mimaki Y., Sakagami H.,
Sashida Y., *J. Nat. Prod.*, **65**, 283–289
(2002).
- 22) Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., *J. Nat.*
Prod., **65**, 1293–1298 (2002).
- 23) Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y.,
Phytochemistry, **61**, 73–78 (2002).
- 24) Yokosuka A., Mimaki Y., Sashida Y., *Natural*
Medicines, **56**, 208–211 (2002).
- 25) Yokosuka A., Kawakami S., Haraguchi M.,
Mimaki Y., *Tetrahedron*, **64**, 1474–1481
(2008).
- 26) Yokosuka A., Kawakami S., Haraguchi M.,
Mimaki Y., *Phytochem. Lett.*, **4**, 259–266
(2011).