

論 文 要 旨

**Novel Cytotoxic Isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* jacq
Induces Apoptosis and Overcomes Multidrug Resistance**

【 ジャマイカ産植物 *Hyptis verticillata* jacq より単離された新規抗腫瘍性
化合物によるアポトーシスの誘導および多剤耐性機構の克服について 】

ヨハン・ホワイト

【序論および目的】

成人 T 細胞白血病は従来の抗がん剤を用いた治療では極めて難治性であり、新たな機序による新規抗腫瘍剤の開発が急務となっている。他方、これまで多くの有用な薬剤が、熱帯産の植物から発見されている。本研究では、ジャマイカ産のシソ科の植物である *Hyptis verticillata* jacq が現地で炎症性皮膚疾患に用いられていることから、リンパ球に作用する可能性を考慮し、リンパ系造血器腫瘍である ATL の治療薬としての可能性、さらには他の造血器腫瘍やそれ以外のがんにおける有用性を検討することを目的とした。

【材料および方法】

ジャマイカに自生する *Hyptis verticillata* jacq の乾燥葉、幹、枝の粉末からメタノール抽出物を得て、研究のスタートとした。生物学的活性は ATL 細胞株である S1T に対する細胞障害性活性を、MTT 法、もしくは WST 法で測定し、IC50 を求めた。活性物質の分離、同定は、メタノール抽出物を、有機溶媒/水の 2 層分離、シリカゲル分画、最後に HPLC 分画を行い、各々の分画の活性を測定した。分子構造は NMR 法によった。最終的に得られた単離化合物の生物学的特性を検討すべく、まず S1T 以外の ATL 細胞、ATL 以外の造血器腫瘍細胞、さらには肺がんや大腸がん細胞に対する細胞障害作用を WST 法で検討した。またその作用機序解明のため、アポトーシス関連物質である、P53, Bax, Caspase 3, Caspase 9 およびそのリン酸化蛋白の増減をウェスタンブロット法で検討した。また DNA ヒトストグラムにより細胞周期との関係を検討した。最後に、本化合物が抗がん剤多剤耐性を克服できるか否かを検討するために、epidermoid cancer cell line ; KB-3-1 および leukemic cell line ; K562 細胞に、多剤耐性遺伝子である、*P-glycoprotein gene (ABCB1)*, *MRP-1(ABCC1)* もしくは *BCRP(ABCG2)* を移入された細胞株 (順に KBG2, KBABCC1, K562/ABCG2) を用いて、WST 法による IC50 の変化で薬剤耐性を検討した。

【結 果】

最終ステップの HPLC により複数の活性分画が確認され、各々を NMR 法で構造解析したところ、そのなかに新規化合物が発見された。本化合物は、リグナン系化合物のひとつで、IUPAC 命名法では、4-methoxy-9-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-dihydrofuro[3',4':6,7]naphthol[2,3,-d]dioxol-6(5H)-one であり、本研究では 4-MTDND と略称した。4-MTDND の細胞障害性活性は極めて高く、ATL 細胞株の S1T, K3T

および急性リンパ性白血病細胞株 Jurkat における IC50 は順に、7.0, 9.4, 4.7 nM であった。骨髄性白血病株である K562 や HL60 にも作用し、IC50 は 94.0, 70.0 nM であった。4-MTDND は固形がん細胞株である肺がん細胞株 A549 や大腸がん細胞株 SW480 にも作用し、IC50 は 11.8, 23.6 nM であった。一方、抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化した正常ヒト T 細胞に対しては IC50 が 211nM であった。

S1T に対する作用は、形態学的観察からはアポトーシス誘導が示唆された。ウエスタンブロット法によるアポトーシス関連蛋白の観察では、濃度依存的に P53、BAX, cleaved PARP, cleaved caspase 3, cleaved caspase-9 の増加もしくは発現が認められた。DNA ヒストグラムでは、濃度依存的に G2/M phase と sub-G1phase の増加が認められた。フローサイトメトリーでは、4-MTDND により、CyclinB1 の減少と phosphorylated cdk1 の増加が認められた。

4-MTDND と抗がん剤多剤耐性との関連を調べるために、がん細胞株 KB-3-1 と多剤耐性遺伝子移入株の KBABCC1、KBG2、および K562 と多剤耐性遺伝子移入株 K562/ABCG2 を用いて臨床で用いられている抗がん剤と本化合物の IC50 を比較検討したところ、抗がん剤 etoposide の IC50 は KB3-1 に比べ KBABCC1 では 28.6 倍高値であったが、4-MTDND では 1.17 倍であった。同じく、KB3-1 に比べ KBG2 では etoposide の IC50 は 23.6 倍高値であったが、4-MTDND では 1.0 で変化は無かった。また K562 と K562/ABCG2 との比較では、抗がん剤 mitoxantrone の IC50 は 15.0 倍高値であったが、4-MTDND では 1.95 倍であった。

【結論及び考察】

本研究で発見された新規抗腫瘍性化合物 4-MTDND は、ATL だけではなく、他の造血器腫瘍および非造血器系がん細胞にも細胞障害性作用を発揮する。作用機序については、形態学的変化、ウエスタンブロット法による p53, BAX, PARP, Caspase 3, Caspase 9, フローサイトメトリー法による CyclinB1 やリン酸化 cdk1 の変化、および DNA ヒストグラムなどより、4-MTDND は細胞周期に作用し、G2 arrest を惹起し、アポトーシスを誘導するものと考えられる。その詳細な作用点は現時点では不明であるが、直接的 DNA に作用し、もしくは topoisomeraseII 阻害を介して DNA 障害を惹起することによるものなどが考えられる。本化合物はリングナン骨格を有しており、この点では、同じ植物由来の、既知の化合物である β -peltatin や 4-demethyl-desoxy-podophyllotoxin などと同様であるが、正常ヒトリンパ球に対する細胞障害性がかなり低い点で異なっている。薬剤耐性については、今回三種類の薬剤耐性遺伝子発現細胞株で検討し、いずれの遺伝子発現細胞においても、変わらず細胞障害活性を示したことは、抗がん剤耐性になったがん患者でも有効性が期待できると考えられ、今後、臨床応用に向けて、さらなる検討が必要である。

(Anticancer Research 掲載、2011 年)

論文審査の要旨

報告番号	総研第167号	学位申請者	ヨハン・ホワイト
審査委員	主査	河野 嘉文	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査 岡本 実佳
	副査	夏越 祥次	副査 岡本 康裕

Novel Cytotoxic Isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* jacq
Induces Apoptosis and Overcomes Multidrug Resistance

(ジャマイカ産植物 *Hyptis verticillata* jacq より単離された新規抗腫瘍性化合物によるアポトーシスの誘導および多剤耐性機構の克服について)

成人T細胞白血病(ATL)は従来の抗がん剤を用いた治療では極めて難治性であり、新規抗腫瘍剤の開発が急務となっている。他方、これまで多くの有用な薬剤が、熱帯産の植物から発見されている。学位申請者は本研究において、ジャマイカ産のシソ科の植物である *Hyptis verticillata* jacq が現地で炎症性皮膚疾患に用いられていることから、リンパ球に作用する可能性を考慮し、ATL の治療薬としての可能性、さらには他の造血器腫瘍やそれ以外のがんにおける有用性を検討した。本研究ではまず、*Hyptis verticillata* jacq の乾燥葉、幹、枝の粉末からメタノール抽出物を得て、研究のスタートとした。生物学的活性は ATL 細胞株である S1T に対する細胞障害性活性を、MTT 法、もしくは WST 法で測定し、IC50 を求めた。活性物質の分離、同定は、メタノール抽出物を、有機溶媒/水 2 層分離、シリカゲル分画、最後に HPLC 分画を行い、各々の分画の活性を測定した。分子構造は NMR 法によった。最終的に得られた単離化合物の生物学的特性を検討すべく、まず S1T 以外の ATL 細胞、ATL 以外の造血器腫瘍細胞、さらには肺がんや大腸がん細胞に対する細胞障害作用を WST 法で検討した。またその作用機序解明のため、アポトーシス関連物質である、P53, Bax, Caspase 3, Caspase 9 およびそのリン酸化蛋白の増減をウェスタンブロット法で検討した。また DNA ヒストグラムにより細胞周期との関係を検討した。最後に、本化合物が抗がん剤多剤耐性を克服できるか否かを検討するために、epidermoid cancer cell line ; KB-3-1 および leukemic cell line ; K562 細胞に、多剤耐性遺伝子である、*P-glycoprotein gene (ABCB1)*, *MRP-1(ABCC1)* もしくは *BCRP(ABCG2)* を移入された細胞株 (順に KBG2, KBABCC1, K562/ABCG2) を用いて、WST 法による IC50 の変化で薬剤耐性を検討した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- 1) 本研究により、リグナン系化合物の新規化合物が発見された。IUPAC 命名法では、4-methoxy-9-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-dihydrofuro[3',4':6,7]naphthol[2,3,-d]diosxol-6(5H)-one であり、本研究では 4-MTDND と略称した。
- 2) 4-MTDND の細胞障害性活性は極めて高く、ATL 細胞株 S1T, K3T および急性リンパ性白血病細胞株 Jurkat における IC50 は順に、7.0, 9.4, 4.7 nM であった。骨髄性白血病株である K562 や HL60 にも作用し、IC50 は 94.0, 70.0 nM であった。4-MTDND は肺がん細胞株 A549 や大腸がん細胞株 SW480 にも作用し、IC50 は 11.8, 23.6 nM であった。一方、抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化した正常ヒト T 細胞に対しては IC50 が 211nM であった。
- 3) 4-MTDND の作用は、形態学的観察、PP53, BAX, cleaved PARP, cleaved caspase-3, -9 のウェスタンブロット解析、DNA ヒストグラム解析からは、G2/M arrest を介するアポトーシス誘導が示唆された。
- 4) 4-MTDND は多剤耐性遺伝子 *ABCB1*, *ABCC1* もしくは *ABCG2* 産物の関与する薬剤耐性とは関係なく細胞障害性を示すことが示された。

本研究では、熱帯植物から新規抗腫瘍性化合物を分離・同定している。抗腫瘍化合物としてその作用範囲が広く、また正常活性化リンパ球に対する作用濃度に比べかなり低濃度で作用することなど、将来の臨床応用の可能性が高い。特に、主な薬剤耐性機構を超えてがん細胞に作用することから、極めて興味深い抗腫瘍性化合物と考えられる。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 167 号		学位申請者	ヨハン・ホワイト
審査委員	主査	河野 嘉文	学位	博士 (医学) 歯学・学術)
	副査	出雲 周二	副査	岡本 実佳
	副査	夏越 祥次	副査	岡本 康裕

主査および副査の5名は、平成24年 2月 6日、学位申請者 ヨハン・ホワイト 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) Hyptis は以前より研究されてきたという歴史があり、スタート時点では他の研究者が既に発見しつくしている可能性があったと思う。何故、この植物を材料にしようと考えたのか。

(回答) この植物は、現地において、古くから民間療法として皮膚疾患特にアレルギー性疾患に用いられていたため、リンパ球系—免疫系に作用するのではないかと考えた。メキシコ産の Hyptis については良く研究されていたが、ジャマイカ産についてははされていないようであった。同じ植物でも産地によって含まれる化合物が異なることがあるようなので可能性を信じて研究した

質問2) この研究にあつて何種類のサンプルをスクリーニングしたか。そのなかでなぜ、4-MTDND を選択したのか。

(回答) ジャマイカ産の植物由来の化合物として200種類ほどをスクリーニングした。そのなかで粗抽出物に活性のみられた Hyptis に注目し、分離精製を進めた。そのなかで新規化合物として4-MTDND が単離され、極めて低濃度で細胞障害性作用を示したので、抗腫瘍剤の候補としてその作用機序を研究した。

質問3) 4-MTDND は etoposide と同じく、G2/M arrest を誘導するということが、副作用はどちらが強いのと思うか。

(回答) 両者とも podophyllotoxin 誘導体であるので、副作用は重なる点があると思われる。Etoposide は MDR ポンプ機構で細胞外に排泄されるが4-MTDND はされないようであるので、低濃度で抗腫瘍効果を発揮することが期待され、従って、副作用も少ない可能性がある。

質問4) 4-MTDND のアポトーシス誘導は p53 活性化経路を介するということが、その活性化のメカニズムはどういうものと考えるか。

(回答) 構造上の etoposide との類似性と今回の研究結果から推測すれば、DNA topoisomerase II 阻害による DNA 障害により、ATM を介して p53 が活性化している。その後は、Bax の活性化からミトコンドリアからの cytochrome C の放出、さらにはカスパーゼの活性化で、最終的にアポトーシスが誘導されたと推測している。

質問5) 4-MTDND の作用機序は多剤耐性細胞株でも同様に発揮されると考えるか。

(回答) 細胞障害性の作用機序は同様に発揮されたと考えている。多剤耐性機序は薬剤の細胞外への排出がその要因であり、4-MTDND はその排出作用を受けにくいものと考えられる。細胞内に蓄積された4-MTDND が、質問4) の回答に述べたような機序で細胞障害性を発揮したのと考えている。

質問6) 使用した多剤耐性細胞株における MDR 蛋白の発現は確認してあるか。

(回答) タンパク質レベルでの発現については確認していないが、etoposide もしくは mitoxantrone などの抗がん剤に対する耐性の確認、すなわち機能的発現については、陽性コントロールとして確認している。

質問 7) 多剤耐性遺伝子移入細胞株の培養に専用の選択培地を用いていないが、どう考えるか。

(回答) 解凍後ひと月以内に実験に用いていること、また、質問 6) での回答のとおり、実験の際に、機能的遺伝子発現を確認しているので問題はないと考えている。

質問 8) データの統計処理はなにを用いているか。

(回答) 4-MTDND 作用は Wilcoxon-matched pairs test を用いて検討した。

質問 9) 正常ヒトリンパ球は 4-MTDND に対して抵抗性を示すということであったが、リンパ球各サブセットではどうか。

(回答) 今回の研究では、抗 CD3 抗体と IL-2 により活性化した T リンパ球を用いて耐性を検討した。それ以外のサブセットについては今後検討したい。

質問 10) 正常ヒトリンパ球は造血器腫瘍細胞株と異なった分裂速度を持つと思われるが、4-MTDND の作用の差はこのことと関連がないのか。

(回答) 活性化リンパ球のダブリングタイムは 2 日くらいであり、造血器細胞株とそれほど異ならない。本研究で WST 法における培養時間を 3 日に設定しているが、これは標準的な条件である。

質問 11) 4-MTDND は多種類のがん細胞株に作用している。造血器系腫瘍細胞は付着性がん細胞株に比べ分裂速度が速いと考えられるが、それでも IC50 から同じような感度で細胞障害性を示していることについて、細胞周期の観点も含め、どう考えるか。

(回答) 細胞周期の速度との関連については具体的な実験データはないが、今回の結果からは、それと関係なく同様に作用していると考えられる。細胞周期のいろいろな関連蛋白に作用する HTLV-1 Tax 蛋白産生 ATL 細胞と非産生 ATL 細胞との比較においても、全く差を認めなかった。

質問 12) ウエスタンブロットによる実験では p53 と Bax の増加は著明であるが、より下流のアポトーシス誘導蛋白である cleaved caspase 3 と 9 の増加はそれほど著明ではない。にもかかわらずアポトーシスが誘導されるということをどう考えるのか。

(回答) 今回のウエスタンブロットでの培養条件は、24 時間であり、4-MTDND も IC50 前後の濃度でおこなっている。従って細胞障害が十分誘導されていない条件である。細胞障害性を十分強く誘導すると、細胞内タンパク質が分解しすぎてしまい、アポトーシス関連蛋白の動態が見えなくなるので、それを避けるための適正な条件で観察をおこない、上記のような結果となった。

質問 13) etoposide と mitoxantrone を耐性細胞株に用いた理由はなにか。

(回答) 今回用いた 3 つの多剤耐性遺伝子のなかで、*ABCC1* と *P-glycoprotein* 遺伝子産物に最も耐性である薬剤は etoposide であり、*ABCG2* 遺伝子産物は mitoxantrone である。それゆえこれらの薬剤を用いて比較した。

質問 14) 将来臨床応用されるとしたら、どのような悪性腫瘍に効果的と考えるか。

(回答) ATL を始めとしたリンパ系の造血器腫瘍とある種の固形がん、特に、薬剤耐性となった臨床例で効果的ではないかと考えている。

質問 15) ジャマイカにおける HTLV-1 抗体陽性頻度は 3-6% ということであったが、HTLV-1 関連疾患についてはどうか。

(回答) ジャマイカでも ATL と HAM/TSP の両疾患がみられるが、日本とことなり、ATL の発症率より HAM/TSP の発症率が高い。この理由として、ジャマイカ人は日本人に比べ、HTLV-1 に対する免疫反応が強いのではないかと考えている。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。