

## Summary

Entrance Year : 平成 24 年入学  
United Graduate School of Agricultural Sciences  
Course : 応用生命科学  
Name : 平良 直幸

Title	植物アルカロイド Nitidine の腫瘍選択的細胞毒性に関する研究		
Key word	( Nitidine )	( 薬剤耐性 )	( ABC transporter )

### 第 1 章

#### 序論及び目的

サルカケミカン(*Toddalia asiatica* Lam.)は海岸近くの森林に分布し、この植物の様々な部位による煎じ汁は世界中の地域で民間治療薬や生薬の一種として咳、インフルエンザ、肺等の病気に用いられてきた。日本においても沖縄や奄美においてサルカケミカン分布し、伝統的に利用されてきた。我々の研究室では世界で初めてサルカケミカンの幹に含まれている Nitidine (NTD) が肺腺癌である A549 に対して特異的に高い細胞毒性を示すことを報告した。

NTD は Topoisomerase I (Topo I)阻害活性を持つことが知られており、Topo I 阻害薬の代表的なリード化合物として Camptothecin (CPT)が知られている。我々の研究室では CPT に比べて NTD は Topo I 阻害活性は低いにもかかわらず細胞毒性効果が高いことを報告している。また、NTD は肺腺癌細胞株である A549 細胞に対して細胞内に特異的に蓄積することで高い細胞毒性を示すが、増殖性正常細胞である WI-38 細胞に対しては毒性を示さないことを報告した。加えて、NTD は Topo I 阻害活性だけでなく、mTOR シグナルや AKT 経路の阻害等様々な経路の阻害を起こすことも報告されており、細胞死を誘導する NTD の直接的な作用メカニズムは未だ解明されていない。

先に述べたように NTD は様々な作用点を介して抗腫瘍効果を示している可能性が示唆されていることから、現在用いられている抗がん剤と異なる作用機構を有している可能性があると考えられた。そこで、本研究では以前報告した NTD の細胞内蓄積がどの細胞小器官で蓄積するのかを明らかにし、次いで NTD の細胞毒性発現機構が従来の抗がん剤と異なるのかを検証することを目的とし、ヒト培養がん細胞パネル(HCC パネル)による NTD のスクリーニング評価を行った。

#### 結果及び考察

A549 細胞の細胞内小器官を蛍光タンパク質で染色し NTD の局在を観察した結果、ミトコンドリア内に NTD が蓄積していることが示された。また、NTD はミトコンドリア内に蓄積することで mitochondrial membrane potential (MMP)の形成を阻害することを明らかにした。このことから以前報告された NTD 処理によるアポトーシス誘導は MMP の阻害に由来することが示唆された。ミトコンドリア内に蓄積する化合物として脂溶性カチオン(delocalized lipophilic cations :DLCs)が知られている。この DLCs は MMP が脱分極状態ではミトコンドリア内に蓄積できないという特徴を有している。薬剤処理により脱分極状態になったミトコンドリア内に NTD の蓄積が生じるのかを検証した結果、NTD の蓄積は観察できなかった。この結果は NTD が DLCs

と同じメカニズムでミトコンドリア内に蓄積していることを示唆していた。

NTD の主たる作用機序がミトコンドリア内に蓄積することに起因しているのかを検証するために、最初に代表的な Topo I 阻害薬である CPT 及び Topotecan (TPT) を処理した細胞と比較することで DNA 合成阻害に依存しているのかを検証した。薬剤処理後の A549 細胞の増殖阻害が生じる時間を経時的に分析した結果、NTD の細胞毒性効果は明らかに CPT や TPT よりも早期に生じることが観察された。また短時間の薬剤処理後の細胞増殖抑制を観察すると、CPT や TPT を処理した細胞の増殖抑制効果は 24 時間程度であるが、NTD は経時的に処理した場合と同様に短時間処理後もそのまま細胞増殖を抑制し続けた。この結果は NTD が CPT や TPT と異なり細胞周期に非依存的に細胞毒性を示している可能性を示唆していた。加えて NTD を短時間処理しても継続して増殖抑制効果を示す結果からも推察されるように、一度取り込まれた NTD は不可逆的であることを示唆していると考えられた。

NTD の主たる作用機序がミトコンドリア内に蓄積することに起因することが上記の実験から推察されたことから、次に HCC パネルを利用して NTD と類似性を有する薬剤があるのかを検証した。HCC パネルは様々な細胞での薬剤の感受性パターン (Finger Print) とデータベース内のデータと比較することにより、新規性を評価することができることが知られている。類似性比較の結果、最も NTD と類似すると評価されたのは微小管合成阻害剤であるパクリタキセルだった。異なる化合物間で同様の作用機序を示す際に薬剤感受性が類似するのかが検証するために、同じ微小管合成阻害薬であるビンクリスチンやドセタキセルの Finger Prints をパクリタキセルの Finger Prints と比較すると、異なる化合物でも同様の作用機序を有すると細胞種における薬剤感受性がほぼ類似する傾向を示していた。一方、パクリタキセルと NTD の Finger Prints を比較すると、薬剤感受性がビンクリスチンやドセタキセルの場合と異なる傾向が見られた。このことは NTD の作用機序はパクリタキセルのような微小管合成阻害薬でもない可能性を示しており、NTD の特徴的ながん細胞におけるミトコンドリア内蓄積などの作用機序は従来の抗がん剤と異なる新規の作用機序を有する可能性があることを示唆していた。従来の抗がん剤はがん細胞が持つ異常増殖能時に起こる DNA 合成時をターゲットにしているため、増殖が遅いあるいは休止している幹細胞形質を持つがん細胞に対しては効果が望めなかった。このようながん細胞に対して、NTD の持つミトコンドリア内への不可逆的蓄積や細胞サイクル非依存性の性質は有効に働く可能性があると考えられた。加えて、長期間処理をしなくても済むため、抗がん剤の副作用の問題も防げるのではないかと考えられた。

## 第 2 章

### 序論及び目的

肺癌の治療において化学療法は術前、術後とも選択されることが多い。CPT をリード化合物とした新規の薬剤として、TPT やイリノテカン等多くの薬剤が開発されて臨床的に用いられており、腫瘍組織の増殖を阻止あるいは縮小することに成功している。しかしながら腫瘍組織は様々な形質のがん細胞によって形成されており、その中には薬剤耐性形質を持つ細胞が存在すると考えられている。薬剤耐性形質の獲得で最も深く関与していると考えられているのは ABC transporter の存在である。ABC transporter は生体内に取り込まれた薬物、脂質、糖等の様々な基質を細胞内外へ輸送するとされ、その中で薬剤耐性に関わるものとして ABCB1、ABCC 群、ABCG2 等が知られている。薬剤耐性細胞は ABC transporter を高発現することで細胞内に取り

込まれた抗がん剤を細胞外へ排出することで薬剤耐性を示し、その後薬剤耐性細胞が再増殖し腫瘍組織を再発することが、がんの大きな死亡原因になっている。

そのため、薬剤耐性形質を有する癌細胞に対する効果的な薬剤の開発が望まれているが、現在までに薬剤耐性を有するがん細胞に有効な薬剤は少ない。第 1 章の考察で述べたように NTD の抗腫瘍効果のメカニズムはミトコンドリア内に蓄積することに起因し新規性を有する可能性があるため、従来の抗がん剤に対して薬剤耐性を持つ肺腺癌細胞に対しても効果的な抗腫瘍効果が期待できると考えた。さらに我々はすでに NTD の感受性の違いを WI-38 細胞と A549 細胞を用いて比較しており、A549 細胞は WI-38 細胞よりも ABC transporter の発現が高発現しているのにもかかわらず、NTD に対する感受性が高いことを報告している。これは NTD が ABC transporter のターゲットになっていないため細胞内に高蓄積するためであると考えられた。これらの背景から、本研究は TPT のリード化合物である CPT 耐性形質を持った細胞を薬剤耐性形質モデルとし、薬剤耐性形質を有する癌細胞に対する NTD の抗腫瘍効果の検証を *in vitro* および動物実験で評価した。

### 結果及び考察

通常の培地で培養した A549 細胞(A549)に CPT を 2.5 $\mu$ M 濃度で 1 週間処理し、生存した細胞をカンプトテシン耐性細胞株(Camptothecin resistant cell :CRC)として実験に用いた。耐性細胞の選抜に用いた CPT に対して CRC がどの程度耐性形質を示すのかを確認するために A549 と CRC を CPT で 72 時間処理して細胞毒性を比較すると、10 $\mu$ M では大きな差はみられなかったが、低濃度域になるにつれて CRC の生存率は増加する結果が得られた。両細胞を NTD で 72 時間処理すると、細胞毒性に大きな差はみられなかった。しかしながら、2.5 $\mu$ M において CRC では若干感受性が高くなっているようであった(P=0.09)。この結果は A549 に比べて CRC では NTD に対する感受性の変化が起きていることを示唆するものと考えられた。

次いで、CPT に対する耐性により変化する ABC transporter の発現増加を明らかにするために ABC transporter 群の mRNA 量を比較した。CRC では特に ABCC 群の顕著な発現増加が確認された。ABCC 群の中で高発現を示した ABCC1、ABCC2、ABCC3 のタンパク質の発現を nA549 と比較すると、ABCC1 及び ABCC2 のタンパク質の発現が増加していた。この結果は 549 細胞において CPT 排出に大きくかかわっているのは ABCC1 及び ABCC2 であることを示唆していた。

細胞毒性試験において、NTD が CRC に対して細胞毒性を示すことが確認されたが、A549 と同様にアポトーシスを誘導しているのかは未確認である。そのため、アポトーシスに関連する分子の比較を行った。CRC を NTD で処理すると *Fas* や *Bax* が増加し、MMP の消失が観察され、カスパーゼ 9 および 3&7 の活性化が確認された。これらの結果は CRC に対する細胞毒性は MMP 消失に由来するアポトーシスであることを支持した。NTD の蓄積量は細胞毒性と相関することを過去に報告している。このことから先に述べた NTD に対する CRC の感受性の変化が細胞内蓄積量に差があるのではないかと考え、NTD の細胞内蓄積量の経時変化を A549 と CRC で比較した。A549 は NTD 処理後 120 分まで時間経過とともに徐々に細胞内に NTD が蓄積しているのに対し、CRC の NTD 蓄積量は 30 分以内に速やかに起こり、その後は緩やかに蓄積していた。この結果は NTD が CRC に対してより速やかに細胞毒性を示す可能性を示唆している。そこで、通常 72 時間の処理時間を短縮した 12 時間処理条件下での CRC に対する NTD の毒性を評価した。A549 については NTD で 12 時間処理しても細胞毒性は認められなかった。

CRC は処理後 1 時間後から細胞毒性が認められ、12 時間まで生存率は漸次低下していった。この結果は NTD に対する CRC の感受性が A549 より高くなったことを示すものと考えられた。この現象が NTD 処理においてのみ起きているのかを検証するため、ドキソルビシンやイマチニブといった抗がん剤を 12 時間処理し、D<sub>50</sub> 値を算出して NTD と比較した。NTD を 12 時間処理した A549 の D<sub>50</sub> 値は 130.0 (215.0-79.0)  $\mu$ M である一方、CRC では 5.7 (10.7-2.9)  $\mu$ M と低い結果となった。ドキソルビシン及びイマチニブの D<sub>50</sub> 値は両細胞間で大きな違いは見られなかった。これらの結果は、NTD が CRC に対してのみ高い特異性を示し、A549 と比較して低濃度かつ短時間で細胞毒性を示すことを表していた。また、CRC における NTD の蓄積が細胞毒性と相関しており、CRC に対する選択性の原因となっていることが示唆された

通常 ABC transporter が発現している細胞は抗がん剤が排出されるため、細胞内蓄積は低くなり、その結果 D<sub>50</sub> 値は高くなることはよく知られている。これまでの結果は ABC transporter の発現と CRC に対する NTD の感受性は逆相関していた。そこで、様々な細胞株で ABC transporter の発現と NTD の蓄積量及び、D<sub>50</sub> 値の相関関係を調べた。ABCC1、ABCC2、ABCC3 の発現と NTD の蓄積は正に相関し、D<sub>50</sub> 値と ABCC2、ABCC3 は負に相関していた。すなわち、NTD は ABC transporter の発現が増加している細胞に対してより蓄積しやすく、特に ABCC2 と高い相関関係が見られた。これまでの研究においては抗がん剤が細胞外に排出される現象にのみ注目が集まってきた。しかしながら、我々は本研究の結果は ABCC2 が NTD の取り込みを促進しているのではないかと、との仮説をたてている。薬剤耐性に寄与している薬剤排出タンパク質が逆に抗がん剤の取り込みを促進するという可能性は、薬剤耐性を克服する新しい視点となることが考えられる。

次に NTD の CRC に対する抗腫瘍効果の変化を動物実験においても確認できるのかを検証するために、ヌードマウスに A549 及び CRC を移植し、NTD を腹腔内投与することで抗腫瘍効果を検証した。NTD を腹腔内投与することで体重の減少や肝障害マーカーである ALT や AST の変動は未処理群と比較して起こらなかった。A549 移植マウスに NTD を腹腔内投与すると、約 14 日目で抗腫瘍効果が確認された。一方、CRC 移植マウスでは NTD 投与 4 日目から抗腫瘍効果が現れ、14 日目まで抗腫瘍効果が持続された。この現象は、*in vitro* 試験で確認された CRC における NTD の蓄積が nA549 と比べて早く細胞毒性を示すことに起因するものであるためと考えられた。

### 第 3 章

#### 序論及び目的

がんの化学療法において現在までに様々な薬剤が開発されているが、一般的に投与される経路として点滴による静脈注射によるものが多い。しかしながら、患者の視点からは、錠剤による抗がん剤投与は簡便であり利用しやすいため、経口投与でも効果的な抗がん剤の開発が望まれている。薬物動態を考える上で肝臓や腎臓による代謝や排出が重要であることはよく知られているが、経口投与においては腫瘍組織に届くまでに、吸収効率、代謝、排泄等の問題点があるため、経口投与できる抗がん剤開発の成功例は多くはない。

NTD を含有しているサルカケミカン是世界の亜熱帯地域に生育し、様々な生理活性を持つ植物であることが知られており、伝承的に煎じ汁が咳、リウマチ、マラリアの治療や飛竜掌血という生薬としても用いられており、経口から摂取されている。沖縄県においては伝承的にサル

カケミカンの茎をお茶として飲むことで風邪や咳の治療に用いられており、実際にサルカケミカンの茎を湯煎してみるとわずかながらではあるが、NTD が溶出されることが確認できた。これらの伝承的に経口摂取されているサルカケミカンは比較的安全である可能性が高く、またお茶等として日常的に NTD を経口摂取ができる可能性があると考えられた。

NTD の抗腫瘍効果は現在までのところ腹腔内投与でのみで検証され、経口投与による抗腫瘍効果は不明である。NTD を含有しているサルカケミカンは様々な化合物を含んでいるため、有用成分である純度の高い NTD を精製するには時間及びコストがかかるのが現状である。しかしながら NTD はがん細胞に特異的に蓄積するためサルカケミカン粗抽出物を用いても腫瘍組織内に蓄積した NTD を検出することで NTD の抗腫瘍効果を検証できる可能性があった。そこで本章では NTD を 1mg 含有するサルカケミカン粗抽出液を連日経口投与することで抗腫瘍効果が起こるのかを検証することを目的とした。

### 結果及び考察

4kg のサルカケミカン粉末を 10 倍量の 99.5%EtOH で抽出し濃縮後、等量の酢酸エチルと液-液分配し酢酸エチル画分を回収した。酢酸エチル画分を濃縮乾固後、99.5%EtOH を加え再溶解し中圧カラム(シリカゲル)によって分離した。溶出溶媒は 99.5%EtOH、50%EtOH、50%EtOH+0.5%ギ酸の順で溶出し 50%EtOH+0.5%ギ酸画分を回収した。回収した画分を濃縮・乾固した結果、195mg の NTD を含むサルカケミカン粗抽出物 6.34g を得た。作製したサルカケミカン粗抽出物は 99.5%EtOH で再溶解し、通常飼料に混ぜた飼料を 4g(NTD1mg 含有量)毎日摂取することで A549 異種移植マウスに対する抗腫瘍効果を検証した。第 2 章で NTD を腹腔内投与した時と同様にサルカケミカン粗抽出物を経口投与することでも抗腫瘍効果が確認された。サルカケミカン粗抽出物を摂取した群では通常食群と比べ体重の減少が見られた。一方、肝障害の指標である血中の ALT や AST、病理組織学的診断結果からは肝障害は確認されなかった。従って、サルカケミカン粗抽出物を摂取した群での体重減少は NTD に原因があるのではなく、サルカケミカンに含まれる抗肥満作用を示すクレアチンやカルバクロールに起因する可能性があると考えられた。実際、第 2 章で純度の高い NTD を腹腔内投与した場合には体重の減少は見られないことから NTD に副作用はなく、体重の減少は NTD 以外の成分によるものとの解釈は支持されると考えられた。

本研究ではサルカケミカン粗抽出物を使用したため、抗腫瘍効果が NTD に起因するものであるのかを検証する必要性があった。NTD は腫瘍細胞に特異的に蓄積するため、腫瘍内に NTD が蓄積しているのかを LC-MS/MS を用いて検証した。肺、腎臓、肝臓、脾臓では NTD は検出されず、NTD は腫瘍組織でのみ検出された。この結果は本研究で実証された経口投与による抗腫瘍効果が少なくともサルカケミカン中に含まれている NTD が腫瘍中に蓄積することに起因するものであると考えられた。また、NTD はその他の臓器に蓄積していることが確認されなかったことから、実際に臨床応用しても副作用の少ない抗がん剤となることが期待された。同時に、本研究成果は経口投与した NTD も抗腫瘍効果をもつことを示唆していると考えられた。

本研究の結果は、NTD の特徴的な選択的毒性メカニズムは薬剤耐性細胞に対しても有効である可能性を示唆し、NTD の臨床応用に向けた基礎的知見をさらに広げることができた。この特徴的なメカニズムをさらに研究を進めることで、新規の抗がん剤開発に寄与するものと考えられる。