

氏名 (生年月日)	いまほり だいすけ 今堀 大輔 (1993年7月8日)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博薬 第212号
学位授与の日付	2022年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Adriamycin 誘発アポトーシス様細胞死を指標とした抗がん剤感受性増強作用を有する天然有機化合物の探索研究
論文審査委員	(主査) 教授 渡辺 徹志 (副査) 教授 芦原 英司 (副査) 教授 西口 工司

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

がん治療において従来から広く用いられてきた細胞障害性抗がん剤は、その細胞増殖抑制および細胞死誘導作用によって、がん治療効果を示す。しかしながら、これらの薬剤に耐性を有するがん細胞の存在により、がんの再発が起こる。がん細胞が薬剤耐性を示す原因として、薬剤排出輸送体である P 糖タンパク質 (P-gp) および抗アポトーシス機能を有する熱ショックタンパク質 (HSP) 等の過剰発現が挙げられる。P-gp は種々の抗がん剤の取り込みや排出に関与することで、細胞内の薬剤濃度を低下させることにより、抗がん剤のがん治療効果を低下させる。また、HSP は小胞体ストレスおよび酸化ストレス等によるアポトーシスを抑制することで抗がん剤耐性に関与している。このため、P-gp および HSP 等、がん細胞が薬剤耐性を示す原因分子の機能を阻害する薬剤を細胞障害性抗がん剤と併用することにより、がん治療効果を高め、がんの再発を効果的に予防できると考えられる。

P-gp および HSP 105 の機能を阻害することにより、がん細胞の細胞障害性抗がん剤への感受性が上昇することが報告されているが、それらの阻害により細胞増殖抑制や細胞死は引き起こされない。このため、P-gp や HSP 105 に対する阻害剤を見出すには、抗がん剤と併用したときのみ細胞死を誘導する物質を探索する必要がある。さらに、抗がん剤との併用により引き起こされる細胞死に伴う形態変化を観察することで、抗がん剤への感受性を高める物質を効率的に見出せると考えた。そこで本研究では経時的な形態変化を観察可能であるライブセルイメージング解析を用いて、単独では細胞増殖に影響を与えず、細胞障害性抗がん剤と併用することによりがん細胞の抗がん剤への感受性を増強させる天然有機化合物を探索するとともに、その機序解明を行った。

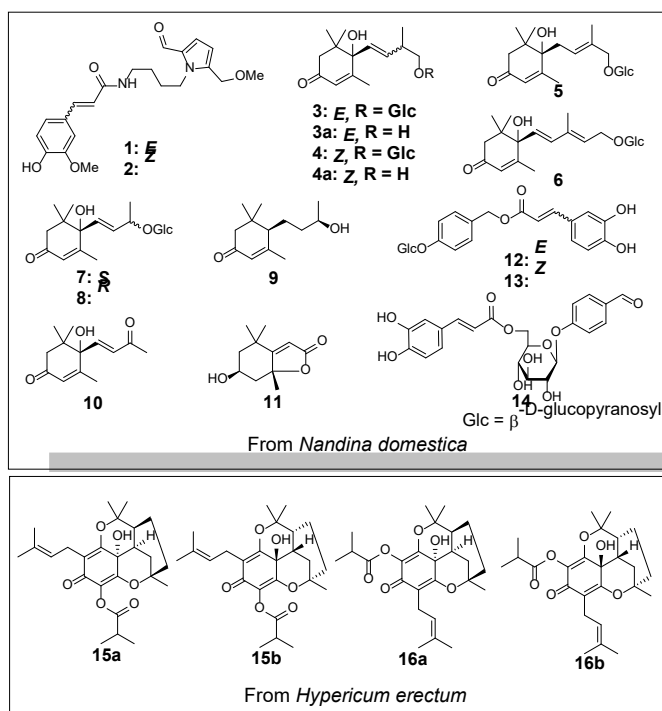
第一章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分の単離および構造決定

本章では、多様な生物活性を示すアルカロイドの含有が報告されているナンテン (*Nandina domestica*) および特有かつ多様な環化構造を形成するプレニル化フロログルシノール類を含有するオトギリソウ (*Hypericum erectum*) について含有成分の探索を行った。

ナンテン果実よりアルカロイド成分の単離を試みた結果、2 種の新規アルカロイド

methyl-*E*-magnolamide (1) および methyl-*Z*-magnolamide (2) とともに、4 種の新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmanes I-IV (3-6) および 8 種の既知化合物 (7-14) を単離・構造決定した。

次に、オトギリソウ全草より、プレニル化フロログルシノール類の探索を行い、4 種の新規化合物 (+)-erectumol I (15a)、(-)-erectumol I (15b)、(-)-erectumol II (16a)、および (+)-erectumol II (16b) を単離した。15 および 16 は、それぞれエナンチオマー混合物として得られ、単結晶 X 線構造解析により、その平面構造および相対立体配置を決定した。さらに光学分割後、電子円二色性スペクトル理論計算により、各光学活性体の絶対立体配置を決定した。



第二章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価

細胞障害性抗がん剤である Adriamycin (ADR) は低濃度ではがん細胞の細胞分裂

を停止させ、高濃度では致死作用を示す。本章では低濃度 ADR 処理時に被験化合物を併用し、がん細胞の ADR 感受性増強によるがん細胞死を指標として活性評価を行った。第一章で得られた化合物に 3 および 4 の加水分解により得られた 3a および 4a を加えた、計 20 種の化合物について、被験化合物単独および ADR との併用下でヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に与える影響を評価した。被験化合物処理後、24 時間ライブセルイメージング解析を行い、細胞増殖および細胞死に伴う形態変化を観察することで、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合を計測した。その結果、1 および 2 が単独では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えず、ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。一方、15b および 16b も同様に有意な ADR の作用増強作用を示したが、それらのエナンチオマーである 15a および 16a は作用を示さなかった。この結果から、有意な ADR の作用増強作用を示した化合物は、がん細胞の細胞障害性抗がん剤への耐性を標的とする可能性が考えられた。

第三章 ピロールアルカロイドおよびプレニル化フロログルシノールの抗がん剤感受性増強作用機序の解明

ADR は抗がん剤耐性の要因である P-gp の基質であることから、第二章で有意な ADR の作用増強作用を示した化合物は P-gp の機能を阻害している可能性があると考えられた。そこで、1、2、15b および 16b が、P-gp の基質である Rhodamine 123 (Rh 123) の細胞外排出へ与える影響を評価した。その結果、1 および 2 は Rh 123 の排出を阻害し、15b および 16b は阻害作用を示さなかった。これらの結果より、1 および 2 の ADR の作用増強作用は P-gp の機能阻害による可能性が示唆された。

HSP 105 はがん細胞のアポトーシスを抑制することで、ADR 耐性を引き起こす。そこで、第 2 章で有意な ADR の作用増強作用を示したにもかかわらず、P-gp 阻害作用を示さなかった 15b が、HeLa 細胞における HSP 105 の発現に与える影響をウェスタンブロット法により検討した。その結果、15b 処理 24 時間後において、HSP 105 発現量の濃度依存的な低下が見られた。さらに、同様の条件にお

いて HSP の発現を制御する熱ショック転写因子 (HSF1) に与える影響を検討したところ、発現の低下がみられた。このことから、15b は HSF1 の発現低下を介し、HSP 105 の発現を低下させることにより、ADR の作用を増強することが示唆された。

総括 (結論)

本研究ではアポトーシス様細胞死を指標とし、がん細胞の ADR に対する感受性を増強させる化合物として methyl-*E*-magnolamide (1)、methyl-*Z*-magnolamide (2)、(-)-erectumol I (15b)、および (+)-erectumol II (16b) を見出した。さらに ADR の作用増強が、1 および 2 は P-gp 阻害作用による ADR の細胞外排出抑制作用によるものであり、15b は HSP 105 の発現量を低下させる作用によるものであることを明らかにした。P-gp および HSP 105 は大腸がん、肺がん、膵がん等において過剰発現しているため、本研究で見出した化合物は細胞障害性抗がん剤のがん治療効果を高め、がんの再発予防に貢献する可能性がある。

審査の結果の要旨

《緒言》

細胞傷害性抗がん剤は、がん治療において広く使用されているが、正常細胞への有害作用やがん細胞における薬剤耐性などの問題がある。薬剤耐性を示す原因として、P 糖タンパク質 (P-gp) の高発現による薬剤排出の亢進や熱ショックタンパク質 (HSP) の高発現による抗アポトーシス作用の亢進などがあげられ、これら薬剤耐性の原因となる物質の機能や発現を阻害することにより、がん細胞の抗がん剤に対する感受性が亢進し、抗がん剤の用量の削減や薬剤耐性を有するがん細胞によるがんの再発の予防に貢献できるのではないかと考えられる。本研究では、そのような抗がん剤に対するがん細胞の感受性を増強する物質を見いだすことを目的として、ナンテンおよびオトギリソウについて含有成分の探索を行うとともに、単離同定した成分等の抗がん剤感受性増強作用の評価を行い、更にその作用機序について検証した。

《審査結果の要旨》

第一章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分の単離および構造決定

ナンテン (*Nandina domestica*) 果実よりアルカロイド成分の単離を試みた結果、2 種の新規アルカロイド methyl-*E*-magnolamide および methyl-*Z*-magnolamide とともに、4 種の新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmanes I-IV および 8 種の既知化合物を単離、構造決定した。また、オトギリソウ (*Hypericum erectum*) 全草より、4 種の新規プレニル化フロログルシノール類 (+)-erectumol I、(-)-erectumol I、(-)-erectumol II および (+)-erectumol II を単離し、構造決定した。

第二章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価

第一章で得た 18 種の化合物に、ナンテンより得た nandinamegastigmanes I および nandinamegastigmanes II の加水分解物を加えた、計 20 種の化合物について、被験化合物単独および Adriamycin (ADR) との併用下でヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に与える影響を評価した。すなわち、被験化合物処理後、24 時間ライブセルイメージング解析を行い、細胞増殖および細胞死に伴う形態変化を観察することで、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合を計測し、有糸分裂期移行細胞および

死細胞の割合を計測した。その結果、methyl-*E*-magnolamide、methyl-*Z*-magnolamide、(-)-erectumol I および (+)-erectumol II が、単独では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えない用量で、ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することを見いだした。

第三章 ピロールアルカロイドおよびプレニル化フロログルシノールの抗がん剤感受性増強作用機序の解明

第二章で有意な ADR の作用増強作用を示した 4 種の化合物について、P-gp の基質である Rhodamine 123 の細胞外排出へ与える影響を評価することで、methyl-*E*-magnolamide および methyl-*Z*-magnolamide の ADR の作用増強作用が P-gp の機能阻害による可能性があることを明らかにした。また、(-)-erectumol I が HeLa 細胞における HSP 105 および熱ショック転写因子 (HSF1) の発現に与える影響をウエスタンブロット法により検討し、(-)-erectumol I が HSF1 の発現低下を介して HSP 105 の発現を低下させることにより、ADR の作用を増強する可能性があることを明らかにした。

《審査の結論》

本研究により、がん細胞の ADR に対する感受性を増強させる化合物として、4 種の新規天然有機化合物 methyl-*E*-magnolamide、methyl-*Z*-magnolamide、(-)-erectumol I および (+)-erectumol II を見いだした。さらに、それらの ADR に対する感受性増強作用が、P-gp 阻害作用による ADR の細胞外排出抑制作用や HSP 105 の発現量を低下させる作用によるものである可能性を明らかにした。今後、*in vivo* での検討などが必要であるが、本研究で見いだした化合物は、細胞障害性抗がん剤のがん治療効果を高め、がんの再発予防に貢献する可能性があり、新たな医薬品開発に関わる有用な知見が得られたと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。