

天然由来分子のがん細胞に対する選択的傷害活性

Selective cytotoxicity of organic compounds derived from natural resources

○細野智史¹, 浮谷基彦², 永井慶太¹, 仁科淳良², 深津 誠²○Satoshi Hosono¹, Motohiko Ukiya², Keita Nagai¹, Atsuyoshi Nishina², Makoto Fukatsu²

Abstract: 80 Compounds (13 flavonoids, 6 diterpenoids, 7 steroids, 12 limonoids, 2 alkaloids, 9 phenylpropanoids, 20 glycosides, and 11 triterpenoids) derived from natural resources were evaluated for their cytotoxicities against human non-small cell lung cancer cells (A549) and normal human lung fibroblast cell (WI-38) with respect to selective cytotoxicity. Among the tested compounds, triterpene derivative, oleanolic acid methyl ester conjugated with glycine (**78**) showed potent activity with IC₅₀ value 2.7 μM. On the other hand, steroid, progesterone (**26**) showed moderate cytotoxicity against A549 and no cytotoxicity against WI-38. These results showed triterpene-amino acid conjugates and steroids may be valuable anticancer lead compounds.

1. 緒言

2013年の日本における死亡原因の第1位は悪性新生物(がん)であり, 年々増加傾向にある^[1]. 抗がん剤はがん細胞だけでなく正常細胞へも毒性を示すことがあり, 副作用が生じる原因となる. 理想的な抗がん剤とは正常細胞に対しては無害で, がん細胞へのみ作用する「がん細胞選択性」をもつ化合物であり, 高い選択性を持つ分子を見出す試みが多くの研究機関で行われている. 本研究室でもこれまでに植物資源から得た天然物の抗がん活性を評価しており, そこで構築した化合物ライブラリーが持つ, がん細胞選択性に興味を持たれた.

一方, 化合物ライブラリーを用いたランダムスクリーニングに対し, がん細胞に特異的に発現している分子を標的にした分子標的薬の開発も盛んに行われている. 標的の一つであるアミノ酸トランスポーターは, がん細胞で特異的に発現が上昇する輸送タンパク質であり, 多くのアミノ酸類似分子を受け入れることが知られている^[2].

以上の背景から本研究では, がん細胞へ選択的に作用する分子を見出すべく, 以下の実験を行う.

- ①分子標的薬開発の観点から, アミノ酸トランスポーターを標的とした分子を得るべく, 天然物にアミノ酸構造を導入した分子を調製する.
- ②既存の天然物由来化合物ライブラリーに調製したアミノ酸誘導体を加えたライブラリーを構築することで, それらのがん細胞および正常細胞に対する傷害活性を評価し, 化学構造と細胞選択性との関係を明らかにする.

2. 実験

2-1.Oleanolic acid アミノ酸結合型誘導体の調製

Oleanolic acid (オレアナン型トリテルペン) にアミノ酸を結合した分子の調製を行った. オレアナン型トリテルペンは一酸化窒素産生抑制活性, 腫瘍細胞傷害活性などの様々な生物活性が見出され, 機能性化合物創製のテンプレート化合物として有用と考えられている^[3]. ここでは, Oleanolic acid のメチルエステル化により得た Oleanolic acid methyl ester (**75**) の3位水酸基とアミノ酸 (L-Ala, D-Ala, Gly, L-Val, L-Phe) とのカルボジイミド系縮合剤によるエステル化を行い, 計6種の化合物 (**75-80**) を調製した (**Figure 1**).

2-2.天然物由来化合物ライブラリーの選択的がん細胞傷害活性評価

当研究室にて保有する天然物由来化合物ライブラリー [74種の化合物; フラボノイド13種 (**1-13**), ジテルペン6種 (**14-19**), ステロイド7種 (**20-26**), リモノイド12種 (**27-38**), アルカロイド2種 (**39-40**), フェニルプロパノイド9種 (**41-49**), 配糖体20種 (**50-69**), トリテルペンアミノ酸誘導体5種 (**70-74**)] と新たに調製した化合物6種 (**75-80**) の計80種を用いてヒト肺胞基底上皮腺がん細胞 (A549) および, ヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI-38) に対する細胞傷害活性評価を MTT法^[4]により評価した. 傷害活性はそれぞれ IC₅₀ 値 (μM) として算出した. また, 肺がん細胞 (A549) に対する選択性 (Selectivity index : SI) はそれぞれの細胞に対する IC₅₀ の比 (SI = WI-38 の IC₅₀ / A549 の IC₅₀) で表した.

1 : 日大理工・院 (前)・応化, CST, Nihon-U 2 : 日大理工・教員・応化, CST, Nihon-U

3. 結果

80 種の化合物について A549 細胞に対する細胞傷害活性評価を行った。その結果, 25 種[フラボノイド 8 種 (1-6, 12, 13), ジテルペン 2 種 (15, 18), ステロイド 2 種 (20, 26), リモノイド 2 種 (33, 38), アルカロイド 1 種 (40), 配糖体 2 種 (63, 68), トリテルペンアミノ酸誘導体 8 種 (70, 71, 73-78)] の化合物が比較的高い細胞傷害活性を示し, その中でも 5 種の化合物 (1, 2, 4, 68, 78) が参照化合物 Cisplatin と同程度あるいはそれ以上の活性を示した (Table 1).

また, これら 25 種の化合物について正常細胞 WI-38 への細胞傷害活性を評価し, 7 種 (1, 4, 15, 18, 26, 33, 68) が SI 値 1 以上の値を示した。特に, progesterone (26) は正常細胞 WI-38 には活性を示さず ($IC_{50} > 100 \mu M$), がん細胞 A549 には中程度の傷害活性 ($IC_{50}; 31.6 \mu M$) を示した (SI ≥ 3.2) (Table 1).

4. 考察

本研究で用いたライブラリーでは, ステロイド化合物 1 種 (26) に比較的高いがん細胞に対する選択性を認めた。しかし同じステロイドでも化合物 24, 25 は A549, WI-38 どちらに対しても傷害活性は示さなかった。この結果より, ステロイド化合物 (26) の選択性の要因は, D 環の官能基による構造の変化が起因していることが示唆された (Figure 2).

一方, 選択性の評価には至っていないが, トリテルペン誘導体の Oleanolic acid methyl ester (75 ; IC_{50} 39.4 μM) はグリシンとの結合により活性が向上 (78; IC_{50} 2.7 μM) することも確認できた。トリテルペンとステロイドは生合成的に非常に近い関係にあることから, これらの化学構造と選択的細胞傷害活性をさらに検討する必要があると考えている。

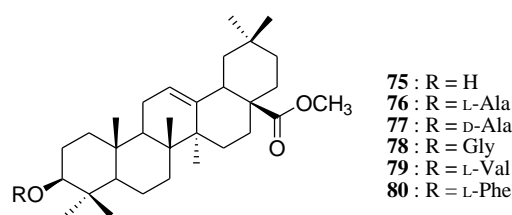


Figure 1 Structures of compounds 75-80

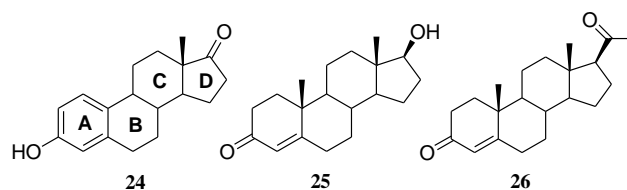


Figure 2 Structures of compounds 24-26

5. 参考文献

- [1] 厚生労働省: 「平成 26 年 我が国の人口動態 —平成 24 年までの動向」, 2013.
- [2] H. Uchino, Y. Kanai, D. K. Kim, M. F. Wempe, A. Chairoungdua, E. Morimoto, M. W. Anders, H. Endou : 「Transport of Amino Acid-Related Compounds Mediated by L-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1): Insights Into the Mechanisms of Substrate Recognition」, *Mol. Pharmacol.*, **61**, 729-737, 2002.
- [3] H. Sun, W. Fang, W. Wang, C. Hu : 「Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids」, *Bot. Stud.*, **47**, 339-368, 2006.
- [4] T. Kikuchi, M. Nihei, H. Nagai, H. Fukushi, K. Tabata, T. Suzuki, T. Akihisa : 「Albanol A from the root of *Morus alba* L. induces apoptosis cell death in HL60 human leukemia cell line」, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 568-571, 2010.

Table 1. Cytotoxicities [IC_{50} (μM)] against human cancer cell A549 and human normal cell WI-38 of compounds 1-6, 12, 13, 15, 18, 20, 26, 33, 38, 40, 63, 68, 70, 71, 73-78

No	Compounds	A549	WI-38	No	Compounds	A549	WI-38
1	Isocyclomorusin	10.2	10.7	40	9-Hydroxycanthin-6-one	44.0	10.9
2	Cycloartocarpin A	20.3	15.8	63	4-(4-Hydroxyphenyl)-2-butanone 4'-O-(6-O-galloyl-2-O-cinnamoyl)glucoside	97.6	-
3	Artocarpin	36.1	16.0	68	Calendulaglycoside F 6'-O-n-butyl ester	9.2	18.1
4	Cudraflavone B	19.6	24.9	70	Dammarenoyl-L-aspartic acid methyl ester	27.3	-
5	Artocarpanone	84.6	82.9	71	Dammarenoyl-L-serine methyl ester	56.8	-
6	Cycloartocarpesin	26.5	8.4	73	Dammarenoyl-L-alanine methyl ester	49.4	-
12	Chrysin	59.0	-	74	Dammarenoyl-L-tyrosine	24.0	-
13	Biochanin A	53.4	-	75	Oleanolic acid methyl ester	39.4	-
15	Nimbidiol	38.9	57.2	76	Oleanolic acid methyl ester 3-O-L-alanine conjugate	39.5	-
18	Dehydroabietic acid	88.5	98.1	77	Oleanolic acid methyl ester 3-O-D-alanine conjugate	39.2	-
20	Nimbidiol	92.5	46.3	78	Oleanolic acid methyl ester 3-O-glycine conjugate	2.7	-
26	Progesterone	31.6	>100		<u>Reference compound</u>		
33	7-O-Benzoylnimbocinol	4.2	7.8		Cisplatin	18.4	20.2
38	7-Deacetyl-7-Benzoygedunin	24.0	-				