

クロコブタケからの血管新生阻害活性物質の探索

～血管内皮細胞増殖阻害活性を指標として～

Search for Antiangiogenic Constituents from *Hypoxylon truncatum*

～Evaluation of Antiproliferative Activities against Vascular Endothelial Cells～

平成 23 年度入学 深井みゆき (Fukai, Miyuki)

指導教員 小山 清隆

動植物に対する調査，研究が急速に進展する中，菌類の研究はいまだ未成熟である．これまで人類は，菌類の有用な働きに着目して発酵・醸造食品を創り出し，また菌体そのものである「キノコ」を食用および薬用として活用してきた．キノコには，抗がん剤として用いられる多糖を産生する種や，生物活性を有する特異な二次代謝産物を生産する種が見出されるなど，注目すべき薬用天然資源のひとつとして興味をもたれている．

さて，がんは 1980 年代に日本人の死因第一位となり今日に至っている．この間，ヒトがん遺伝子やがん抑制遺伝子が次々に発見され，分子標的治療薬の開発が活発に展開されている．特に，がんの成長や転移に関わる血管新生を標的とする薬剤は現在最も注目を集める分子標的治療薬のひとつである．しかし予期せぬ副作用や薬剤耐性，効果の個人差など克服すべき課題は多く，より良い治療薬の創成のために **Me-too-drug** の開発や骨格ホッピングアプローチ，バイオアイソスター探索などが盛んに行われている．

以上の背景を踏まえて，血管内皮細胞の増殖阻害活性を指標として子囊菌クロコブタケ (*Hypoxylon truncatum*) 子実体の二次代謝産物より，血管新生阻害剤の新たなリード化合物およびその標的分子の探索を目指して創薬探索研究を展開した．

## 1. クロコブタケ子実体からの血管内皮細胞増殖阻害化合物の探索

### 血管内皮細胞増殖阻害試験

血管新生は血管内皮細胞の増殖，遊走，管腔形成のステップを踏んで起こる．なかでも血管内皮細胞の増殖は血管新生において必要不可欠なステップであり，VEGF（血管内皮増殖因子）は，その促進因子として重要な役割を果たしている．本研究では，培養した HUVEC（正常ヒト臍帯静脈内皮細胞）に 1 nM の VEGF および sample を添加し，WST-8 試薬を用いた MTT 法により抽出エキス，画分および単離化合物の細胞増殖阻害活性を検討した．

### クロコブタケの成分探索

クロコブタケは，子囊菌亜門，フンタマカビ綱，クロサイワイタケ目，クロサイワイタケ科，ヒポキシロン属に属する不食性のキノコである．ナラ，サクラなどの広葉樹の枯幹に多く生じ，シイタケ栽培の病害菌となる．

2009 年 9 月に東京都東久留米市にて採集し，乾燥したクロコブタケ子実体を  $\text{CHCl}_3$ ，MeOH で順次抽出し，エキスを作成した．次に，HUVEC 増殖阻害活性を示した  $\text{CHCl}_3$  エキスを，HUVEC 増殖阻害活性を指標として silica gel column chromatography (C. C.)，Sephadex LH-20 C. C.，ODS C. C. および ODS HPLC 等を用いて分離，精製を行い，HT-1～8 と仮称する 8 種の化合物を単離した．HT-1 および 2 は各種スペクトルデータによる構造解析と X 線結晶解析から benzo[j]fluoranthene を基本骨格にもつ新規化合物であり，それぞれ hypoxylonol C および F と命名した．<sup>1)</sup> HT-3～6 は，各種 NMR および MS スペクトルデータ等より，それぞれ既知化合物 hypoxylonol B, D, E および A であると同定した．<sup>2,3)</sup> なお，いずれも立体配置が不明であったので，NMR データおよび CD スペクトルの詳細な解析，X 線結晶解析により，これら 4 種の化合物の絶対構造を明

らかにした. <sup>1)</sup> HT-7 は各種スペクトルデータより新規 hypoxylonol 類であり, hypoxylonol G と命名した. HT-8 は各種スペクトルデータより truncatone であると同定し, <sup>4)</sup> X 線結晶解析により本化合物の絶対構造を明らかにした.

なお MeOH エキスは HUVEC 増殖阻害活性をほとんど示さなかったが, TLC の挙動から hypoxylonol 類を含むことが判明したので, 単離, 構造決定を目指して分離, 精製を行った. その結果, HT-9~12 と仮称した 4 種の新規 hypoxylonol 類の単離に成功し, それぞれ hypoxylonol H, I, J および K と命名した.

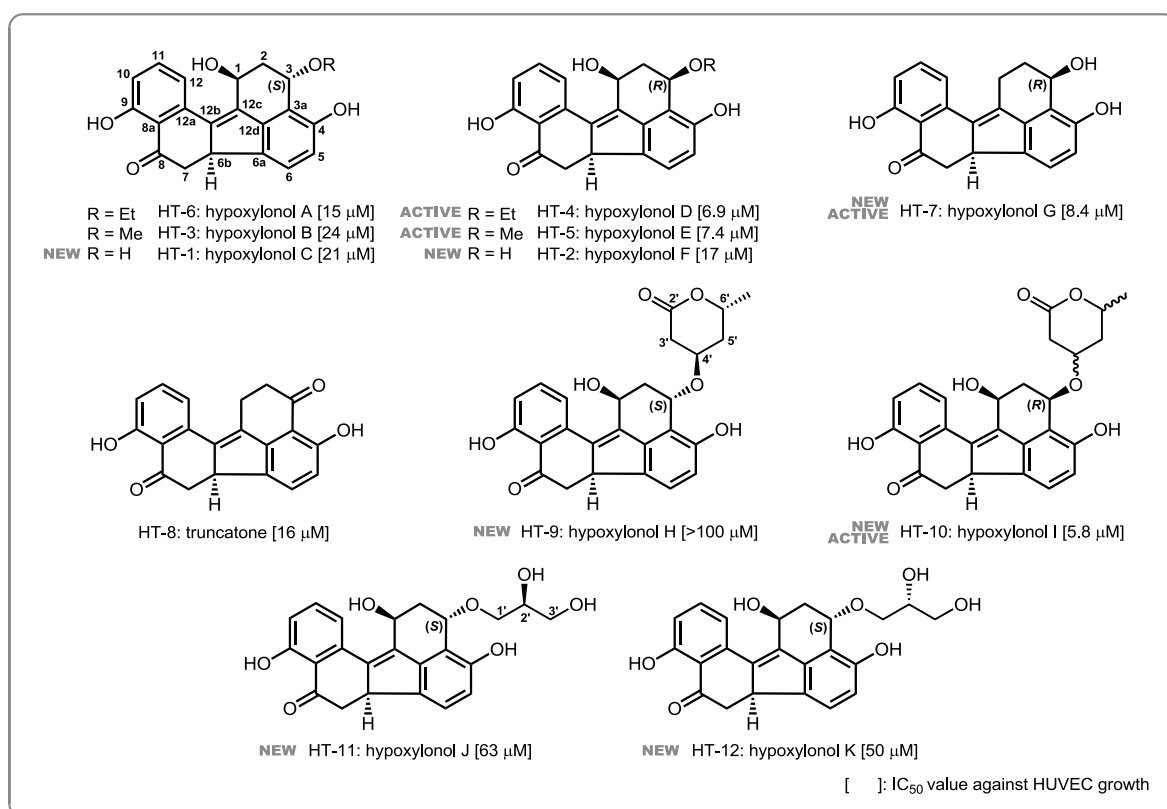


Fig. 1. Structures and IC<sub>50</sub> value against HUVEC of HT-1 – 12

単離した 12 種の化合物を HUVEC 増殖阻害試験に供したところ, hypoxylonol D, E, G および I に比較的強い HUVEC 増殖阻害活性を示し

た (Fig. 1). この結果から, hypoxylonol 類は, 3 位が *R* 配置であること, 3 位の水酸基に疎水性の置換基が結合していることが HUVEC 増殖阻害活性の増強に寄与していることが示唆された.

## 2. Hypoxylonol C の血管新生阻害作用の検討

クロコブタケ子実体  $\text{CHCl}_3$  および MeOH エキスから得られた 12 種の化合物のうち, 最も収量が多い hypoxylonol C について血管新生阻害作用を示すか否かを *in vitro* において検討した.

### HUVEC 遊走阻害試験

本試験はセルカルチャーインサートを用いて行った. インサート内で hypoxylonol C とともに HUVEC を培養し, 下部ウェルプレート of 培地中の VEGF により誘導され, インサートの小孔を通過し膜側へ遊走した細胞を観察した. 遊走細胞は簡便迅速メイ・ギムザ染色を行い, 顕微鏡下, 写真撮影した.

VEGF および hypoxylonol C 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  添加時に遊走細胞の減少が見られた (Fig. 2). Hypoxylonol C は 10  $\mu\text{M}$  および 1  $\mu\text{M}$  において HUVEC の遊走を阻害することが明らかになった.

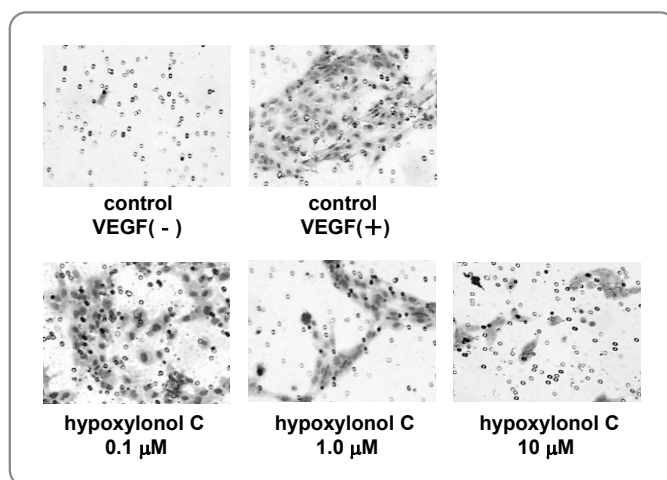


Fig. 2. Inhibitory Effect of Hypoxylonol C for Migration of HUVEC

### HUVEC 管腔形成阻害試験

本試験は, クラボウ社の血管新生キットを用いて行った. NHDF (正常ヒト皮膚線維芽細胞) と共培養した HUVEC に VEGF と hypoxylonol C を添加し, 11 日間培養した. 形成した血管をマウス抗ヒト CD31 抗体で染色し, 顕微鏡下, 写真撮影した.

VEGF および hypoxylonol C 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M 添加時に HUVEC の管腔形成の減少が見られた (Fig. 3).

Hypoxylonol C は 10  $\mu$ M および 1  $\mu$ M において HUVEC の管腔形成を阻害することが明らかになった.

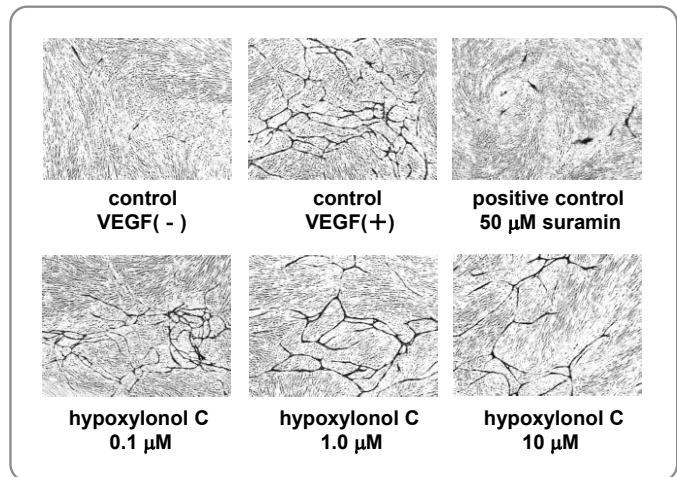


Fig. 3. Inhibitory Effect of Hypoxylonol C for Tubule Formation of HUVEC

### 標的分子の探索

血管新生は、その促進因子と抑制因子のバランスによって制御されており、その中核を担うのが VEGFR を介したシグナル伝達経路である。中でも VEGFR-2 である KDR がそのリガンド VEGF-A と結合して自己リン酸化を起こし、下流へと伝えるシグナルが血管内皮細胞の生存や増殖、遊走に関与している。<sup>5)</sup> そこで、KDR リン酸化阻害試験を行い、hypoxylonol C が KDR のチロシンリン酸化能に与える影響について検討した。本試験は、リコンビナントヒト KDR および Universal Tyrosine Kinase Assay Kit を用いて、ELISA 法により行った。その結果、hypoxylonol C は 300  $\mu$ M における KDR リン酸化阻害率が 2.5% であり、ほとんど阻害活性を示さなかった。

続いて、本化合物の血管新生阻害作用の標的分子を明らかにすべく、cDNA マイクロアレイ解析を用いて網羅的に標的分子の探索を行った。HUVEC に 1 nM の VEGF および 20  $\mu$ M の hypoxylonol C を添加して 24 時間培養し、24461 のヒト遺伝子の発現変動を解析した。その結果、細胞接着のパスウェイに関与する多くの遺伝子に発現変動が見られた。

次にこれら遺伝子について、その mRNA 発現の差異をリアルタイム

RT-PCRにて検証した。その結果, hypoxylonol Cにより VE-カドヘリン, インテグリン $\alpha_3$ および $\beta_1$ の mRNA 発現低下が認められた。この結果から hypoxylonol Cは, これら血管内皮細胞特異的な接着因子の mRNA 発現レベルの低下により血管新生阻害活性を示す可能性が示唆された。<sup>6)</sup>

## 総括

クロコブタケ子実体  $\text{CHCl}_3$ および MeOH エキスより, 7種の新規化合物を含む12種の化合物を単離, 構造解析し, これらのうち11種の絶対構造を明らかにした。また, hypoxylonol Cは *in vitro*において HUVECの遊走および管腔形成を阻害し, 血管新生阻害作用を示した。本化合物は, VE-カドヘリンなどの血管内皮細胞特異的な細胞接着因子の mRNA 発現低下により, 血管新生阻害作用を示す可能性が示唆された。

Benzo[*j*]fluorantheneを基本骨格にもつ天然化合物は稀であり, その生物活性に関する報告は少ない。本研究で単離, 構造解明した benzo[*j*]fluoranthene誘導体が *in vitro*における血管新生阻害作用を示したことから, 本骨格を有する天然化合物が新たな抗がん剤創薬シードになり得ることを明らかにした。

## 参考文献

- 1) Fukai M., Tsukada M., Miki K., Suzuki T., Sugita T., Kinoshita K., Takahashi K., Koyama K., *J. Nat. Prod.*, **75**, 22-25 (2012).
- 2) 倉持大輔, 明治薬科大学修 586号 (2000).
- 3) Koyama K., Kuramochi D., Kinoshita K., Takahashi K., *J. Nat. Prod.*, **65**, 1489-1490 (2002).
- 4) Hashimoto T., Asakawa Y., *Heterocycles*, **47**, 1067-1110 (1998).
- 5) Matsumoto T., Mugishima H., *J. Atheroscler. Thromb.*, **13**, 130-135 (2006).
- 6) Fukai M., Suzuki T., Kinoshita K., Takahashi K., Koyama K., *J. Nat. Prod.*, submitted.