

Wnt シグナル伝達に作用する天然由来化合物の探索

富山大学和漢医薬学総合研究所 資源開発研究部門 生薬資源科学分野

當銘一文

1. はじめに

自然界の存在する多種多様な生物種は、その生育環境や進化に応じて様々な二次代謝産物、すなわち天然物を産生することが知られている。天然物は人知の及ばないユニークな化学構造と興味深い生物活性を示すものが多く報告されており、医薬品のリード化合物や生命現象解明のための研究用試薬(ケミカルツール)などとして応用され、各種疾患治療や生命科学研究の推進に大きく貢献してきた¹。

我々は、がん疾患に関わるシグナル伝達に作用する天然物の発見を目指し、スクリーニング研究を行っており、有用な生物活性分子の創製を目指している。本稿ではがん疾患をはじめ、様々な疾患や生命現象に関与することが知られているウイント(Wnt)シグナルに着目した生物活性天然物の探索研究について紹介する。

2. Wnt シグナルとは

Wnt シグナルは、線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスおよびヒトに至るまで様々な生物種に保存されているシグナル伝達経路で、初期発生における体軸形成から各種組織・器官の形態形成、細胞の分化・増殖、組織幹細胞の維持、発がんにおける様々な生命現象の過程において多彩かつ重要な役割を担っている。Wnt は分子量約4万の分泌型糖タンパクであり、哺乳類においては現在までに19種のWntファミリーが知られている。本シグナル経路は、1) β -catenin/TCF (T-cell factor) を介して標的遺伝子の発現を調節する **Wnt/ β -catenin 経路**、2) 細胞骨格系の制御に関与する**細胞内平面極性(PCP)経路**、3) 細胞の接着、運動に関与している **Wnt/ Ca^{2+} 経路**の三つが知られている。 β -catenin/TCF 経路は古典的経路とも呼ばれ β -catenin に依存するが、他の二つは β -catenin に依存しない。 β -catenin は cadherin 結合タンパクとして同定され、細胞接着において重要な役割を担っている一方で、 β -catenin/TCF 経路においてはメディエーターとして機能し、Wnt シグナルの標的遺伝子の転写調節に関わる。このうち、本稿では β -catenin/TCF 経路に着目している。

Wnt リガンドタンパクがない状態すなわち Wnt シグナルが OFF の状態において、細胞質内の β -catenin は casein kinase-1 α (CK1 α)、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)、Axin, adenomatous polyposis coil (APC) など複合体 (β -catenin 分解複合体) を形成し、2つのキナーゼ CK1 α 、GSK3 β によるリン酸化を受け、プロテアソーム系において分解される。一方 Wnt リガンドタンパクが存在する、すなわち Wnt シグナルが ON の状態において、Wnt タンパクが

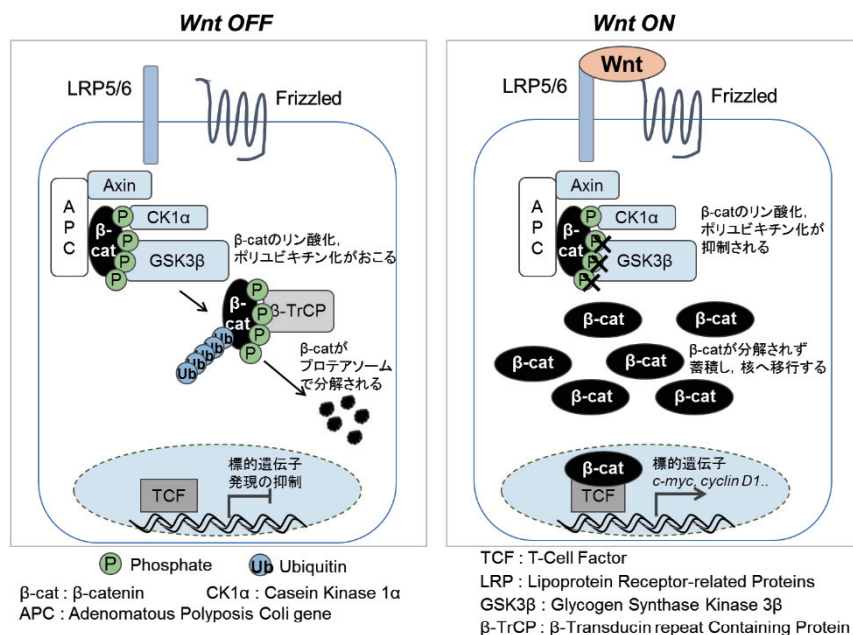


図1 Wntシグナル経路

frizzled (Fz) 受容体および共受容体である lipoprotein-related protein 5/6 (LRP5/6) に結合すると、 β -catenin のリン酸化、プロテアソーム系による分解が抑制され、細胞内に β -catenin が蓄積される。蓄積した β -catenin はその後、核内へ移行し TCF と複合体を形成し、標的遺伝子である *c-myc*, *cyclin D1*, *PPAR δ* , *COX-2* などの転写が亢進される (図 1)^{2,4}。

本シグナルは前述のように初期発生や組織・器官形成などの重要な生命現象に関わっている一方で、大腸がんをはじめとする種々のがん疾患における異常亢進が報告されている。また、糖尿病や精神疾患など各種疾患との関わりも示唆されている。このような背景から Wnt シグナルに作用する化合物は医薬品リード化合物や各種生命現象を研究する上での分子ツールとなることが期待される。

3. Wnt シグナルを標的としたスクリーニング⁵

当研究室で独自に構築した天然資源抽出物ライブラリーのうち、バングラデシュおよびタイにて採取した植物抽出物を対象として、TOPflash/FOPflash ルシフェラーゼアッセイシステム⁵を用いて Wnt シグナルを評価した。本アッセイシステムは、野生型 TCF 結合領域 (CCTTTGATC) をもつ SuperTOPflash レポーター遺伝子をヒト胎児腎細胞 HEK293 に安定導入した STF/293 細胞を用いた。試料添加によるルシフェラーゼ活性 (TOP 活性) の変化を測定することにより Wnt シグナルの最下流に位置する TCF/ β -catenin 転写活性の評価が可能である。本細胞は内在性 β -catenin 量が低いため、そのまま試験に用いると TOP 活性が小さい。そのため、試料添加の際 GSK3 β 阻害剤である LiCl をあわせて添加することにより、 β -catenin の分解を抑制し、TOP 活性を刺激した条件で試験を行った。また、細胞数の減少によりルシフェラーゼ活性が低下する可能性を除外する目的で、細胞生存率もあわせて評価した。

選別された良好な活性を示す化合物については、疑陽性を除く目的で、変異型 TCF 結合領域 (CCTTTGGCC) を

もつ SuperFOPflash を一過性導入した細胞を用いたルシフェラーゼ活性 (FOP 活性) をあわせて評価した。陽性試料であれば、FOP 活性に影響することなく TOP 活性のみを選択的に減少させると考えられる。しかし、偽陽性試料の場合、ルシフェラーゼたんぱく

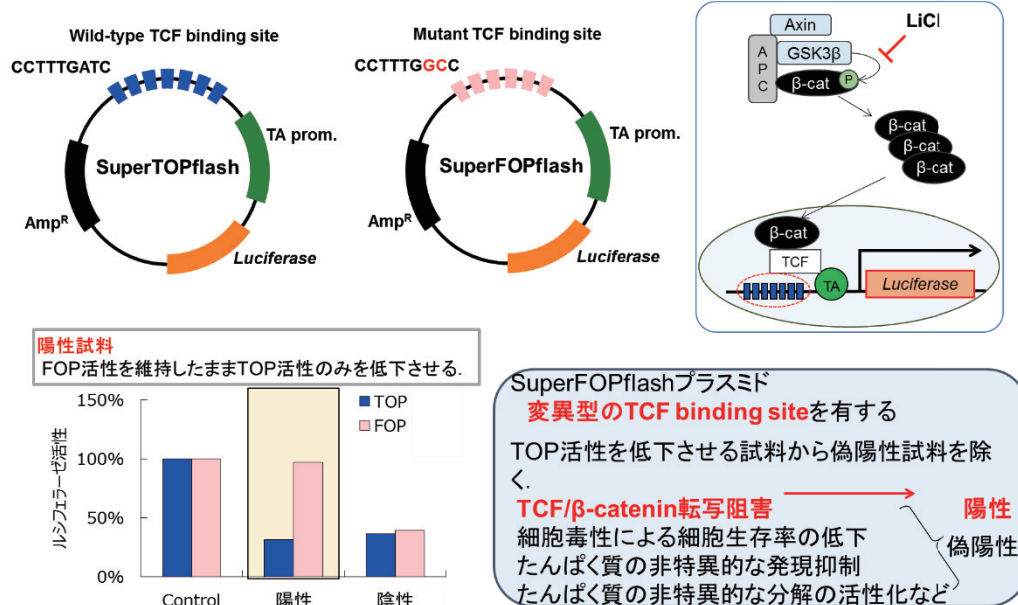


図 2 Wnt シグナル経路

影響すると考えられ、TOP 活性とともに FOP 活性も低下することが考えられる。したがって FOP 活性および細胞生存率を変化させることなく、TOP 活性のみを減少させるものが TCF/ β -catenin 転写阻害 (Wnt シグナル阻害) 活性をもつものと判断できる (図 2)。

我々は TOP 活性を指標としたスクリーニングにおいて阻害作用、または活性化作用を示す数種の植物抽出物を見出した。次にこれらの抽出物から得た活性成分とそれらの Wnt シグナル阻害活性について紹介する。

4. *Calotropis gigantea* から得られた Wnt シグナル阻害成分⁶

ガガイモ科植物 *Calotropis gigantea* (和名: カイガンタバコ) は常緑低木でアジア、アフリカの熱帯、亜熱帯域に広く分布する。本植物の滲出液メタノール抽出物は、スクリーニング試験において 5 µg/mL の濃度で TOP 活性をほぼゼロに低下させたが、細胞生存率の顕著な低下は認められなかった。他の抽出物に比べより低濃度で TOP 阻害活性を示したことから、強力な活性化合物の存在が期待され、その成分探索を行った。メタノール抽出物を溶媒分配して得られた酢酸エチル可溶部に活性が認められたことから、活性試験を指標として、シリカゲル、ODS カラムによるさらなる分画を進めた。その結果、六種のカルデノライド類 (1–6) を単離し、核磁気共鳴 (NMR) および質量分析 (MS) などのスペクトルデータの解析および文献値との比較によりこれらの化学構造を決定した (図 3)。これらは左側の 3' 位の置換基がそれぞれ異なっていたが、10 位にアルデヒド基をもつ共通する骨格をもつ。

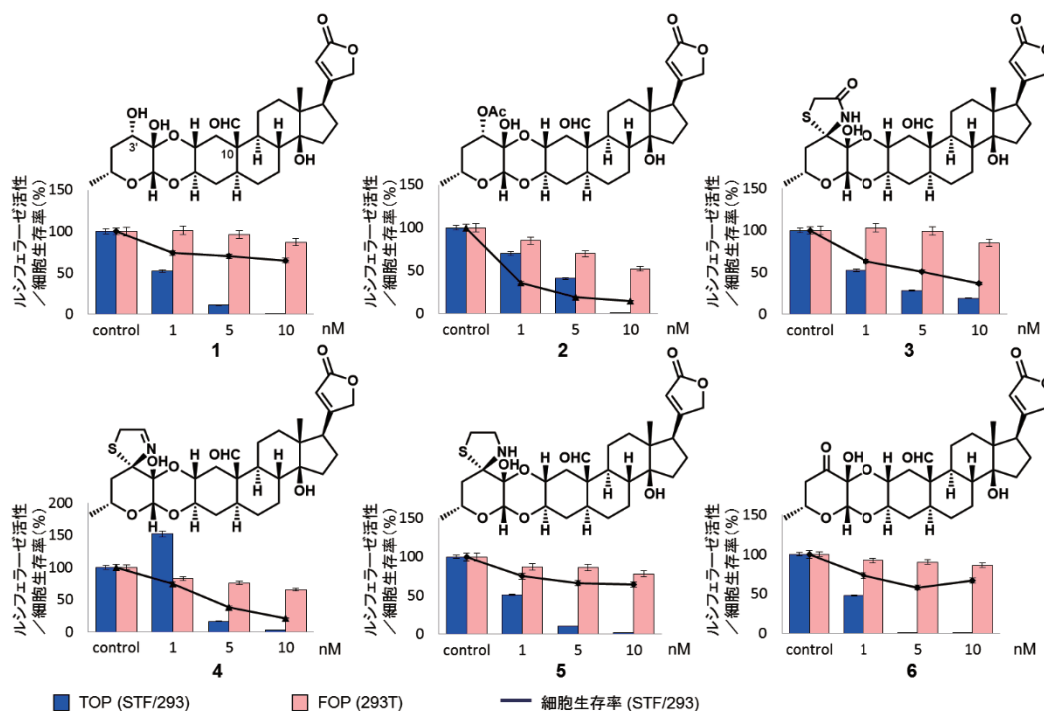


図 3 化合物 1–6 の構造式, TCF/β-catenin 転写阻害作用

これら化合物は nM オーダーで TOP 活性を阻害し、その IC₅₀ 値は 0.7–3.8 nM であったが、FOP 活性を顕著に低下させることはなかった。また、1, 3, 5, 6 は細胞生存率を低下させることなく、TOP 活性を低下させていたことから、TCF/β-catenin 転写阻害活性を有していると判明した (図 3)。一方、2 と 4 については TOP 活性の IC₅₀ 値付近の濃度において試験に用いた STF/293 細胞の細胞生存率の低下が認められたことから、TOP 活性の減少は、TCF/β-catenin 転写阻害に起因するものではなく、細胞数の減少によるもの推定した。

次に細胞増殖が Wnt シグナルに依存している大腸がん細胞に対する 1–6 の影響を調べた。ここでは、APC の欠失変異株である SW480 および DLD1 細胞と、β-catenin に変異をもつ HCT116 細胞を用いた。比較対象として Wnt シグナル非依存性の大腸がん RKO 細胞を用いた。Wnt シグナルを阻害する化合物は Wnt 非依存性細胞には影響することなく、Wnt 依存性細胞に対してその細胞生存率を選択的に低下させると考えられる。

六種の化合物のうち、五種 (1, 3–6) は 1–10 nM の濃度において RKO 細胞の細胞生存率を低下させることなく、Wnt 依存性の SW480, DLD1, HCT116 細胞の細胞生存率を低下させた (IC₅₀ 値: 1.8–7.0 nM)。この結果から、1, 3, 5, 6 による Wnt シグナル依存性細胞の生存率の低下は、Wnt シグナルに起因するものと示唆された。

このうち calotropin (**1**)の Wnt シグナル阻害作用の分子機構の解明を目的として Wnt シグナル関連タンパクへの影響を検討した. はじめに, Wntシグナルの調節に重要な転写活性化因子 β -catenin への影響をウェスタンブロットにより調べた. その結果, SW480 細胞において **1** は濃度依存的に β -catenin を減少させており, 核内および細胞質においても減少が認められた(図 4A). β -catenin は, 前述のように細胞質内において 2 つのキナーゼ CK1 α , GSK3 β によ

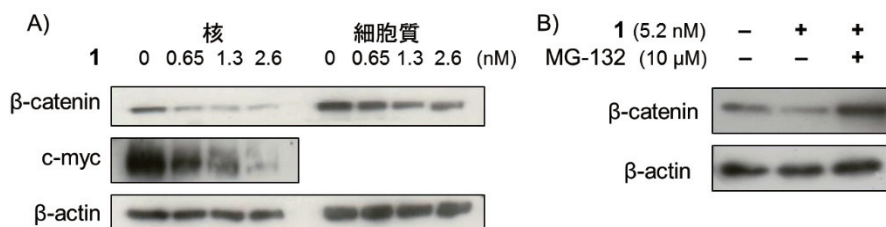


図 4 **1** はプロテアソーム系を介して β -catenin を分解する

A) SW480 細胞において **1** は濃度依存的に β -catenin および c-myc を減少させた

B) **1** の β -catenin 分解はプロテアソーム阻害剤 MG-132 により妨げられた

てリン酸化され, プロテアソーム系により分解される. 一方, 分解されない β -catenin は核内へ移行し, TCF などの分子と複合体を形成後, DNA に結合し, Wnt シグナルの標的遺伝子の転写を亢進する. もし, TCF/ β -catenin 転写阻害活性をもつ化合物が, 核

内 β -catenin のみを減少させた場合, A) β -catenin の核内蓄積の抑制が Wnt シグナル阻害 (TCF/ β -catenin 転写阻害) の作用機序と考えられる. 細胞質および核の両方で β -catenin を減少させない場合は, B) 核内において TCF などの複合体形成の阻害, もしくは標的遺伝子のプロモーター領域における転写調節領域との結合の阻害が主な作用機序と考えられる. しかし calotropin (**1**)は, 核内および細胞質の双方において β -catenin を減少させたことから, A), B) の機構ではなく, C) 細胞質内において β -catenin を減少させ, その結果として核内移行する β -catenin が減少し Wnt シグナル (TCF/ β -catenin 転写) が阻害されるものと考えられた. **1** による Wnt シグナルの阻害は, 本シグナルの標的遺伝子である c-myc タンパクレベルが, **1** の濃度に依存して低下していたことから支持された. 細胞質内で β -catenin が減少する要因として, プロテアソームシステムにおける β -catenin の分解促進が考えられることから, プロテアソーム阻害剤である MG-132 を用いて検討を行った. **1** のみの添加では β -catenin は減少したが, **1** と MG-132 とを併用すると β -catenin の減少は認められなかったことから(図 4B), **1** によりプロテアソーム系における β -catenin 分解が促進されたと考えられた.

APC 等との β -catenin 分解複体内において, プライミングキナーゼ CK1 α により β -catenin の Ser45 残基がリン酸化されると, GSK3 β は β -catenin の Thr41/Ser37/Ser33 残基を順次リン酸化する. Ser37, Ser33 のリン酸化を目印として β -transducin repeat containing protein (β -TrCP) により β -catenin はポリユビキチン化され, プロテアソーム系で分解される².

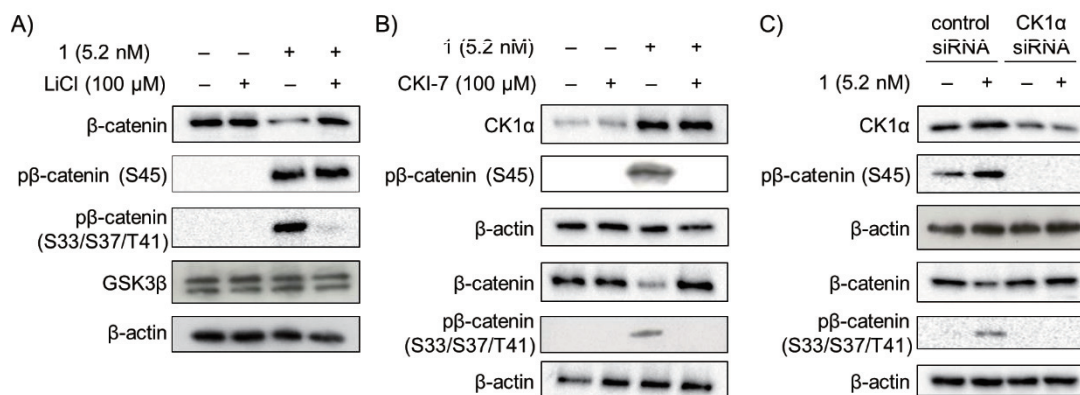


図 5 **1** の SW480 細胞における β -catenin の分解, リン酸化に対する影響

A) LiCl を用いた検討 B) CKI-7 を用いた検討 C) CK1 α siRNA を用いた検討

このことをふまえ、次に **1** の β -catenin リン酸化への影響について解析を行ったところ、**1** は β -catenin の Ser45, Ser33/Ser37/Thr41 のリン酸化を促進し、その結果 β -catenin を減少させた。GSK3 β 阻害剤である LiCl と **1** とを併用すると、 β -catenin の GSK3 β による Ser33/Ser37/Thr41 リン酸化は打ち消されたが、CK1 α による Ser45 リン酸化は増加したままであり、 β -catenin の減少は起こらなかった(図

5A)。また CK1 α 阻害剤である CKI-7 と **1** とを併用すると **1** により促進された CK1 α と GSK3 β によるリン酸化は抑制され、 β -catenin の減少も起こらなかった(図 5B)。siRNA により CK1 α をノックダウンした条件では **1** を添加しても CK1 α と GSK3 β によるリン酸化は認められず、 β -catenin の減少も起こらなかった(図 5C)。さらに **1** は GSK3 β のタンパクレベルは変化させず、CK1 α のタンパクレベルおよび mRNA を増加させることが判明した。以上のことから **1** は CK1 α を転写レベルで増加させることにより β -catenin リン酸化を促進する。これにより β -catenin のプロテアソーム系での分解を促進し、その結果、Wnt シグナルを阻害すると示唆された。

CK1 α に作用する低分子は、駆虫薬として用いられている pyrvinium⁷ やフェニルプロパノイドである honokiol⁸ が報告されている。pyrvinium は CK1 α の酵素活性を活性化し、honokiol は GSK3 β と CK1 α の両方をタンパクレベルで増加させる作用をもつ。本研究で見出した calotropin (**1**) は、pyrvinium や honokiol と異なり GSK3 β には影響を与えることなく CK1 α をタンパクレベルで増加させる作用機構をもつ。このような作用をもつ化合物はこれまでに報告がなく、calotropin (**1**) はユニークな作用機構をもつ化合物と考えられる。

5. *Xylocarpus granatum* から得られた Wnt シグナル阻害成分⁹

センダン科に属するマングローブ *X. granatum* は和名をハウガンヒルギといい、アジア、アフリカ、太平洋地域に広く分布する。スクリーニング試験の結果、強力な TCF/ β -catenin 転写阻害活性(TOP 活性阻害)を示した本植物葉部のメタノール抽出物について活性を指標に溶媒分配ならびに各種カラムクロマトグラフィー(シリカゲル、ODS、セファデックス LH-20 など)により分離精製を進めたところ、ヘキサン可溶部より四種のリモノイド類 (**7**–**10**) を単離した。各種二次元 NMR や MS スペクトルデータに基づく構造解析の結果、化合物 **7**, **8** は新規であり、それぞれ xylogranin A (**7**) および B (**8**) と命名した。**7** はメキシカノライド骨格、**8**, **9** はフラグマリン骨格に分類される。(図 6)

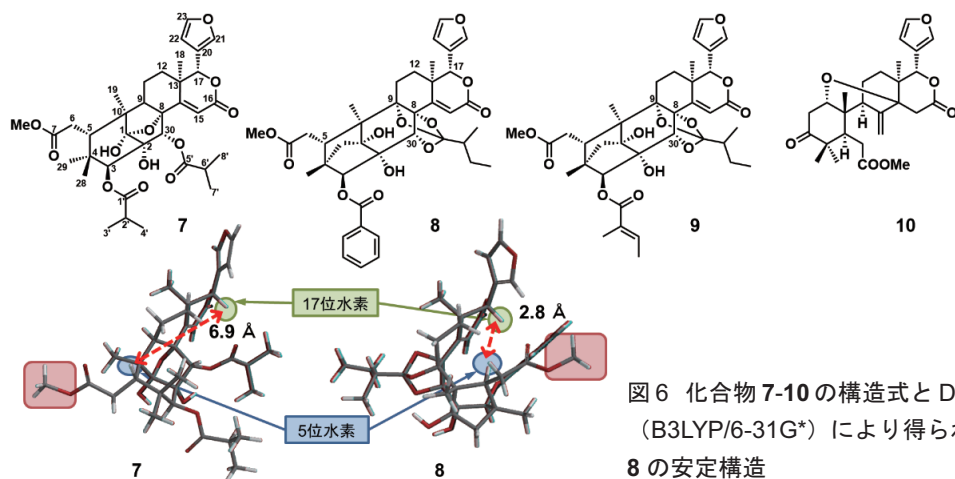


図6 化合物 **7**–**10** の構造式と DFT 計算 (B3LYP/6-31G*) により得られた **7**, **8** の安定構造

化合物 **8**, **9** の TOP 活性の IC₅₀ 値はそれぞれ 48.9, 54.2 nM であった。一方化合物 **7** は阻害活性を示さなかった。化学構造に着目すると、化合物 **8**, **9** は 8,9,30 位にオルトエステル基をもつが、**7** にはない。NOESY の解析の結果、**8** においては 5 位と 17 位間に NOE 相関が観測され、両者は空間的に近い位置関係にあることが示唆された。さらに、

DFT 計算より安定構造を検討したところ、化合物 **8** はかご状の形状をしており、H-5/H-17 間の距離は 2.8 Å と比較的近い距離にあると判明し、7 位のメキシ基は 17 位と同じ側、すなわち concave 側に存在することが示唆された。一方、**7** においては H-5/H-17 間の距離が 6.9 Å であること、および 7 位のメキシ基が 17 位とは逆側 (convex 側) に存在することが示唆され (図 6)、これらの構造的な違いが **7**, **8** の活性の違いに寄与していると推定した。

化合物 **8**, **9** について大腸がん細胞 (SW480, HCT116, DLD1) に対する細胞毒性を検討したところ、これらの化合物は比較対象としてあわせて評価したヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に比べ、Wnt 依存性の SW480 と HCT116 細胞に対してより強い細胞毒性を示した。

次に、化合物 **8** の作用を明らかにする目的で、SW480 細胞を用い以下の解析を行った。β-catenin のタンパクレベルを検討したところ、細胞質では顕著な変化は示さなかったが、核内においては濃度依存的に減少した (図 7A)。また、免疫染色法により β-catenin の局在を観察したところ、対照群では核内に認められた β-catenin が、**8** の添加により核から減少する傾向が認められた。以上のことから **8** は、核の β-catenin の蓄積を抑制する作用をもつと考えられた。さらに Wnt シグナルの標的遺伝子である c-myc および PPARδ に対する影響を検討したところ、**8** は 200 nM において細胞全体および核の c-myc, PPARδ をタンパクレベルで減少させた (図 7B)。また、**8** は低濃度 (50-100 nM) においては c-myc の mRNA を増加させるものの、200 nM においては、c-myc, PPARδ の mRNA を減少させた。以上のことから **8** は Wnt シグナルの転写活性化因子である β-catenin の核内での蓄積を阻害することにより Wnt シグナルの標的遺伝子の転写を抑制し、Wnt シグナルを阻害することが示唆された。

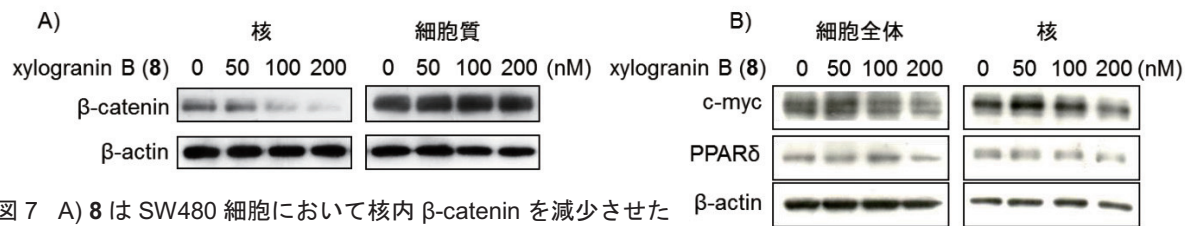


図 7 A) **8** は SW480 細胞において核内 β-catenin を減少させた
B) **8** の Wnt シグナル標的タンパクへの影響

リモノイド化合物は細胞毒性をはじめ、昆虫における摂食阻害作用など様々な生物活性をもつことが報告されているが¹⁰, Wnt シグナルの阻害作用に関する報告は今回が初めてであった。

8, **9** のようなオルトエステル基をもつフラグマリ型リモノイドは *X. granatum* およびその近縁種より数種報告されており^{10,11}, その活性構造相関に興味を持たれる。

6. *Eurycoma longifolia* から得られた Wnt シグナル阻害成分¹²

E. longifolia は、東南アジアに広く分布するニガキ科の灌木で、マレーシアではトンカットアリ (Tongkat Ali) と呼ばれ、強壮や解熱などを目的に民間薬として用いられている。スクリーニングにおいてヒットした本植物の根部メタノール抽出物について、活性を指標として分画

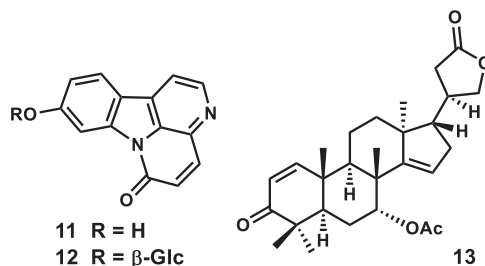


図 8 化合物 **11-13** の構造式

を進めたところ、β カルボリン型アルカロイドである 9-hydroxycanthin-6-one (**11**)、およびその配糖体である canthin-6-one 9-O-β-glucopyranoside (**12**)、リモノイドである 20,21,22,23-tetrahydro-23-oxoazadirone (**13**)を活性化化合物として単離した (図 8)。**11-13** はそれぞれ 6.8, 11.6, 3.0 μM で TCF/β-catenin 阻害活性を示した。また、これら化合物の各種細胞に対する細胞毒性を評価したところ、Wnt 依存性の大腸がん細胞に対して強い細胞毒性を示した。とくに **11** および **13** は他の Wnt 依存性大腸がん細胞に比べて SW480 細胞に対してより強い毒性を示した。

このうち **11** について、作用機序の解析を進めた。β-catenin 量への影響を検討したところ、本化合物は細胞質、核、両方において β-catenin 量を減少させた。次にリン酸化への影響を検討したところ、**11** は GSK3β によるリン酸化 (p-β-catenin (S33/S37/T41)) を増加させた。しかし CK1α によるリン酸化 (p-β-catenin (S45)) は変化しておらず、さらに GSK3β, CK1α 自体のタンパク量も変化していなかった。この結果から、**11** は、GSK3β の酵素活性を増加させることが推定された (図 9A)。この仮説は以下に示す GSK3β の siRNA によるノックダウン実験から支持された。**11** は control siRNA の存在下では β-catenin を減少させたが、GSK3β siRNA 存在下では **11** により誘導された β-catenin の減少は打ち消された。Ser 9 残基がリン酸化され不活性化された GSK3β (p-GSK3β (S9)) レベルについて調べたところ、**11** は control siRNA の存在下では減少していた。この条件では GSK3β のタンパクレベルは変化していなかったことから、**11** は GSK3β を活性化し、β-catenin のリン酸化を促進することで β-catenin の分解を促進するものと示唆された (図 9B)。前述のように β-catenin の分解には GSK3β による Ser33, Ser37, Thr41 残基のリン酸化に先立ち、プライミングキナーゼ CK1α による Ser45 残基のリン酸化が必要であると考えられている。すなわち β-catenin の分解は CK1α に依存した機構であると考えられている。しかし、**11** は p-β-catenin (S45) を増加させることなく、p-β-catenin (S33/S37/T41) を増加させていた。したがって、CK1α に依存しない β-catenin の分解機構の存在が考えられた。そこで、CK1α の siRNA を用いたノックダウン実験を行った。その結果、control siRNA 存在下に認められた **11** による p-β-catenin (S33/S37/T41) の増加と、β-catenin の減少は、CK1α siRNA 存在下においても同様に認められた (図 9C)。以上のことから **11** による β-catenin の分解促進には CK1α が関与せず、GSK3β の活性化を介して Wnt シグナルを阻害していることが示唆された。このような作用をもつ化合物は現在のところ報告されておらず、また、CK1α 非依存的に β-catenin を分解する機構についても報告がないことから、本化合物の作用は興味深いものと考えられる。

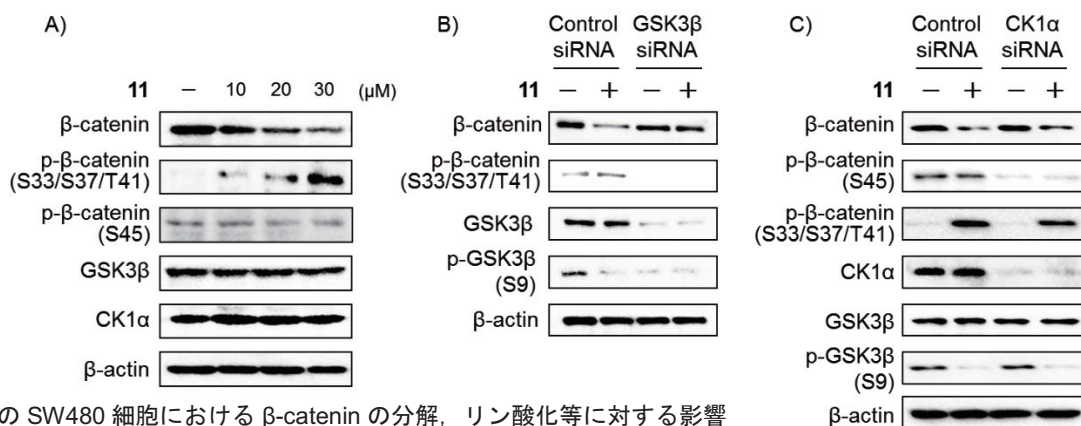


図 9 **11** の SW480 細胞における β-catenin の分解、リン酸化等に対する影響

A) リン酸化に対する検討 B) GSK3β を用いた検討 C) CK1α siRNA を用いた検討

次に本化合物の作用についてゼブラフィッシュを用いた *in vivo* 実験において検討したところ、本化合物の投与により、中脳後脳境界 (MHB: mid-hindbrain boundary) の形成不全、色素細胞の顕著な減少や、尾部の屈曲などの Wnt シグナル阻害と関連する表現型 (フェノタイプ) の変化が認められた。さらにゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルの標的遺伝子である *zic2a* および *mitf* に対する影響を *in situ* hybridization を用いて調べたところ、これら標的遺伝子の発現の低下が確認できた。*zic2a* (zinc finger protein of the cerebellum 2a) は中脳の発達に関与しており、中脳視蓋などで発現が認められる。また、*mitf* (microphthalmia-associated transcription factor) は神経堤細胞に発現が認められ、神経堤細胞から色素細胞への分化誘導を制御することが知られている。これら標的遺伝子の低下が前述のフェノタイプの変化へ寄与していることが示唆された。前述した通り、**11** は *in vitro* 実験において GSK3β の活性化を介して Wnt シグナルを阻害していることが示唆された。そこでゼブラフィッシュにおける **11** の Wnt 阻害作用が GSK3β に関与して

いるかを検討する目的で、GSK3 β 阻害剤である BIO (6-bromo-indirubin-3'-oxime)を用い検討を行った。Wnt シグナルの活性化により認められるゼブラフィッシュのフェノタイプの変化として目の形成不全が知られている。BIO 単独処理では GSK3 β が阻害されることにより Wnt シグナルが活性化されるため、目

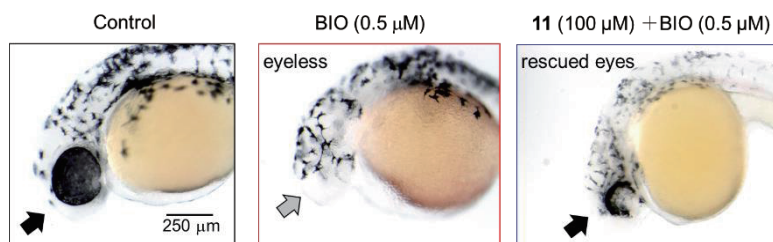


図 10 ゼブラフィッシュにおける BIO 誘発眼形成不全に対する 11 の影響

の形成不全が確認できる。しかし、BIO と 11 とを併用すると、目の形成が回復したフェノタイプが確認でき、*in vivo* においても本化合物は GSK3 β を介して Wnt シグナルを阻害していることが示唆された(図 10)。これらの結果を総合すると、本化合物は *in vivo*, *in vitro* 双方において GSK3 β の活性化を介して Wnt シグナルを阻害していると考えられた。

7. *Azadirachta excelsa* から得られた Wnt シグナル阻害作用をもつ化合物¹³

A. excelsa (センダン科)の果実メタノール抽出物は、10 $\mu\text{g/mL}$ において TOP 活性を約 80%阻害した。TOP 活性を指標として、溶媒分配、シリカゲルカラム、逆相 HPLC などにより本抽出物の分画を進めた。その結果、活性成分として新規化合物 14

を含む八種の化合物 (14–21) を得た(図 11)。核磁気共鳴(NMR), 質量分析(MS)などの各種スペクトルデータの解析に基づき、これら化合物の構造決定、同定を行った。

これら化合物の TOP 阻害作用は、7,14-oxetane, 15-ヒドロキシ体である 14 (IC_{50} = 33.7 μM), 15 (20 μM)および、15-

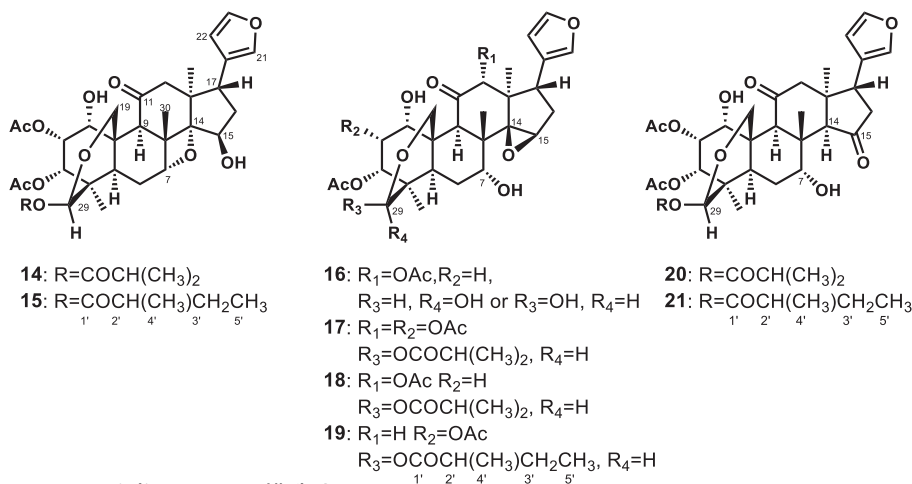


図 11 化合物 14–21 の構造式

ケット, 7-ヒドロキシ体である 20 (14.8 μM), 21 (36.7 μM)では中程度であったが、14,15-epoxy, 7-ヒドロキシ体である 16–19 では nM オーダーと強力であった (16; 127 nM, 17; 300 nM, 18; 252 nM, 19; 121 nM)。

このうち、17 について細胞増殖が Wnt シグナル依存性であるがん細胞に対する細胞毒性を検討したところ、AGS(ヒト胃がん), HCT116(ヒト大腸がん)細胞に対する IC_{50} 値はそれぞれ 239 nM, 161 nM であった。一方 Wnt シグナル依存性であるヒト大腸がん SW480 および DLD1, および Wnt 非依存性であるヒト大腸がん RKO

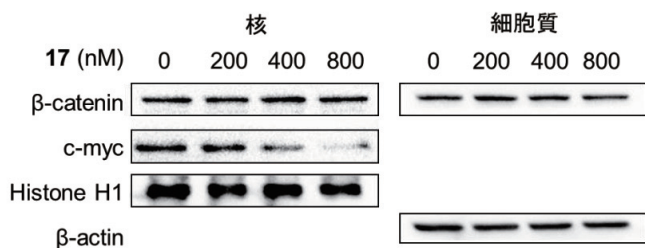


図 12 17 の β -catenin, c-myc に対する影響 (HCT116 細胞)

細胞に対する IC_{50} 値は 400 nM 以上であった。ウェスタンブロットによりさらなる解析を進めた結果、17 は Wnt シグナルの転写活性化因子 β -catenin の細胞質および核でのタンパクレベルを減少させることなく、Wnt シグナルの標的タンパクである c-myc の核内レベルを減少させることで、Wnt シグナルを阻害すると示唆された(図 12)。

8. *Ricinus communis* から得られた Wnt シグナル活性化作用をもつ化合物¹⁴

本スクリーニング研究では、Wnt 阻害を示す化合物だけではなく、活性化する化合物も見出した。*R. communis* (トウダイグサ科) の茎部メタノール抽出物は、10 $\mu\text{g/mL}$ において約 80% TOP 活性を上昇させる作用を示した。TOP 活性を指標として分画を進めた結果、活性成分として ricinin (22), 7-oxo- β -sitosterol (23) を含む四種の成分を分離した(図 13)。22 および 23 はアッセイ細胞の細胞生存率を顕著に増加させることなく TOP 活性を上昇させた。また、これら化合物は FOP 活性を変化させなかったことから TCF/ β -catenin 転写活性化作用をもつことが示唆された。

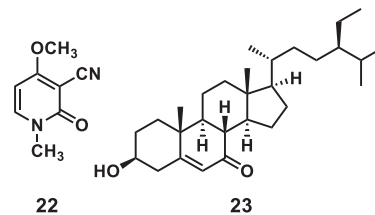


図 13 化合物 22, 23 の構造式

このうち 22 の作用についてさらに検討を進めた結果、22 は STF/293 細胞において細胞全体、細胞質、核において β -catenin のタンパク量を増加させた。次に β -catenin のリン酸化レベルを調べた結果、CK1 α および GSK3 β による β -catenin のリン酸化は顕著に減少していたものの、これらキナーゼのタンパクレベル

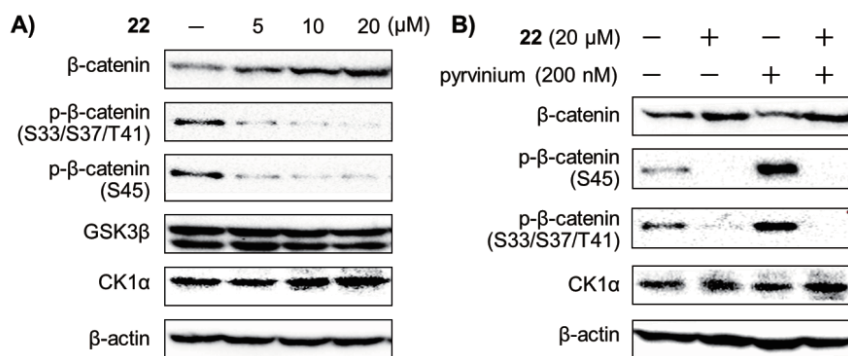


図 14 22 の STF/293 細胞における β -catenin の分解、リン酸化等に対する影響
A) リン酸化に対する検討 B) pyrvinium を用いた検討

の変化は認められなかった(図 14A)。この結果から 22 が CK1 α の酵素活性を阻害している可能性が考えられたため、CK1 α の活性化作用をもつ pyrvinium を用い検討した。その結果、22 と pyrvinium との併用により、pyrvinium 単独処理により引き起こされた β -catenin の減少と CK1 α による β -catenin のリン酸化の増加が打ち消されたことから(図 14B)、22 は CK1 α の酵素活性を阻害していることが示唆された。さらにゼブラフィッシュ胚を用いた *in vivo* での作用を検討したところ、22 は β -catenin を増加させることが判明した。

9. おわりに

以上、我々の研究で見出した Wnt シグナルに作用する生物活性天然物とそれらの活性発現機構について紹介した。得られた一部の活性天然物についてはその作用機序の一端を明らかにすることができた。その作用機序を β -catenin に対する影響に焦点を当ててまとめると以下ようになる。

1) β -catenin の分解に作用する: 1 は CK1 α を転写レベルで増加させ、 β -catenin のリン酸化、分解を促進し、Wnt シグナルを阻害する。11 は GSK3 β の活性化により β -catenin のリン酸化、分解を促進し、Wnt シグナルを阻害する。22 は CK1 α の酵素活性を阻害することにより、 β -catenin のリン酸化、分解を抑制し、Wnt シグナルを活性化する。

2) β -catenin の核内蓄積に作用する: 8 は β -catenin の核内蓄積を抑制する。

3) β -catenin のタンパクレベルには影響しない: 17 は β -catenin レベルを変化させなかったが、Wnt シグナルの標的遺伝子の発現を低下させると示唆された。

このように、本研究では β -catenin に対して様々な作用点で影響し Wnt シグナルに作用する生物活性天然物を見出した。Wnt シグナルに対して作用する医薬品はいまだ上市されたものではなく、現在いくつかの薬物の臨床試験が行われている。また、Wnt シグナル経路の制御機構はいまだ不明な部分も多いとされている。Wnt シグナルに作用す

る低分子化合物の探索は精力的に行われているもののその多くが合成化合物を対象としたものであり、天然物を対象とした Wnt シグナルに作用する天然物の探索例は多くない。今回紹介した化合物やその関連化合物を活用して Wnt シグナルの未解明な部分を明らかにすることにより、生命科学研究や医薬品開発へ貢献したい。

謝辞:本研究は千葉大学大学院薬学研究院 活性構造化学研究室である。ご指導いただきました石橋正己教授、荒井緑准教授に深く感謝申し上げますとともに、研究室メンバーの努力に深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、植物採取にご協力くださいましたクルナ大学(バングラデシュ) Samir K. Sadhu 教授、ダッカ大学(バングラデシュ) Firoj Ahmed 教授、テムコ・コーポレーション小谷野喬博士、コンケン大学(タイ) Thaworn Kowithayakorn 教授、STF/293 細胞をご恵与くださいましたジョンホプキンス大学 Jeremy Nathans 教授、SuperFOP-Flash プラスミドをご恵与くださいましたワシントン大学 Randall Moon 教授に心から感謝申し上げます。ゼブラフィッシュの実験に際しまして多大なご指導、ご支援をいただきました千葉大学大学院薬学研究院 生化学研究室の伊藤素行教授、溝口貴正博士に深謝いたします。本研究遂行に当たりご支援を賜りました日本学術振興会科学研究費、コスメトロジー研究振興財団、濱口生化学振興財団、武田科学振興財団に感謝いたします。

参考文献

1. Ueda, M., Chemical biology of natural products on the basis of identification of target proteins. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 658-666.
2. Anastas, J. N.; Moon, R. T., WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 11-26.
3. 菊池 章, Wnt シグナルネットワークとその異常による病態. *生化学* **2009**, *81*, 780-792.
4. Clevers, H.; Nusse, R., Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **2012**, *149*, 1192-1205.
5. Li, X.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M., New Wnt/ β -catenin signaling inhibitors isolated from *Eleutherine palmifolia*. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 540-547.
6. Park, H. Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M., Calotropin: A Cardenolide from *Calotropis gigantea* that Inhibits Wnt Signaling by Increasing Casein Kinase 1 α in Colon Cancer Cells. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 872-878.
7. Thorne, C. A.; Hanson, A. J.; Schneider, J.; Tahinci, E.; Orton, D.; Cselenyi, C. S.; Jernigan, K. K.; Meyers, K. C.; Hang, B. I.; Waterson, A. G.; Kim, K.; Melancon, B.; Ghidu, V. P.; Sulikowski, G. A.; LaFleur, B.; Salic, A.; Lee, L. A.; Miller, D. M.; Lee, E., Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 α . *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 829-836.
8. Singh, T.; Katiyar, S. K., Honokiol inhibits non-small cell lung cancer cell migration by targeting PGE2-mediated activation of β -catenin signaling. *PLoS One* **2013**, *8*, e60749.
9. Toume, K.; Kamiya, K.; Arai, M. A.; Mori, N.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M., Xylogranin B: A Potent Wnt Signal Inhibitory Limonoid from *Xylocarpus granatum*. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6106-6109.
10. Tan, Q.-G.; Luo, X.-D., Meliaceae Limonoids: Chemistry and Biological Activities. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7437-7522.
11. Liao, S.-G.; Chen, H.-D.; Yue, J.-M., Plant Orthoesters. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1092-1140.
12. Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M., 9-Hydroxycanthin-6-one, a β -Carboline Alkaloid from *Eurycoma longifolia*, Is the First Wnt Signal Inhibitor through Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β without Depending on Casein Kinase 1 α . *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1139-1146.
13. Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M., Limonoids with Wnt signal inhibitory activity isolated from the fruits of *Azadirachta excelsa*. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 280-285.
14. Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M., Ricinine: A pyridone alkaloid from *Ricinus communis* that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1 α . *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4597-4601.