

氏 名 しんざわ けんた
新澤 健太

学 位 の 種 類 博士 (薬学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 369 号

学位授与年月日 令和 3 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
薬学専攻

学位論文題目 Ginnalin B およびアゾベンゼン誘導体の生物活性に関する研究
(Studies on biological activities of ginnalin B and azobenzene derivatives)

論文審査委員

(主査) 教 授 松谷 裕二

(副査) 教 授 森田 洋行

(副査) 教 授 加藤 敦 (指導教員)

論文要旨

Ginnalin B およびアゾベンゼン誘導体の生物活性に関する研究

臨床薬剤学研究室（附属病院薬剤部）

博士課程・薬学専攻 新澤 健太

本研究では、6-*O*-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (Ginnalin B)がヒト表皮に対して示す生物活性と、アゾベンゼン誘導体が栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対して示す生物活性について、それぞれの応用性を視野に入れて検討を行った。以下にその要旨を示す。

1. ヒト表皮細胞およびヒト三次元皮膚モデルを用いた ginnalin B の生物活性評価^[1]

皮膚は生体と外界とを隔てることで外界からの刺激に対してバリアとして働き、生体の維持において重要な役割を担う臓器である。皮膚の中でも直接外界と接する表皮は、生体の維持に加えて美容面においても、その機能維持が求められる。表皮の機能維持においては、角質層における脂質の約 50 %を占めるセラミドが特に大きな役割を果たしているが、角質層のセラミド量は加齢に伴って減少することが報告されており、表皮の機能維持に支障をきたす。また、皮膚セラミド量の減少はアトピー性皮膚炎や乾皮症など疾患の原因となることも報告されており、セラミド量の維持は、生体機能の維持、美容的問題点の改善、さらには皮膚疾患の予防など幅広く重要である。こうした点を踏まえ、多くの弊害をもたらすセラミド量の減少に対して、皮膚におけるセラミドの分解抑制および合成促進をもたらす化合物の探索を先行研究として実施した。当研究室が保有する 237 種類の植物エキスをを用いて、セラミド分解酵素に対する阻害活性を評価した結果、カエデ科植物エキスに良好な阻害活性が見出された。また、カエデ科植物に含まれる化合物であるカエデタンニン類の中でも ginnalin B (Figure 1) はセラミド分解酵素の阻害に加えて、セラミド合成酵素の発現促進活性を併せ持つことが明らかとなった。

これらの検討において、ginnalin B がセラミド関連酵素に与える作用の他に、分化に対しても作用を示すことが形態学的検討から示唆された。そこで本研究では、ヒト表皮細胞株およびヒト三次元皮膚モデルを用いて、分化および増殖に関連する遺伝子群やタンパク質群の発現、増殖や細胞周期などの細胞機能についてそれぞれ検討を行い、ginnalin B が有する生物活性を明らかにした。以下にその詳細を示す。

1) 分化マーカーである *keratin 10*, *keratin 1*, および *filaggrin* 発現に対する作用の評価

ヒト表皮細胞株 PHK 16-0b を用いて、表皮における分化マーカーである *keratin 10* と *keratin 1*, そして *filaggrin* の各遺伝子発現に対して ginnalin B が与える影響を RT-qPCR を用いて評価した。それぞれの遺伝子について、ginnalin B で処置した細胞群では濃度依存的に発現の上昇が認められた。また、100 μ M の ginnalin B 処置においては、対照群と比較して *keratin 10* は 1.7 倍、*keratin 1* は 2.9 倍、そして *filaggrin* は 5.2 倍と、それぞれ発現が上昇することが明らかとなった。

2) 三次元モデルを用いた *keratin 10* および *filaggrin* 発現に対する作用の評価

培養細胞を用いた単層での評価に加えて、より組織に近い生理的環境を構築可能なヒト三次元皮膚モデル (EpiDerm Skin Model) を用いて、*keratin 10* および *filaggrin* タンパク質発現量を免疫組織化学的に評価した。三次元モデルを 100 μ M の ginnalin B で 7 日間処置したところ、切片におけるそれぞれのタンパク質の発現面積は対照群と比較して *keratin 10* は 1.7 倍、*filaggrin* は 2.8 倍に増加する結果を得た。

3) Ginnalin B が細胞の増殖、生存、細胞周期に与える作用

ヒト表皮細胞の増殖停止について MTT アッセイを用いて評価した。その結果、100 μ M の ginnalin B 処置によって、処置開始後 48 時間程度での増殖の抑制効果が認められた。さらに、

LDH アッセイおよび Hoechst33342 を用いた細胞核の形態学的評価によって細胞毒性の有無について検討を行ったところ、ginnalin B による細胞毒性は認められなかったため、増殖停止は分化に伴って生じている可能性が示唆された。また、propidium iodide 染色による細胞周期の評価により、100 μ M の ginnalin B で処置した細胞は G₀/G₁ 期の細胞数が増加していることが明らかとなった ($66.0 \pm 1.5 \%$, $p < 0.01$ vs control cells)。

4) p21, cyclin D1, cyclin E, NOTCH 1 の発現に対して与える作用の評価

これまでの検討でヒト表皮細胞およびヒト皮膚三次元モデルにおいて、ginnalin B は分化の促進と増殖の抑制という生物活性を有することが明らかとなった。これらのメカニズムを検討するため、G₀/G₁ 期の細胞周期停止に関連する p21, cyclin D1, cyclin E の各因子について ginnalin B 処置が与える影響を評価したところ、100 μ M の ginnalin B 処置によって、p21 発現量の増加(RT-qPCR 法)と、cyclin D1 および cyclin E 発現量の減少(gel-free Simple Western™ system) が認められた。さらに、シグナル経路における上流の因子であり、分化マーカーの発現促進作用も報告されている NOTCH1 に与える影響を検討したところ、100 μ M の ginnalin B 処置によって遺伝子発現量およびタンパク発現量の両者とも増加していることが明らかとなった。

5) まとめ

本研究では、ginnalin B がヒト表皮細胞の分化促進およびそれに伴う増殖抑制の各生物活性を有していることを、遺伝子およびタンパク発現の検討、ヒト表皮細胞を用いた検討、そしてヒト皮膚三次元モデルを用いた検討によって明らかにした。さらに、細胞周期の停止に関連した因子を検討することで、NOTCH1 を介した機序によって分化および増殖の制御を行っていることが示唆された (Figure 2)。これらの結果により示された ginnalin B のヒト表皮に対する生物活性は、表皮の恒常性および機能の維持に寄与するものであり、化粧品などへの応用が期待される。

2. 栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対するアゾベンゼン誘導体の生物活性評価^[2]

膵臓がんは 5 年生存率が 10 %程度であり、悪性腫瘍の中でも極めて悪性度が高いことが知られている。臨床におけるがん薬物療法では、様々な部位に発生するがんに対して抗悪性腫瘍薬がその効果を発揮し、生命予後の改善が見られているが、その一方で膵臓がんに対しては効果が十分に発揮されておらず、治療成績は不良である。このような背景から、膵臓がんに対する新規治療薬の開発が強く望まれている。

膵臓がんに対する薬物治療が特に困難である要因のひとつとして、血流が乏しく、グルコースやアミノ酸などの栄養が欠乏しているような「栄養飢餓状態」において膵臓がん細胞が生存する、という特徴が挙げられる。これまでの研究で、臨床で用いられている 5-フルオロウラシル (5-FU) やゲムシタビンなどの抗悪性腫瘍薬は、栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対して作用を発揮できないことが示されている。栄養飢餓状態における抗がん活性を有する化合物は天然物を中心に複数の報告があり、臨床試験へと進んだ化合物もあるが、今日まで承認に至っておらず、更なる候補化合物の探索が必要である。

このような現状を踏まえ、栄養飢餓条件下で抗がん活性を示す化合物を広く探索することを目的として、当研究室が保有する複数の合成化合物を用いた予備検討を実施したところ、アゾベンゼン誘導体に栄養飢餓条件下における抗がん活性を見出した。そこで、本研究ではアゾベンゼン誘導体に着目し、14 種類のアゾベンゼン誘導体 (1-14, Figure 3) について栄養飢餓条件下での抗がん活性、富栄養条件下との選択性、そして栄養飢餓条件および富栄養条件において細胞周期に与える影響に関して検討を行った。そのなかで、栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を示す化合物 3,3'-di(2-hydroxynaphthyl)-6,6'-dimethylazobenzene (9) を見出すこ

とに成功した。詳細について以下に示す。

1) 栄養飢餓条件下における抗がん活性の評価

本研究ではグルコース、アミノ酸、そして血清を全て含まない栄養飢餓培地を用いることで、栄養飢餓条件を構築した。栄養飢餓培地およびヒト膵臓がん由来細胞株である PANC-1 を用いた MTT アッセイによって、栄養飢餓条件下における抗がん活性を評価した。既存の抗悪性腫瘍薬である 5-フルオロウラシルとゲムシタビンは、栄養飢餓条件下では 200 μ M においても抗がん活性を示さなかった。これとは対照的に、14 種類のアゾベンゼン誘導体のうち 5 つの化合物 (**9**, **11**, **12**, **13**, **14**) が栄養飢餓条件下において抗がん活性を示すことを見出した (IC_{50} = 1.5–9.6 μ M)。

2) 富栄養条件下における細胞毒性の評価

がん化学療法において、治療効果の最大化と同時に、患者の QOL の維持や治療の継続などの観点から副作用の最小化についても重要である。栄養飢餓条件下で抗がん活性を発揮した 5 つの化合物について、通常培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM) を用いた MTT アッセイにより、富栄養条件下における細胞毒性を評価した。化合物 **11–14** は富栄養条件下において細胞毒性 (IC_{50} = 1.5–9.6 μ M) を示したが、化合物 **9** は 80 μ M においても細胞毒性を示さないことが明らかとなった。

3) 栄養飢餓条件および富栄養条件下における化合物 **9** が細胞周期に与える作用の評価

化合物 **9** の作用を詳細に検討するため、栄養飢餓条件および富栄養条件下において化合物 **9** が細胞周期に与える影響を、propidium iodide 染色およびフローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、化合物 **9** は栄養飢餓条件下において G₀/G₁ 期の細胞を有意に増加させることが明らかとなった (47.5 ± 1.0 %, $p < 0.01$ vs control cells)。対照的に、富栄養条件下では細胞周期に対して影響を与えなかった。

4) まとめ

本研究により、既存の抗悪性腫瘍薬が効果を発揮しない栄養飢餓条件下において抗がん活性を示す 5 つのアゾベンゼン誘導体を見出すことに成功した。アゾベンゼン誘導体の抗膵臓がん活性はこれまで十分に検討されていないことから、新たな知見を与えるものであると考えられる。また、抗がん活性を示した 5 つの化合物のなかでも、化合物 **9** は富栄養条件下における細胞毒性が認められず、栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を有していることから副作用の回避における有用性についても示唆された。さらに、細胞周期の解析から、化合物 **9** は栄養飢餓条件選択的に細胞周期を G₀/G₁ 期に停止させることによって抗がん活性を示す可能性が示唆された。以上の結果より、化合物 **9** は栄養飢餓条件選択的な抗がん活性と富栄養条件下における安全性を兼ね備えていることが示され、膵臓がんに対する新規抗悪性腫瘍薬としての応用が期待される (Figure 4)。

今回の研究における生物活性の評価によって得られた結果は、表皮に関連した化粧品開発および膵臓がんに関連した医薬品開発に対して有益な知見を与えるものであると考えられる。

参考文献

- [1] A. Kato, J. Koyama, **K. Shinzawa**, S. Imaeda, I. Adachi, R.J. Nash, G.W.J. Fleet, M. Shintani, C. Takeuchi, F. Ishikawa, Ginnalin B induces differentiation markers and modulates the proliferation/differentiation balance via the upregulation of NOTCH1 in human epidermal keratinocytes, *Bioorg. Med. Chem.* 27, 2172–2180, (2019)
- [2] **K. Shinzawa**, D. Kageta, R.J. Nash, G.W.J. Fleet, T. Imahori, A. Kato, Azobenzene derivatives show anti-cancer activity against pancreatic cancer cells only under nutrient starvation conditions via G₀/G₁ cell cycle arrest, *Tetrahedron*, in press, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132077>

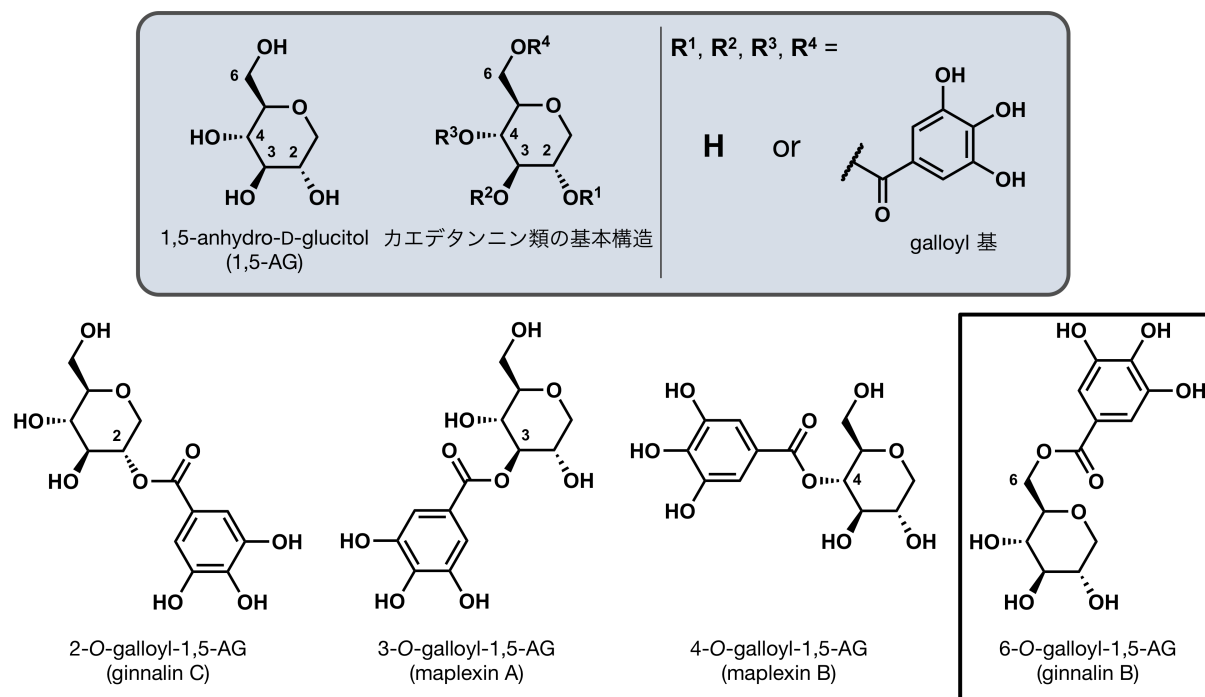


Figure 1. Ginnalin B および関連する構造を有する化合物

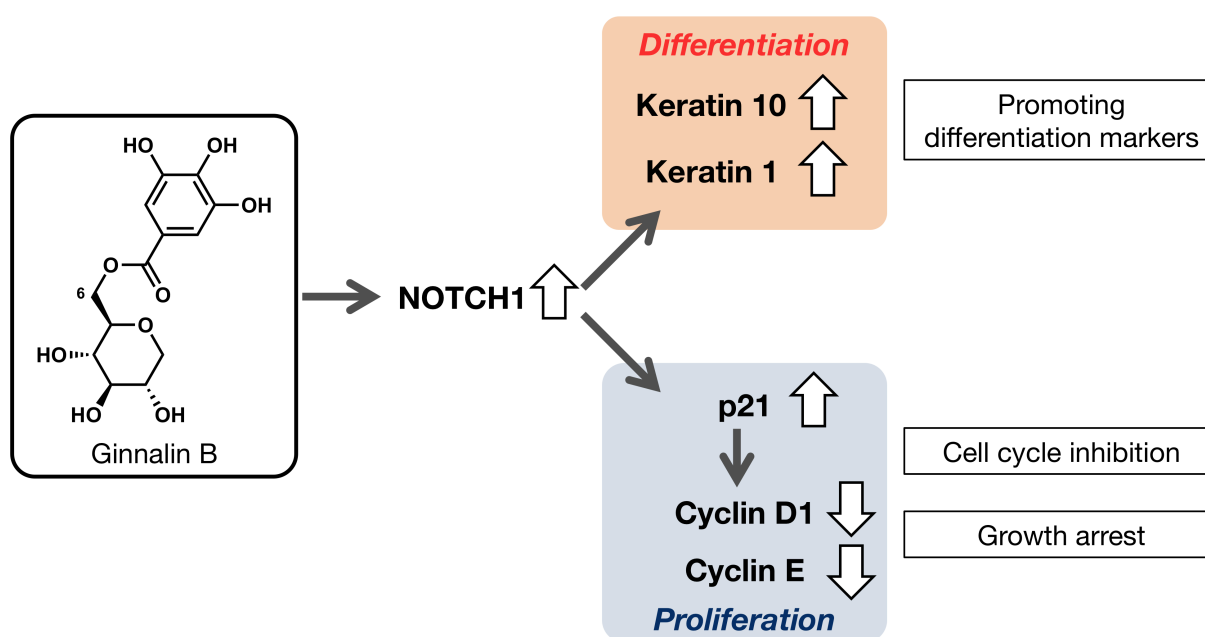


Figure 2. Ginnalin B の推定される作用メカニズム

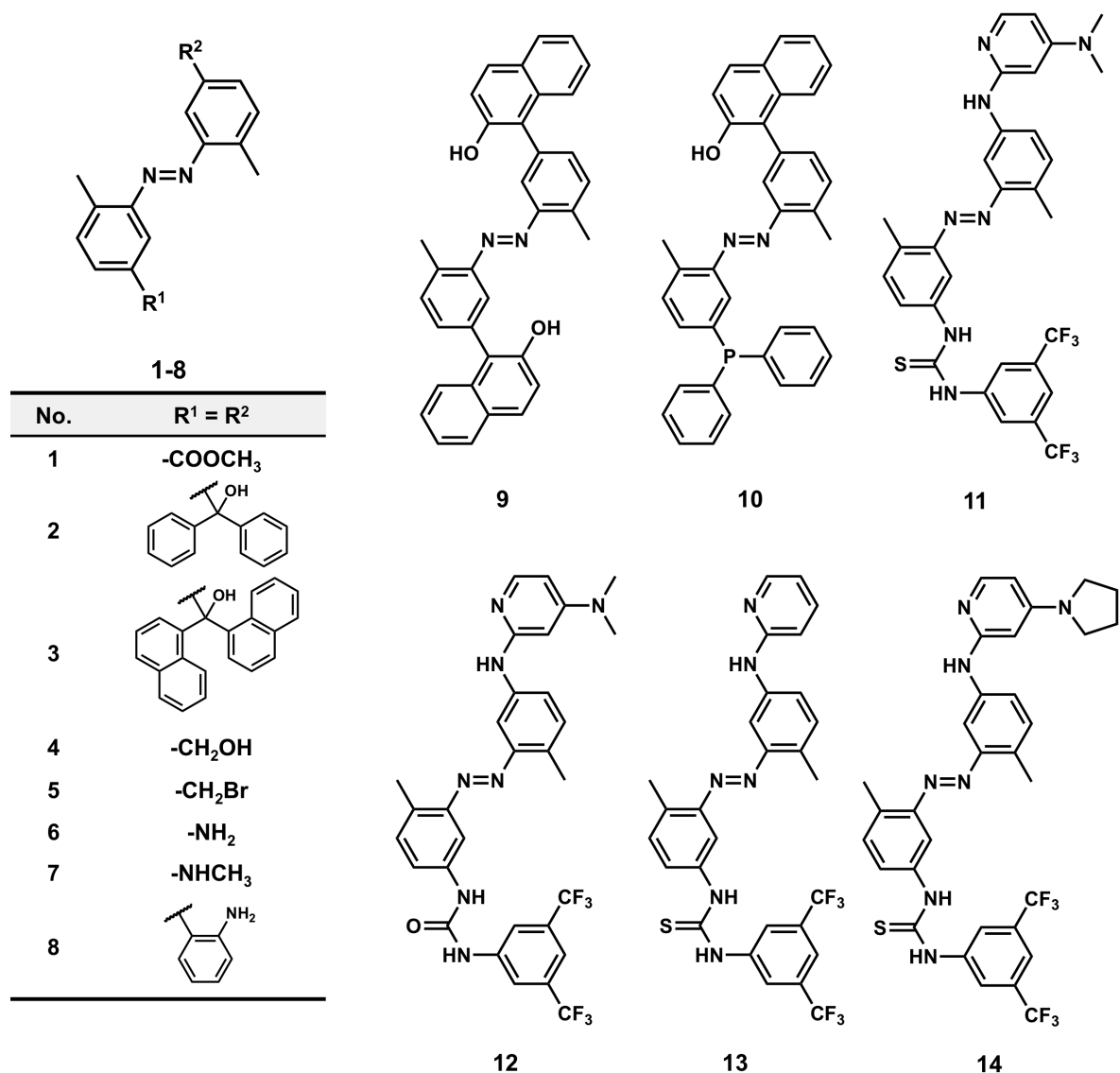


Figure 3. 活性評価を行った 14 種類のアゾベンゼン誘導体の構造 (1-14)

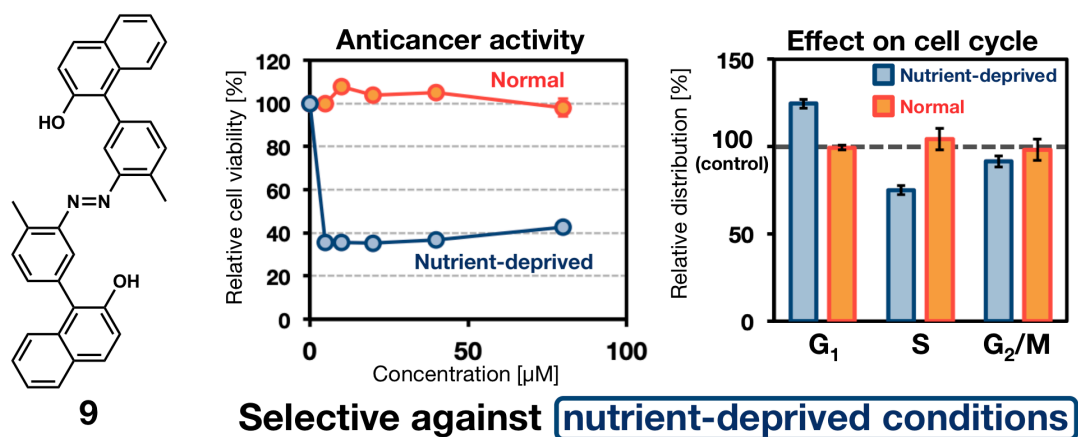





Figure 4. 化合物 9 は栄養飢餓条件選択的な作用を示す

学位論文審査の要旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	新澤 健太
審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教 授	松 谷 裕 二	
	(副査) 教 授	森 田 洋 行	
	(副査) 教 授	加 藤 敦	
(論文題目) Ginnalin B およびアゾベンゼン誘導体の生物活性に関する研究 (Studies on biological activities of ginnalin B and azobenzene derivatives)			(判定) 合格
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>医薬品や化粧品などへの応用を指向した小分子化合物の探索においては、標的となる因子などの評価項目に対して化合物が与える生物活性を検討することにより、有益な生物活性および応用可能性を有する化合物を見出すことが可能となる。申請者である新澤健太氏は本研究においてヒト表皮および膀胱がんを標的とし、複数の化合物を用いた生物活性の評価を実施することでそれらの化合物が有する応用可能性について検討を行った。本研究の骨子と審査結果を以下に示す。</p> <p>1) ヒト表皮細胞およびヒト三次元皮膚モデルを用いた ginnalin B の生物活性評価 (第 1 章)</p> <p>申請者らのグループは、カエデ科植物に含まれるカエデタンニン類の一種である 6-O-galloyl-1,5-anhydro-D-glucitol (ginnalin B) が表皮細胞におけるセラミド量の増加をもたらし、表皮に対して有益な作用を示す可能性を有していることを先行研究として報告している。この知見に基づき、申請者は ginnalin B がヒト表皮において示す生物活性についてセラミド量以外の観点から評価を実施し、化粧品などを指向した応用性の検討を行った。</p> <p>はじめに、ginnalin B がヒト表皮細胞に形態学的変化を生じさせることを明らかとし、分化促進的な生物活性を有している可能性を見出した。この結果を踏まえ、表皮における分化マーカーの発現に対して ginnalin B が与える影響を単層培養細胞およびヒト皮膚三次元モデルを用いて検討したところ、分化マーカーである <i>keratin 10</i>, <i>keratin 1</i>, そして <i>filaggrin</i> の遺伝子発現およびタンパク質発現を増加させることを見出し、ginnalin B が分化促進作用を有していることを明らかとした。さらに、関連構造を有する化合物を用いた化学構造面の検討を行い、ginnalin B が有する galloyl 基、特にフェノール性水酸基が分化促進作用に関与する可能性が示唆された。また、ginnalin B の母核構造である 1,5-anhydro-D-glucitol における galloyl 基の置換位置に関しても検討を行い、6 位の位置に galloyl 基が存在している ginnalin B が最も強力な分化促進作用を示すことを明らかとした。続いて、分化と相反する関係の増殖について検討を行い、ginnalin B は細胞毒性や細胞死を生じさせることなくヒト表皮細胞の増殖を停止させることを明らかとした。この増殖停止においては G₀/G₁ 期で細胞周期が停止していることが確認され、G₀/G₁ 期停止と関連する因子のタンパク質発現および遺伝子発現を検討した結果、NOTCH1 の関与が示唆された。</p>			

NOTCH1 は分化に対しても影響を与えることが報告されていることから、ginnalin B は NOTCH1 を介した作用で分化および増殖に影響を与えていると結論づけた。

以上の検討により、申請者は ginnalin B が表皮において分化を促進する生物活性を示すことをその作用機序と共に明らかとした。この結果は ginnalin B が表皮において恒常性や機能の維持に寄与し、化粧品などへの応用可能性を有していることを示す重要な知見である。

2) 栄養飢餓条件下の膵臓がん細胞に対するアゾベンゼン誘導体の生物活性評価 (第2章)

膵臓がんの5年生存率は10%程度と悪性腫瘍の中でも極めて難治性であることが知られており、新規治療薬の開発が重要な課題である。膵臓がんの治療が困難である要因のひとつとして、グルコースや血清などの栄養が欠乏している「栄養飢餓状態」における膵臓がん細胞の生存特性および既存薬に対する耐性発現が挙げられている。こうした現状を踏まえ、申請者は栄養飢餓条件における抗がん活性の評価に基づき、新規膵臓がん治療薬の候補となる合成化合物の探索を実施した。その中で、初期検討によって活性が見出されたアゾベンゼン誘導体に着目し、14種類のアゾベンゼン誘導体(1-14)を用いた生物活性の評価を実施した。

申請者は、既存の抗悪性腫瘍薬である5-フルオロウラシルとゲムシタビンがその抗がん活性を示さない栄養飢餓条件において、検討を行った14種類のアゾベンゼン誘導体のうち5つの化合物(9, 11-14)に関して栄養飢餓条件下における抗がん活性を見出すことに成功した($IC_{50} = 1.5-9.6 \mu M$)。見出された5つの化合物について、通常培地を用いて富栄養条件下における細胞毒性を評価したところ、化合物11-14は毒性を発現した一方で化合物9は細胞毒性を示さなかった。正常細胞を用いた評価においても細胞毒性を示さなかったことから、化合物9は栄養飢餓条件選択的な抗がん活性を有していることが示された。化合物9が示す生物学的な作用を検討するため、細胞周期に対して与える影響を評価したところ、富栄養条件下では影響を示さないのに対し、栄養飢餓条件下では G_0/G_1 期にある細胞の割合を増加させることが明らかとなった。

申請者が見出した化合物に関して、栄養飢餓条件下における作用機序の解明など今後更なる検討を要する点は存在するが、しかしながら、既存薬が効果を発揮しない栄養飢餓状態において抗がん活性を発揮する化合物を見出した意義は大きい。特に化合物9に関しては栄養飢餓条件に対する選択性や正常細胞に対する毒性の検討によって優れた選択性および安全性が示唆されたことも踏まえると、本研究で得られた知見は新規膵臓がん治療薬の開発研究へとつながることが期待でき、アゾベンゼン誘導体の新たな応用性を示す結果であると考えられる。

本研究を総括すると、申請者は化合物の生物活性をその応用性を視野に入れて評価することによって、ginnalin B の分化促進作用、そしてアゾベンゼン誘導体の栄養飢餓条件下における抗がん活性をそれぞれ見出すことに成功した。これらの成果は、今後の化粧品開発あるいは抗悪性腫瘍薬開発に貢献することが期待できる有益な知見である。

主査および副査は、申請者である新澤健太氏に面接試験を行うとともに、論文内容を綿密に審査し、博士(薬学)の学位を授けるに十分値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名,論文題目,掲載誌名,巻,最初の頁と最後の頁,年を記載)

1. A. Kato, J. Koyama, K. Shinzawa, S. Imaeda, I. Adachi, R.J. Nash, G.W.J. Fleet, M. Shintani, C. Takeuchi, F. Ishikawa, Ginnalin B induces differentiation markers and modulates the proliferation/differentiation balance via the upregulation of NOTCH1 in human epidermal keratinocytes, *Bioorg. Med. Chem.* 27, 2172-2180, 2019.
2. K. Shinzawa, D. Kageta, R.J. Nash, G.W.J. Fleet, T. Imahori, A. Kato, Azobenzene derivatives show anti-cancer activity against pancreatic cancer cells only under nutrient starvation conditions via G_0/G_1 cell cycle arrest, *Tetrahedron*, accepted.