

イチイ増殖細胞による新規抗癌剤 Taxol の分泌生産

岡崎 扶美, 北川 順子, 地田 千枝*,
星野 一宏, 赤壁 節子, 諸橋 昭一

Secretory Production of Taxol by Cell Cultuer of *Taxus cuspidata*

Fumi OKAZAKI, Junko KITAGAWA, Kazuhiro HOSHINO, Chie CHIDA*,
Setuko AKAKABE, and Shoichi MOROHASHI

Pacific yew tree have been used as ethnomedicinals (aborthfacient, antiseptic agent etc.) for along time, and it become clear in the 1960's that a trace of pharmacological component existed in the bark extract, Taxol, has significant anticancer activity. However, new problem concerning the decrease of sources is recently occurring in USA to cut down unplanned the yew tree. Therefore, we established the cell suspension culture from Japanese yew tree (*Taxus cuspidata*). In this study, secretory production Taxol by shaking culture of the growing cell was investigated. As a result, it was found that the growing cell and medium recovered after the culture of 54 days were contained high concentration of Taxol. Moreover, by adding L-Phe to medium at the level of 0.5 mM, the amount of Taxol secreted in the medium can be 1.2-fold high than that without L-Phe.

Key words: Taxol, Anticancer drug, *Taxus cuspidata*, Plant tissue culture, Secretory production, Japanese yew tree

1. 緒言

イチイの樹皮は古来より毒物として用いられ、民間薬レベルとして、消毒薬、あるいは、墮胎薬に使用されてきた。1960年代になって、イチイの樹皮抽出物中から精製された薬理成分 Taxol が、新しい抗癌剤として利用できることが判明し再び脚光をあびるようになってきた¹⁾。従来から用いられている抗癌剤シスプラチンは、癌化した細胞が DNA 複製のために二重螺旋をほどいて二本にする過程を阻害する。また、クロラムブシルは、DNA の特定の部位に化学結合し、癌化した細胞内の二本鎖の DNA

に欠損を生じさせ、細胞を死滅させる作用がある。ところが、Taxol は、癌化した細胞中に存在する微小管に特異的に結合する。この微小管は、重合し紡錘糸となって、母細胞の左右両極へ染色体を引っ張り寄せる役目をはたし、二つの娘細胞に遺伝子の完全なセットを確保する。したがって、Taxol は微小管の重合・脱重合を阻害し、細胞分裂を阻止することにより抗癌作用を発揮する²⁾ 全く新しいタイプの抗癌剤である。さらに、耐シスプラチン化した乳癌、子宮癌、肺癌等に対して極めて有効である³⁾ との報告がなされ有望視されている物質である。このような背景から、太平洋イチイ (*Taxus brevi-*

*現：富山工業高等専門学校 物質工学科

folia) の樹皮より Taxol を抽出する試みがなされ、薬剤の生産がなされるようになったが、イチイの樹皮より回収できる Taxol 量は木 1 kg 当たりおよそ 0.1g しかなく、さらに木の成長が大変遅いため、治療に利用できるだけの Taxol を確保することは困難な状況になってきた。それ故、多くの科学者によりその化学合成が試みられ 1994 年に、米国の二つの研究グループによりその化学合成が報告された^{4, 5)} が、医療現場から要求される需要にはほど遠く、効率的な全合成法の確立が望まれている。したがって、現在、Taxol 確保する最良の道は、イチイの増殖細胞を用いて Taxol を生産させる方法である。

そこで、本研究では本国内で入手可能な日本イチイ *Taxus cuspidata* の増殖細胞を用いた Taxol の連続分泌生産を最終目標として、日本イチイの増殖細胞培養系を確立し、その細胞を用いて Taxol を培地中へ効率よく分泌させることを検討した。

2. 実験方法および分析方法

2.1 実験材料および培養方法

本研究で使用したイチイの増殖細胞は、東北大学農学部構内で採取した日本イチイの芽より誘導した *T. cuspidata* 30N である。この細胞は、2 年以上寒天培地上で継代培養を行った。培地は、イチイ増殖細胞に一般に使用されている標準の Gamborg's B 5 培地⁶⁾ を使用した。また、炭素源として Sucrose 20g/l を、ビタミン成分として Thiamine-Hydrochloride 2g/l, Nicotinic acid 0.2g/l, Pyridoxine-Hydrochloride 0.2g/l, および myo-Inositol 20g/l を添加した。さらに、この培地へ、植物ホルモンとして 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) 1 μM, および、6-Benzylaminopurine (BAP) 0.05 μM となるように添加した。培地の滅菌は、pH を 5.8 に調整した後、121°C で 15 分間オートクレーブすることにより行った。培地を冷却した後、クリーンベンチ内で 30 分以上 UV 照射しておいた L-Glutamine 292g/l, および、L-Ascorbic acid 0.05g/l を 0.2 μm のメッシュ膜 (DISMIC-13cp, ADVANTIC Co.) を用いて膜滅菌し、各培地へ添加した。また継代培養用の固体培地は、この培地に寒天 10g/l となるよう添加して調製した。また、液体培養はメリクロン用三角フラス

コを用い、実体積は 25ml とした。固体培養しておいた増殖細胞は、28°C に保ったインキュベータ内に静置し、2 ヶ月ごとに新しく調製した培地へ植え継いだ。また、液体培養を行うための前培養は、クリーンベンチ内で固体培地上で生育した増殖細胞を回収したあと、液体培地中で均一に懸濁させるためステンレスネット (0.1cm × 0.1cm 格子 Nippon Rikagaku Kikai Co.) を用いて、増殖細胞を濾した後、約 0.5cm × 0.5cm に等分し、液体培地へ接種した。その後、28°C に制御してあるフォトチャンバー内で、6,000 lux の連続光照射下、120rpm の振とう速度で培養を行った。

2.2 サンプルの回収

三角フラスコ内で液体振とう培養した増殖細胞は、3 日おきに 2 本ずつ回収し、その後、濾紙 (No.131, ADVANTIC Co.) を用いて濾過することにより、増殖細胞を培養液から分離した。濾紙上に残った増殖細胞は十分に蒸留水で洗浄し、水気を取った後、湿潤状態の重量を測定した。その後、増殖細胞中および培養液中に含まれている Taxol の抽出を行った。

2.3 Taxol 抽出

増殖細胞から Taxol の抽出は以下のように行った。回収した増殖細胞を乳鉢に入れ、乳棒を用いて十分にすりつぶし、Methanol 5g/l を加えて一昼夜冷蔵庫内 (4°C) で放置した。この懸濁液を吸引濾過後、エバポレーターを用いて 30°C で蒸発乾固させ、残渣に 0.1N Acetate Buffer (pH5) 5ml を加えた。さらに Taxol に結合している糖鎖を切断するため、20g/l の Meicelase (明治製菓) を 0.1 ml 加え、30°C に保った水槽中で 24 時間反応させた。反応終了後、Ethyl acetate で 3 回抽出を行い、エバポレーターにより濃縮乾固させ粗抽出物を得た。これを 5 ml の Acetonitrile に再溶解し、HPLC の試料とした。培養液中に分泌された Taxol を分析するために、sampling 時に回収した培養液を使用した。この培養液を正確に 5 ml 取り、そこへ 20g/l の Meicelase 0.1ml を加え 30°C で 24 時間反応させた。その後増殖細胞内の Taxol の方法と同様に抽出を行った。

2.4 Taxol 分泌生産に対する Taxol 前駆体の添加効果

Taxol 生産に対するその前駆体の培地への添加効果を検討するために、培養40日目に Mevalonic acid (MA), および, Phenylalanine (Phe) を培地に添加した。このときMAは熱に対して不安定であるため、クリーンベンチ内で、0.2 μ mのメッシュ膜を用いて滅菌し、培地へ添加した。培養は添加後10日間行い、その時の Taxol 誘導効果を調べた。

2.5 Taxolの定量

増殖細胞内、および、培養液中の Taxol 量は HPLC を用い測定した。カラムは TSK-GEL CN-80TS (Tosoh Co.) を用いた。検出器として、紫外吸収計 (SPD-10A, Simadzu Co.) を使用し、検出波長は227nmで流速は1.0ml/minとした。移動層には Methanol: Water: Acetonitrile=20:56:24を用いた。また Taxol の検出時間は、この分析法にて約13minである。

3. 結果および考察

3.1 増殖細胞内および培養中の Taxol 量

1996年春に、東北大学農学部校内より採取した日本イチイの新芽より増殖細胞を誘導し、2ヶ月おきに寒天培地上で継体培養を行うことにより、無菌化を行ってきた。その過程において、寒天培地上の増殖細胞は増殖に伴い、寒天と細胞の接触点が徐々に褐色化するという現象を確認していた。さらに、液体培地を使用した際にも同様に、培養液の褐色化が観察できた。この褐色は、イチイの木が特異的に生産する Taxol 類であるとの推察のもとに、誘導した増殖細胞を液体培地を用いて連続光照射下で振とう培養を行い Taxol の分泌生産の可能性を検討した。Fig. 1 は *T.cuspidata* 30Nを54日間液体振とう培養を行い回収した増殖細胞、および、培養液中へ分泌した Taxol 量を培養液 1 l 当たりとして換算した値である。この結果、培養液中には1.97mg、増殖細胞内でも0.55mgもの Taxol が生産されていることがわかった。さらに、培養液が褐色化しているほど、培養液中の Taxol 分泌量が多いことがわかった。二次代謝産物である Taxol が細胞から分泌されるのは、細胞内に保持できる Taxol 量が決

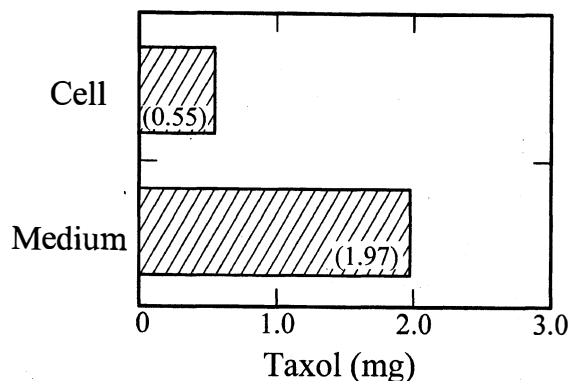


Fig.1 Taxol production by shaking culture

まっているためか、あるいは Taxol がイチイ細胞にとっても極めて強い毒であるため一定の Taxol が蓄積されると細胞外へ排泄してしまふためと考えられる。しかし、いずれにしても貴重な増殖細胞を傷つけることなく Taxol を分泌生産できる可能性が示唆された。

3.2 増殖細胞の回分培養

Fig. 2 は、Taxol を効果的に培地中へ分泌生産させるために、*T.cuspidata* 30Nを用いて液体振とう培養を35日間行い、その時の細胞の増殖、および Taxol の生産を経時的に検討した結果である。細胞の増殖は12日目まで対数的に増殖し、その後、培地 1 l 当たり約1.1wet g でほぼ一定となった。また、細胞中の Taxol の生産量は、培養14日目において、1.2mgと最大値に達した後、急激に減少し、培養18日目に0.12mgにまで低下した。しかし、その後、再び増加に転じ、培養28日目に0.8mgの蓄積がみられた。この現象は、細胞内に Taxol 量が過剰に蓄積すると、自分自身はその毒性により増殖できなくなり、そのため一時的に Taxol を細胞外へ過剰に分泌してしまうい、これを補うために、Taxol の生合成経路が再び活性化し、増加に転じるため考えられる。このように細胞内で Taxol 量が変動する現象は多くの研究者により報告されており、関ら⁷⁾によれば7日周期であったが、本研究の場合14日周期であることがわかった。一方、培地中へ分泌された Taxol 量は、細胞内の Taxol 生産量と連動して増加し、培養14日目において培地 1 l 当たり最高0.97mgに達した。しかし、その後は急激に低下し、培養18日目以降、約0.2mgで一定となった。14日目以降、細胞内と培養液中の Taxol 量が

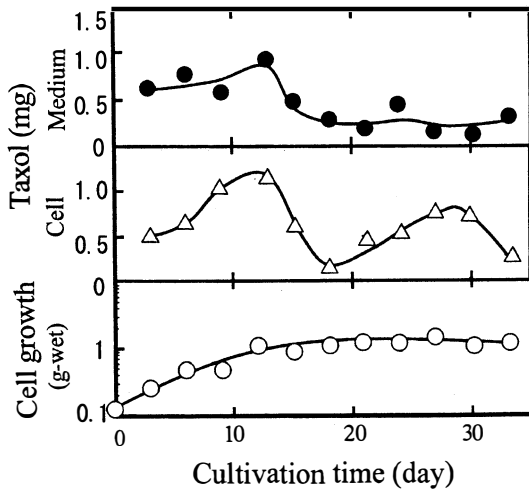


Fig. 2 Batchwise culture of *T.cuspidata* 30N

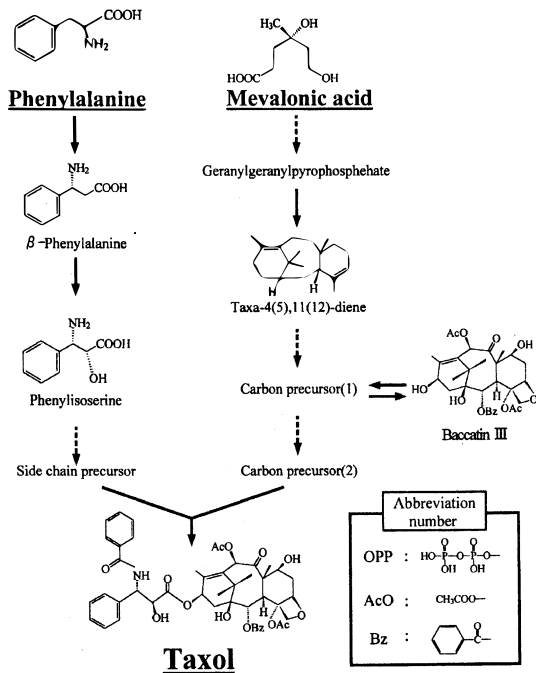


Fig. 3 Biosynthetic pathway of Taxol

急激に減少した原因は、細胞の増殖に伴い、培地中の微量栄養素が枯渇したことにより同調培養が起こり、生成した Taxol の細胞により代謝分解が促進されたことが主な原因と考えられる。しかし、培養 20 日目以降、Taxol が細胞内に蓄積されたにもかかわらず、培地への新たな Taxol 分泌が認められなかったのは、回分培養を行っていることによる細胞の老化、および Taxol を細胞外へ分泌するために必要な量に達していなかったためと考えられる。

3.3 Taxol 前駆体添加による生産への効果

さらに、Taxol を培地中へ大量に分泌させることを目的として、生合成経路を利用した物質生産を検討した。Fig. 3 は、現在までに解明されている Taxol 合成経路⁸⁾である。具体的には、植物細胞の糖の 1 次代謝において、アセチル CoA から生成する Mevalonic acid (MA) が、Taxol の taxane 環を形成する。一方、図の左に示したアミノ酸の合成経路から生成する Phenylalanine (Phe) が、Taxol の側鎖を形成する。この二つの物質が結合することにより Taxol が生合成される。そこで、この生合成経路を利用して、Taxol の前駆体 Phe、および MA を培地に添加したときの細胞の増殖と、細胞内の Taxol 量、および、培地中に分泌された Taxol 量を検討した。

Fig. 4 は培養開始前に培地に Phe、あるいは MA を添加し、54 日間液体振とう培養したときの細胞の増殖と Taxol 生産について調べた結果である。細胞の増殖は、対照実験において培地 1 ℓ 当たり約 1.8g 得られたが、MA あるいは Phe を添加しても全く悪影響はなく、対照と比較して 20~30% 多く得ることができた。また、Taxol の生産は、MA を添加した場合、細胞内および培地中の Taxol 量は対照の値と 50~70% にまで低下し、残念ながら良好な生産は達成することができなかった。一方、Phe を 0.1 mM となるように培地へ添加したとき、培地 1 ℓ 当たり 0.93mg の Taxol 生産がみられた。これは対照と比較して、1.5 倍高い値であった。しかし、この条件において培養液中に分泌された Taxol 量は 1.5 mg と対照実験の約 70% であった。Phe を 0.5mM と

Precursor	Addition amount (mM)	Cell growth (g-wet)		Taxol (mg)	
		1.0	2.0	Cell 0.5	Medium 1.0 2.0
Control	—	1.8	1.8	0.6	1.2
Mevalonic acid	0.1	2.2	2.2	0.3	0.6
	0.5	2.2	2.2	0.3	0.6
Phenylalanine	0.1	2.2	2.2	0.93	1.8
	0.5	2.2	2.2	0.93	1.8

Fig. 4 Effect of the addition of precursors on Taxol production

なるように添加した場合、0.1mMの場合とは逆に、培地中への Taxol の分泌が向上し、対照と比較して1.2倍となった。以上の結果より、MAの添加は、Taxolの生産に対して良くないものの Pheの添加は Taxolの誘導生産を促進することがわかった。これは Fig. 3 で示した生合成経路においてPhe合成経路、あるいはPheからの Taxol 生合成経路が律速段階であることを示唆しており、今後、Taxolを効率よく生産しようとする際には、この経路を促進させるような手法を取り入れる必要があると考えられる。また、Pheは安価なアミノ酸であり、Pheの添加量により Taxol の分泌が調節できることから、Taxol 生産を向上させる上でPheの利用は経済性から考えて極めて有益な方法である。

4. 結 言

日本イチイ *Taxus cuspidata* を用いて Taxol を効率よく生産させることを目的として、その増殖細胞を用いた液体振とう培養により、Taxol の生産およびその前駆体による分泌生産を検討した。回分培養した結果、細胞内の Taxol 生産量は培養14日目に培地 1 ℓあたり1.2mgとかなりの量を生産することができた。同時に、培地中へも Taxol は分泌されその量は0.97mg/ℓであった。さらに、培地に Taxol の前駆体であるPheを0.5mMになるように添加したとき増殖細胞の増殖に悪影響を与えることなく Taxol を効率よく培地へ分泌できることがわかった。以上の結果をもとに、誘導はイチイ増殖細胞を用い、かつ植物細胞用のバイオリアクターを活用することにより、簡単に培液から Taxol を連続的に生産できることが期待される。今後は、リアクターを用いた連続培養系を確立し、安価に Taxol を生産することを検討する予定である。

参考文献

- 1) Wani M. C., Taylor H. E., Coggon P., and Mcphail A. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2327 (1971).
- 2) Jordon M. A., and Wilson L.: Taxane anticancer agents (ACS Symposium Series 583), pp, 138-153, Am. Chem. Soc, Washing-

- ton DC. (1995).
- 3) Holmes F. A., Walters R. S., Theriault R. L., Forman A. D., Newton L. K., Raber M. N., Buzder A. U., Frye D. K., and Hortabagyi G. N.: *J. Nat. Cancer. Inst.*, **83**, 1797-1805 (1991).
- 4) Nicolaou K. C., Yang Z., Liu J. J., Ueno H., Nantermet P. G., Guy R. K., Claiborne C. F., Renaud J., Couladouros E. A., Paulvannan K., and Sorensen E. J.: *Nature*, **367**, 630-634 (1994).
- 5) Holton R. A., Somoza C., Kim H. B., Liang F., Biediger R. J., Boatman P. D., Shindo M., Smith C. C., Kim S., Nadizaadeh H., Suzuki Y., Tao C., Vu P., Tang S., Zhang P., Murthi K. K., Gentile L. N., Liu J. H.: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 1597-1600 (1994).
- 6) Gomborg's O. L., Miller R. A., and Ojima K.: *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158 (1968).
- 7) Seki M., Ohzora C., Takeda M., and Furusaki S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 214-219 (1997).
- 8) Srinivasan V., Ciddi V., Bringi V., and Shuler M. L.: *Biotechnol. Prog.*, **12**, 457-465 (1996).