

カカオリグニン配糖体の アポトーシス誘導作用

田沼 靖一

東京理科大学薬学部生化学教室教授、ゲノム創薬研究センター長

はじめに

現在、我が国の死亡原因の第一位は癌であり、毎年約30万人を超す人が亡くなっている。癌治療法として、手術や放射線治療と並んで、近年、化学療法が急速に発展しており、癌細胞特有の分子を標的とした重篤な副作用の比較的少ない分子標的薬が臨床で用いられるようになってきている。しかし、まだ十分とは言えず、新規制癌剤の開発及び新たな癌治療法の確立が急務となっている。その一方で、最近、癌発症を先制的に予防する予防医療のための制癌性天然物、生薬等の成分分析が進められている。

チョコレートの主原料であるカカオ豆には、種々のポリフェノールが豊富に含まれており、様々な生理活性を有することから、健康増進に寄与していると考えられている (図1)。私共はこれまでに、カカオ由来リグニン配糖体 (CLG) に癌ウイルス遺伝子の発現を抑制することによる制癌作用があることを見出している。また、最近、カカオリグニン配糖体が癌細胞に特異的に発現しているグリオキサラーゼI (GLOI) を阻害し、アポトーシスを誘導することも見出した。このGLOIは、解糖系に依存したエネルギー代謝をする癌細胞に高発現しており、代謝副産物として生成される有害なメチルグリオキサル (MG) を解毒するシステムの律速酵素である。多くの癌細胞は、好氣的 (酸素存在下) な条件でも、ミトコンドリアにおけるTCAサイクルに共役した電子伝達系-酸化リン酸化 (呼吸鎖) 系よりは、解糖系を亢進させてATP産生をするように代謝リプログラミングを起こしている。この現象は、Warburg効果として知られている (図2) ¹。

この様な解糖系に依存したエネルギー代謝では、代謝副産物としてMGが生成され、タンパク質やDNA、RNAを非可逆的に修飾してアポトーシスを誘導するため、癌細胞では、GLOシステムを亢進させてMGを無毒化する必要がある²⁻⁴。このことから、GLOIの特異

●カカオ成分

カテキン、エピカテキン、プロシアニジン、プロアントシアニジン、シナムタンニン、リグニン、ヘミセルロース、セルロース、β-シトステロール、トリグリセリド

●生理活性

抗酸化作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗動脈硬化作用、抗炎症作用、糖鎖吸収阻害作用、抗肥満作用、インスリン抵抗性改善作用、アルコール性脂肪肝予防作用、紫外線傷害保護作用

●新しい生理活性

アポトーシス抑制 (細胞死) | 誘導 --- リグニン配糖体 (CLG) --- 抑制作用
抑制 --- プロアントシアニジン --- 神経細胞保護作用

図1 カカオ成分の新しい生理活性

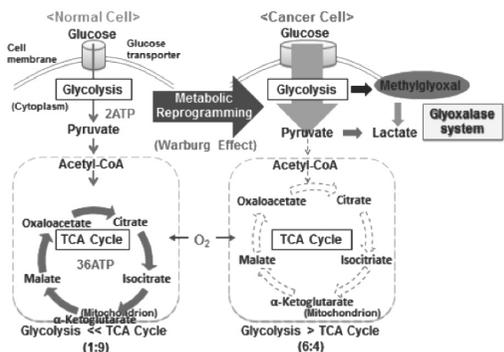


図2 癌細胞におけるエネルギー代謝リプログラミング (Warburg効果)

的阻害剤は、癌細胞選択的にMGを蓄積させてアポトーシスを誘導する、という新規メカニズムによる制癌剤の開発が注目されている(図3)⁵⁻⁹。

本研究では、カカオリグニン配糖体の制癌効果について、GLOI阻害活性と癌細胞に対するアポトーシス誘導作用の視点から紹介する。

1. GLOI阻害剤CLGの特性

これまでに、報告されているGSH誘導体型GLOI阻害剤^{10, 11}は、GLOI特異性が低いこと、及びGSHがもつペプチド骨格が膜透過性・吸収性・安定性に影響を与えることから、制癌剤開発のリード化合物としては不適切であり、臨床応用は困難となっている。当研究室では、*in silico*手法を用いて従来のGSH誘導体とは異なる新規骨格GLOI特異的阻害剤TLSC702及びCLGを見出している(図4)¹²。これらは、既存の阻害剤として知られているGSHアナログ(BPHC-GSH)より強い阻害効果を示した。しかし、両者共に、*in vitro*でのGLOI阻害能は強いものの、細胞レベルでのアポトーシス誘導には高い濃度を必要とした(図4)。その理由の一つとして、癌細胞はGLOIを阻害されるとMGの蓄積を回避するために、解糖系優位なエネルギー代謝からTCAサイクル(ミトコンドリア呼吸)優位になるような「代謝シフト」を起こし、抵抗性を示す可能性があるのではないかと考えられる(図5)。

本研究では、GLOI阻害剤とTCAサイクル優位への代謝シフトを抑制する薬剤との併用処理を行うことにより、効果的な制癌効果が得られるのではないかとという作業仮説を立てた。GLOI阻害剤と併用する薬剤の標的分子としては、解糖系からTCAサイクルをつなぐピルビン酸を生成する癌細胞特異的な代謝酵素であるPyruvate kinase M2 (PKM2)に着目した¹³⁻¹⁷。つまり、GLOI阻害とともにPKM2も阻害することで、TCAサイクル優位への代謝シフトを抑制し、解糖系優位に留めることによって、MG蓄積-アポトーシス誘導メカニズムによる、より効率的な制癌効果が得られるのではないかとというシナリオである。

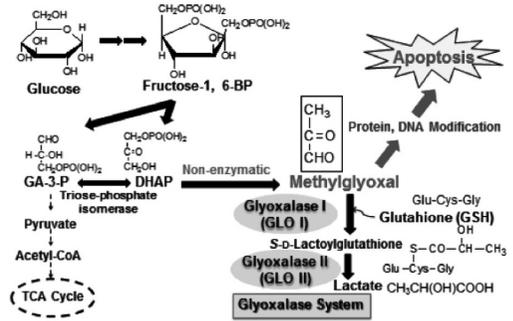


図3 メチルグリオキサールによるアポトーシス誘導とグリオキサラーゼシステム

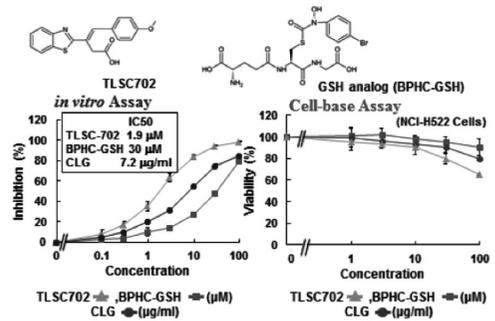


図4 CLGによるGLOI阻害と細胞増殖抑制

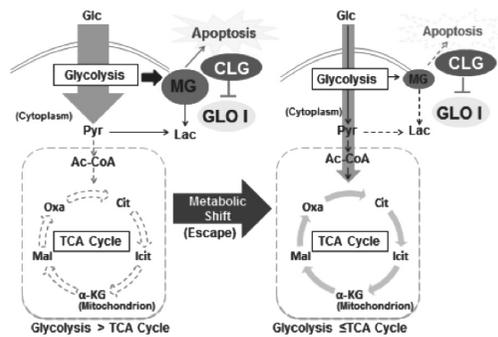


図5 CLG処理による代謝シフト

2. GLOI阻害剤CLG処理による癌細胞のエネルギー代謝シフト

まず、癌細胞がCLG処理によってエネルギー産生を解糖系優位からTCAサイクル(ミトコンドリア呼吸)優位になるような代謝シフトを起こすか否かを解析した。用いた培養細胞は、ヒト非小細胞肺癌細胞株で、GLOIを高発現しているNCI-H522細胞である。この細胞にCLGを72時間処理した際の培養液中のグルコース量、及び乳酸量の変化をそれぞれGlucose assay法及びLactate assay法により測定した。その結果、CLGを100 μ g/ml処理した細胞の培養液中のグルコース量の増加、及び乳酸量の減少がみられた(グルコース消費量約60%低下、乳酸産生量約20%低下)。これらの結果は、GLOI阻害剤処理により、癌細胞が解糖系を抑制し、TCAサイクル優位となる代謝シフトを起こすことを示唆する。この回避機構によって、癌細胞は、GLOIが阻害されると亢進している解糖系を抑制し、MGの産生を抑制してアポトーシス誘発を免れることによって、抵抗性を示すと考えられる。

3. GLOI阻害剤と代謝シフト阻害剤の併用効果

癌細胞は、GLOIを阻害されると、エネルギー代謝を解糖系からTCAサイクル優位へとシフトすることから、この代謝シフトを抑制すれば、GLOI阻害によるアポトーシス誘発機構としての制癌効果が高められることができると予測される。そこで、併用剤の標的分子として、癌細胞に特異的であり解糖系の最終段階であるホスホエノールピルビン酸をピルビン酸に変換してTCAサイクルを回す酵素であるPKM2に着目した¹³⁻¹⁷。NCI-H522細胞でのPKM2発現量をWestern blottingにより解析したところ、正常細胞では主にPKM1が発現しているのに対して、NCI-H522細胞ではPKM1に対して、PKM2の発現量が約15倍高いことが判明した。よって、GLOI阻害剤と併用する薬剤の標的分子として、癌細胞特異的なPKM2に決定した。

PKM2阻害剤としては、shikonin (IC₅₀=0.3 μ M) を用いることにした¹⁸。まず、shikoninを併用処理する際の濃度を定めるために、NCI-H522細胞に72時間単剤処理し、細胞生存率への影響をWST assay法により解析した。その結果、0.3 μ Mまで高い細胞生存率(≥80%)を維持し、EC₅₀は0.5 μ Mであった。このことより、TLSC702との併用処理に用いるshikonin濃度は、0.3 μ Mとした。

NCI-H522細胞にCLG (0, 30, 100 μ g/ml) とshikonin (0, 0.3 μ M) とを72時間併用処理した際の細胞増殖への影響を、トリパンプルー色素排除法により解析した。CLG単剤処理とCLGとshikoninとの併用処理で生細胞数の割合を比較したところ、併用処理によりCLGの濃度依存的に細胞増殖が顕著に抑制された。

さらに、NCI-H522細胞にCLG (0, 30, 100 μ g/ml) とshikonin (0, 0.3 μ M) を72時間併用処理した際の細胞死への影響をトリパンプルー色素排除法により解析した。CLG単剤処理群とshikoninとの併用処理群で死細胞数の割合を比較したところ、併用処理によりCLGの濃度依存的に死細胞の割合が増加し、PARPの限定分解も見られることからアポトーシスが誘導されることが判明した(細胞死誘導率:単剤処理群、約10%、併用処理群:約40%) (図6)。

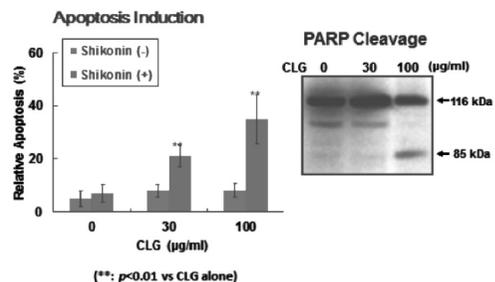


図6 CLGとPKM2阻害剤shikoninとの併用によるアポトーシス誘導増強効果

おわりに

本研究で見出されたGLOI阻害剤CLGは、*in vitro*でのGLOI阻害能は強いものの、細胞レベルでのアポトーシス誘導能は高い濃度を必要とする。また、癌細胞はGLOIを阻害されるとMGの蓄積を回避するために、これまでの解糖系優位なエネルギー代謝からTCAサイクル優位となる「代謝シフト」を起こす、という重要な知見が得られた。そこで、解糖系とミトコンドリア呼吸をつなぐ癌細胞特異的な代謝酵素PKM2に着目し、PKM2阻害剤との併用効果を検証した。その結果、予測通りPKM2の特異的阻害剤であるshikoninをCLGと併用すると、癌細胞の増殖が強く抑制され、細胞死も誘発されることが明らかとなった。この結果は、PKM2阻害剤がピルビン酸生成を阻害し、TCAサイクルの利用を抑止させ、エネルギー産生を解糖系優位に留めることで、GLOI阻害剤によるMG蓄積-アポトーシス誘導メカニズムによる制癌作用がより効果的に発揮されることを示唆する(図7)。

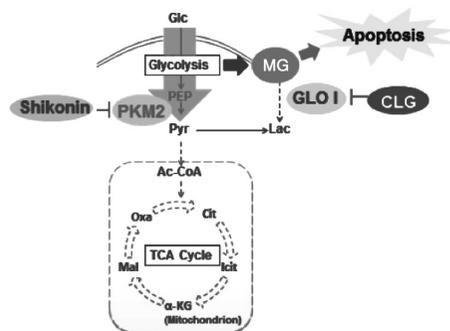


図7 GLOI/PKM2阻害剤の併用による制癌作用

本研究により、Warburg効果のような「代謝リプログラミング」を起こした癌細胞は、細胞内外のさまざまな変化が起こると、それに応じてエネルギー代謝経路をシフトすることが明らかとなり、一つの代謝経路を阻害しただけでは他の代謝経路を利用して生存してしまう可能性が生じることが示唆される。よって、変化する癌細胞の回避代謝経路を明らかにし、その「代謝シフト」を担う重要な分子群を標的とする分子標的薬を組み合わせた新たな併用療法の確立が有効な癌化学療法の開発につながると考えられる。また、本研究により見出されたCLGは、特徴的な構造を有することから、その部分構造解析から新規GLOI阻害剤を設計するための母核構造を同定できる可能性がある。そればかりでなく、CLG自身が予防医薬としての重要な素材となる得ることも考えられる。今後、このような新しいコンセプトと分子設計から、新規癌併用化学療法及び予防医薬の開発が期待される。

参考文献

1. Warburg, O. On the origin of cancer cells (1956) *Science* 123, 309-314.
2. H. D. Dakin and H. W. Dudley ON GLYOXALASE (1913) *J. Biol. Chem.* 14, 423-431.
3. Cliffe EE, Waley SG. The mechanism of the glyoxalase I reaction, and the effect of ophthalmic acid as an inhibitor. (1961) *Biochem. J.* 79, 475-482.
4. Racker E. The mechanism of action of glyoxalase. (1951) *J. Biol. Chem.* 190, 685-96.
5. Thornalley PJ, Waris S, Fleming T, Santarius T, Larkin SJ, Winklhofer-Roob BM, Stratton MR, Rabbani N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase I-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Res.* (2010) 38, 5432-5442.
6. Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T. Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-

- overexpressing human lung cancer cells. (2001) *Clin. Cancer Res.* 7, 2513-2518.
7. Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M, Tsuruo T. Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis. (2000) *Blood* 95, 3214-3218.
 8. Vince R and Wadd WB. Glyoxalase inhibitors as potential anticancer agents. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 593-598.
 9. Vince R, Daluge S. Glyoxalase inhibitors. A possible approach to anticancer agents. (1971) *J. Med. Chem.* 14, 35-37.
 10. Thornalley PJ, Ladan MJ, Ridgway SJ, Kang Y. Antitumor activity of S-(p-bromobenzyl)glutathione diesters in vitro : a structure-activity study. (1996) *J. Med. Chem.* 39, 3409-3411.
 11. Murthy NS, Bakeris T, Kavarana MJ, Hamilton DS, Lan Y, Creighton DJ. S- (N-aryl-N-hydroxycarbamoyl) glutathione derivatives are tight-binding inhibitors of glyoxalase I and slow substrates for glyoxalase II. (1994) *J. Med. Chem.* 37, 2161-2166.
 12. Takasawa R, Tao A, Saeki K, Shionozaki N, Tanaka R, Uchiro H, Takahashi S, Yoshimori A, Tanuma S. Discovery of a new type inhibitor of human glyoxalase I by myricetin-based 4-point pharmacophore. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2011) 21, 4337-4342.
 13. Imamura K, Tanaka T. Pyruvate kinase isozymes from rat. (1982) *Methods Enzymol.* 90, 150-165.
 14. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. (2008) *Nature* 452, 230-233.
 15. Noguchi T, Inoue H, Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 13807-13812.
 16. Ugurel S, Bell N, Sucker A, Zimpfer A, Rittgen W, Schadendorf D. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma. (2005) *Int. J. Cancer* 117, 825-830.
 17. Ashizawa K, Willingham MC, Liang CM, Cheng SY. In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 16842-16846.
 18. Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. (2011) *Oncogene* 30, 4297-306.