The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Agosterol A, A Novel Polyoxygenated Sterol Acetate Reversing P-gp and MRP1 Mediated Multidrug Resistance in Tumor Cells
Author(s)	Andi, Setiawan
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43357
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【1】

氏　　名	Andi（あんでぃ）　Setiawan（せてぃあわん）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16461　号
学位授与年月日	平成13年6月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	Agosterol A, A Novel Polyoxygenated Sterol Acetate Reversing P-gp and MRP 1 Mediated Multidrug Resistance in Tumor Cells （がん多剤耐性克服作用を有する新規ステロール agosterol Aの化学構造と構造活性相関）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小林　資正 （副査） 教　授　田中　徹明　　教　授　大森　秀信　　教　授　今西　　武

論　文　内　容　の　要　旨

抗がん剤を用いた化学療法において、作用機序も化学構造も大きく異なる複数の抗がん剤が効果を示さない「がんの多剤耐性」という現象が臨床的にしばしば認められ、がん治療の大きな障害となっている。がん細胞が多剤耐性を獲得するメカニズムはいくつか知られているが、薬剤排出膜タンパク質が関わる耐性獲得機構が現在注目されている。すなわち、がん細胞が、抗がん剤を細胞外に排出するポンプの役割を果たす膜タンパク質を過剰発現し、細胞内の抗がん剤濃度を低く保つことによって耐性を獲得するという機構が明らかになっており、このポンプ機構を担うものとして P-glycoprotein（P-gp）や multidrug resistance-associated protein（MRP1）と呼ばれる膜タンパク質が見出されている。したがって、これらの膜タンパク質の機能を阻害できる化合物は、抗がん剤と併用することによりがん化学療法の効果を飛躍的に高める可能性を秘めており、現在、そのような耐性克服物質が臨床の場からも切望されている。

このような背景から、著者は、新しいがん多剤耐性克服物質を探索する目的で、簡便なアッセイ法を構築し、種々の海洋生物の抽出エキスをスクリーニングした。スクリーニングには、P-gp を過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞 KB-C2 株および MRP1 を過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞 KB-CV60株の 2 種の多剤耐性がん細胞を用いた。実験は、マイクロプレートに耐性がん細胞を分注し、24時間培養後、耐性許容濃度の抗がん剤と被験薬物を作用させ、48時間後に MTT 法によって細胞の生育阻害率を算出した。さらに、両耐性株の親株である KB-3-1 株に対して被験薬物のみを作用させた細胞毒性試験の結果と比較して被験薬物の耐性克服作用の有無を判定した。そして、スクリーニングの結果、三重県英虞湾で採集した *Spongia* 属海綿のアセトン抽出エキスに耐性克服作用がみられたので、その活性本体を明らかにするために活性試験の結果を指標に分画精製して、主活性物質として agosterol A と命名した新規ステロールを単離した。

Agosterol A は FAB MS よりその分子組成が明らかとなり、COSY, TOCSY, HMQC, HMBC の各 2 次元スペクトルをはじめとする NMR データを詳細に解析することにより、3, 4, 6 位にアセトキシル基、11, 22位に水酸基を有する新規ステロールであることが明らかになった。また、agosterol A の相対立体構造の検討を行うために、ROESY スペクトルおよびプロトン間のカップリング定数の詳細な解析を行い、A，B，C，D環の結合様式と 3, 4, 6, 11位の酸素官能基の相対立体配置を明らかにした。次に、agosterol A に改良 Mosher 法を適用することにより、11および22位の絶対立体配置をそれぞれ *R* 配置と決定した。また、agosterol A と同一の側鎖構造を有する既知化合

物（20*S*, 22*R*)-hydroxycholesterol の ^{1}H-及び ^{13}C-NMR シグナルを agosterol A と比較解析し、さらに、agosterol A を PDC で酸化し、22-keto 体へと誘導して既知物質の（20*S*)-22-ketocholesterol と CD スペクトルを比較することで、20位の立体配置が *S* 配置であることが確認できた。以上の結果から、agosterol A の絶対立体構造を含む全化学構造が決定できた。

また、同エキスの含有成分について精査し、新規関連ステロイド agosterol B, C, A_4, D_2, A_5 および C_6 を単離した。Agosterol B, C, A_4, D_2, A_5 および C_6 の化学構造は、2D-NMR を中心とする物理データおよび化学誘導によって決定した。

次に、agosterol A の多剤耐性克服作用について MTT 法を用いて検討した。Agosterol A を共存させると、colchicine の KB-C2 株に対する生育阻害曲線が用量依存的に親株で非耐性株である KB-3-1 株に対する生育阻害曲線に近づき、agosterol A は KB-C2 株の colchicine に対する耐性を 3 μM の濃度で完全に克服できることが明らかになった。また、agosterol A は、MRP1 を過剰発現する多剤耐性腫瘍細胞である KB-CV60株の vincristine 耐性についても 3 μM の低濃度で完全に克服することができた。さらに、2 種類の多剤耐性がん細胞における agosterol A 存在下での細胞内抗がん剤濃度の変化について検討した。耐性株での細胞内 vincristine 蓄積濃度は親株の約40%まで低下していたが、agosterol A を作用させると用量依存的に上昇することが明らかになった。また、細胞外への抗がん剤排出に対する agosterol A の作用を検討した。耐性株では親株の KB-3-1 株に比べて速やかに vincristine が排出され、120分経過後の細胞内 vincristine 残留量は約20%であった。一方、agosterol A（10 μM）存在下では親株と同程度まで vincristine の排出が抑制された。これらの結果から、agosterol A は多剤耐性がん細胞に過剰発現する薬剤排出膜タンパク質に作用し、その薬剤排出を阻害して細胞内抗がん剤濃度を高めることが示唆された。

また、今回得られた agosterol A の類縁体や誘導体についてその耐性克服作用を検討した。その結果、1 個のアセチル基がない類縁体には活性の減弱が見られ、完全脱アセチル化体にはほとんど活性が見られなかった。また、11位または22位水酸基を有していない誘導体にも顕著な活性の減弱が見られた。これらの結果から、agosterol A の活性発現には分子内の 3 個のアセチル基と 2 個の水酸基のいずれもが重要であることが明らかになった。

Agosterol A は、非常に低濃度で多剤耐性がん細胞の耐性を克服でき、しかも低毒性であることから耐性克服薬のリード化合物として期待される。また、現在 MRP 1 を過剰発現する多剤耐性株の耐性を克服できる化合物は少数しか発見されておらず、MRP1 の分子機構の解明のための新しい知見が agosterol A によって得られることが期待される。

論文審査の結果の要旨

抗がん剤を用いた化学療法において、「がんの多剤耐性」という現象が臨床的にしばしば認められ、がん治療の大きな障害となっている。がん細胞が多剤耐性を獲得するメカニズムの中で、P-gp や MRP1 と呼ばれる薬剤排出膜タンパク質が関わる耐性獲得機構があり、これらの薬剤排出膜タンパク質の機能を阻害できる化合物は、抗がん剤と併用することにより、多剤耐性がんに対して化学療法の効果を回復できる可能性を秘めている。

著者は、新しいがん多剤耐性克服物質を探索する目的で、簡便なアッセイ法を構築し、種々の海洋生物の抽出エキスをスクリーニングした。P-gp を過剰発現するヒト咽頭上皮がん細胞 KB-C2 株および MRP1 を過剰発現する KB-CV60株の 2 種の多剤耐性がん細胞を用いるスクリーニングで、三重県英虞湾で採集した *Spongia* 属海綿のアセトン抽出エキスに耐性克服作用がみられ、その活性本体を明らかにするために活性試験の結果を指標に分画精製して、主活性物質として agosterol A と命名した新規ステロールを単離した。そして、主成分の agosterol A の他、6 種の類縁体を得、それらの化学構造を 2D-NMR を中心とする機器分析および化学反応によって決定している。

次に、agosterol A の多剤耐性克服作用について検討した。Agosterol A は KB-C2 株の colchicine に対する耐性と KB-CV60株の vincristine 耐性を完全に克服した。さらに、耐性株での細胞内 vincristine 蓄積濃度は親株の KB-3-1 株の約40%まで低下していたが、agosterol A を作用させると用量依存的に上昇することを明らかにした。また、耐性株では親株の KB-3-1 株に比べて速やかに vincristine が排出されるが、agosterol A 存在下では親株と同程度まで

vincristine の排出が抑制されることを明らかにし、これらの結果から、agosterol A は多剤耐性がん細胞の薬剤排出膜タンパク質に作用し、その薬剤排出を阻害して細胞内抗がん剤濃度を高めることを確認している。

今回得られた agosterol A の類縁体や化学反応により得た誘導体についてその耐性克服作用を検討した結果、agosterol A の活性発現には分子内の 3 個のアセチル基と 2 個の水酸基のいずれもが重要であることを明らかにしている。

Agosterol A は、低濃度で多剤耐性がん細胞の耐性を克服でき、しかも低毒性であることから耐性克服薬のリード化合物として期待される。また、現在 MRP1 を過剰発現する多剤耐性株の耐性を克服できる化合物は少数しか発見されておらず、MRP1 の薬物排出の分子機構を解明するのためのツールとしても期待される。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。