

エルゴステロールパーオキサイドを用いた医薬素材の開発

山 岸 和 敏 [株式会社スリービー／研究員]
賀 佐 伸 省 [札幌医科大学／教授]
加 藤 和 則 [札幌医科大学／准教授]
富 山 隆 広 [株式会社スリービー／品質管理室長]

背景・目的

エルゴステロールパーオキサイド(EP)はキノコを含む真菌類に多く見られるステロイド化合物である(図1)。哺乳類培養細胞を用いた研究により、EPは正常細胞に影響しない濃度で腫瘍細胞の増殖抑制効果を示す事が報告されている(Bok *et al.*, 1999; Kobori *et al.*, 2007; Takei *et al.*, 2005)。その作用機序は活性酸素生成によるアポトーシス誘導である事が示唆されている(Takei *et al.*, 2005)。しかしながら、解析に用いられた腫瘍細胞の種類は限られ、また *in vivo* での腫瘍増殖抑制効果については報告例が乏しく(松枝ら, 1982)、将来のヒト臨床試験と実用化へ向けた必須課題となっている。

タモギタケ子実体における EP は新鮮重量当たり 0.005 % と含有率が低い。実用・汎用化のためには効率的な生産技術の開発による低価格化が必須である。一方、菌糸体による生産は子実体に比べエネルギーコストを抑えられるだけではなく物質生産制御も容易だが、EP の生産技術はもとよりタモギタケの培養系も確立されていない。

本研究ではタモギタケより抽出・精製した EP のヒト腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにする事、効率的な抽出・精製技術と量産化技術を開発する事、結果として悪性腫瘍の予防と治療を目的とした医薬素材の開発と生産に結びつける事を目的とした。

内容・方法

子実体からの効率的な精製方法を開発した。乾燥子実体のエタノール抽出物に含まれる油脂をけん化した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより EP を精製した。

新たな量産化技術として、菌糸体の培養系を確立した。菌糸体を種々の培養液組成と培養環境において培養後、EP 含有量を測定した。

ヒト腫瘍細胞に対する増殖抑制効果を検討した。THP-1(ヒト急性骨髄性白血病細胞株)、Ramos(ヒト B 細胞性リンパ腫)、MCF7(ヒト乳癌細胞株)、SK-OV3(ヒト卵巣癌細胞株)はいずれも RPMI1640 培地(10%FCS、抗生物質、ピルビン酸ナトリウム添加)にて継代培養し実

験に使用した。EP は DMSO 溶液にて 1mg/ml の濃度に調製して溶解した。各細胞は 1×10^4 個/ml に調製し、96 穴プレートに 100 μ L/well で添加し、各濃度(0.1~100 μ g/ml)に調製した EP 溶液を 100 μ L/well で添加し、CO₂ インキュベーター中で培養した。3~5 日間培養後に細胞増殖を WST1 法にて測定した。

結果・成果

子実体からの EP 精製は、多量の油脂のため精製に労力を要するが、けん化による前処理とカラム精製により比較的容易にグラムオーダーでの純品精製が可能となった。けん化反応により油脂を脂肪酸へ分解し、既存の油脂とクロマトグラフィー上で異なる挙動を促す事により、EP の分離操作が容易になった。今後の実用化のためには、実験プラントレベルでの生産技術を確立していく必要がある。

精製過程で EP と似た挙動を示す 2 化合物の構造を解析した所、EP のグルコース配糖体(Glc-EP)と EP の異性体 Ergosta-7,9(11), 22-trien-3, 5, 6-triol(化合物 1)と同定された(図 1 と図 2)。Glc-EP には EP と同等、或いはそれ以上の腫瘍細胞増殖抑制効果を示す事が報告されており(Bok *et al.*, 1999)、今後、構造活性相関を研究する上で有用な素材となる。一方、化合物 1 はマイタケからの単離が報告されているが(Ishizuka *et al.*, 1997)、生理活性に関する報告はなく、EP と同様に腫瘍細胞に対する効果を解析する予定である。

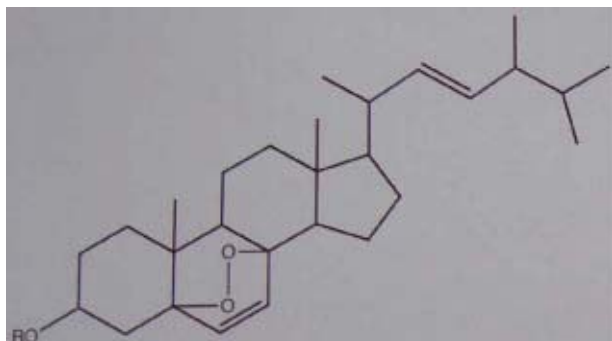
菌糸体培養では増殖を指標にした培地選択を行い、培地 1 L 当たり約 24 g の乾燥菌糸体を得る事ができた。EP の含有量は、培地組成と培養環境を変えても変化が見られなかった。ところが、Glc-EP は改変培地を用いる事により約 10 倍の増加を示した。これは子実体での含有率をも上回っており、Glc-EP 生産における菌糸体培養の有効性が明らかとなった。今後、更なる効率的生産のためには、生合成経路の解明とそれに基づいた代謝制御技術の開発が有効と考えられる。

EP をヒト腫瘍細胞株に各種濃度で添加し培養した。その結果は以下の通りであった。

- 1) ヒト血液系腫瘍細胞株 THP-1, Ramos に対しては EP 添加により濃度依存的な増殖抑制効果が観察された。有為な抑制効果は 2 μ g/ml(THP-1)、1 μ g/ml(Ramos)から認められた。
- 2) ヒト乳癌細胞株 MCF7、卵巣癌細胞株(SK-OV3)に対しては高濃度(10 μ g/ml 以上)で増殖抑制傾向が認められたが、血液系腫瘍株に比べるとその程度は軽度であった。
- 3) EP の抗腫瘍効果をヒト腫瘍担癌モデルマウスで検討するために免疫不全マウス(KSN-ヌード)の皮下に上記腫瘍株を接種したが EP 非投与群でも生着しなかつ

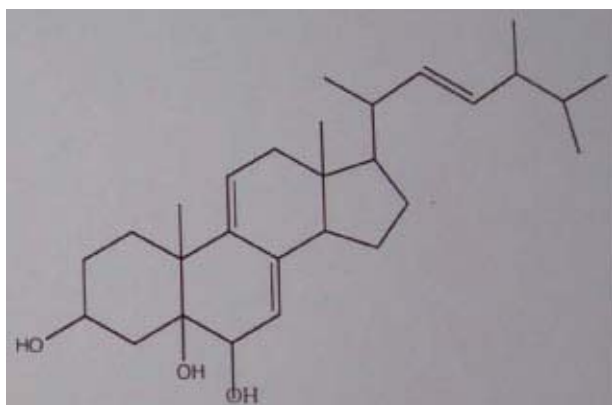
たため、現在他の腫瘍細胞株の検討を行っている。

EPのヒト腫瘍細胞株に対する *in vitro* での増殖抑制効果を本研究で観察できたので、今後 *in vivo* 投与におけるヒト腫瘍移植モデルマウスでの抗腫瘍効果を明らかにしたい。



R=H エルゴステロールパーオキシド
R=βGlc グルコース配糖体

図1 エルゴステロールパーオキシドとその配糖体の構造式



Ergosta-7, 9(11), 22-trien-3, 5, 6-triol

図2 化合物1の構造式

今後の展望

マウスを用いた *in vivo* 試験の基礎データの取得と安全性試験を経た上で、動物病院外来の中型動物(イヌ、ネコ等)における悪性腫瘍の臨床試験を行い、動物用途素材の開発を目指す。さらに、ヒト臨床試験により抗腫瘍効果を明らかにし、医薬素材の開発を目指す。

医薬品の開発へ貢献するため、製薬・試薬メーカーへ素材を供与し、共同開発へ繋げる。将来的には、産学官での共同研究体制をさらに拡充し、キノコ由来医薬素材の事業化を積極的に進めたい。