(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5765687号
(P5765687)

(45)発行日　平成27年8月19日(2015.8.19)　(24)登録日　平成27年6月26日(2015.6.26)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 31/404	(2006.01)	A61K	31/404	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105
A61K 36/02	(2006.01)	A61K	35/80	

請求項の数 2　(全 10 頁)

(21)出願番号　特願2012-167744(P2012-167744)
(22)出願日　平成24年7月27日(2012.7.27)
(65)公開番号　特開2014-24813(P2014-24813A)
(43)公開日　平成26年2月6日(2014.2.6)
審査請求日　平成26年3月26日(2014.3.26)

(73)特許権者　593206964
マイクロアルジェコーポレーション株式会社
岐阜県岐阜市曙町４－１５
(73)特許権者　304019399
国立大学法人岐阜大学
岐阜県岐阜市柳戸１番１
(73)特許権者　000125347
学校法人近畿大学
大阪府東大阪市小若江３丁目４番１号
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オートファジー性細胞死誘導剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
還元型スキトネミンを有効成分として含有するオートファジー性細胞死誘導剤（ただし、還元型スキトネミンをイシクラゲ抽出物として含有し、かつ抗ウイルス剤又は飲食品として適用される場合を除く。）。
【請求項２】
前記還元型スキトネミンはイシクラゲ由来であることを特徴とする請求項１に記載のオートファジー性細胞死誘導剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、還元型スキトネミンを含有するオートファジー性細胞死誘導剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
オートファジーは、細胞内におけるタンパク質の分解機構の一つであって、酵母からヒトにいたるまでの真核生物に見られる機構である。オートファジーが誘導されると、オートファゴソームと呼ばれる膜胞が形成される。次いで、オートファゴソームがリソソームと融合することにより、オートファゴソーム内に取り込まれたタンパク質が分解される。
【０００３】
オートファジーは、一般的には細胞が飢餓状態に陥ることによって誘導されるが、発生

、分化等の生理機能や、細胞内に侵入したウイルスの排除等の感染防御機能にも関与することが明らかになってきている。そのため、オートファジーの制御は、癌治療やウイルス感染防御の分野に応用できる可能性があるとして、近年、注目されている。例えば、特許文献１には、特定のアミノ酸配列を有するペプチドに、オートファジー性細胞死を誘導する効果があることが開示されている。なお、オートファジー性細胞死とは、プログラム細胞死の１タイプ（タイプ２細胞死）であって、オートファジーを伴う細胞死である。

【０００４】

一方、スキトネミン（Scytonemin）は、特定のシアノバクテリアに含有されている物質である。近年、スキトネミンに細胞の増殖を抑制する作用があることが報告されている（非特許文献１参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００５】

【特許文献１】国際公開２００９／１１９６６２号パンフレット

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Stevenson S. C., Capper A. E., Roshak K. A., Marquez B., Eichman C., Jackson R. J., Mattern M., Gerwick H. W., Jacobs S. R., Marshall A. L. (2002). The Identification and Characterization of the Marine Natural Product Scytonemin as a Novel Antiproliferative Pharmacophore. J. Pharmacol. Exp. Ther., 303, 858-866.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明者らは、鋭意研究の結果、イシクラゲから単離した還元型スキトネミンについて、細胞の増殖抑制作用を有するとともに、その増殖抑制作用がスキトネミンよりも大きいことを見出した。また、還元型スキトネミンの増殖抑制作用がオートファジー性細胞死の誘導によるものであることを見出した。

【０００８】

この発明は、上記の知見に基づいてなされたものであり、本発明の目的は、オートファジー性細胞死を誘導するオートファジー性細胞死誘導剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

上記の目的を達成するために請求項１に記載のオートファジー性細胞死誘導剤は、還元型スキトネミンを有効成分として含有する。ただし、還元型スキトネミンをイシクラゲ抽出物として含有し、かつ抗ウイルス剤又は飲食品として適用される場合を除く。

請求項２に記載のオートファジー性細胞死誘導剤は、請求項１に記載の発明において、前記還元型スキトネミンはイシクラゲ由来である。

【発明の効果】

【００１０】

本発明のオートファジー性細胞死誘導剤によれば、オートファジー性細胞死を誘導することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】還元型スキトネミンの単離工程の説明図。

【図２】還元型スキトネミン及びスキトネミンによる細胞増殖抑制効果を示すグラフ。

【図３】還元型スキトネミン処理時におけるＬＣ３のウエスタンブロット解析結果。

【図４】還元型スキトネミン処理時におけるＡｋｔのウエスタンブロット解析結果。

【発明を実施するための形態】

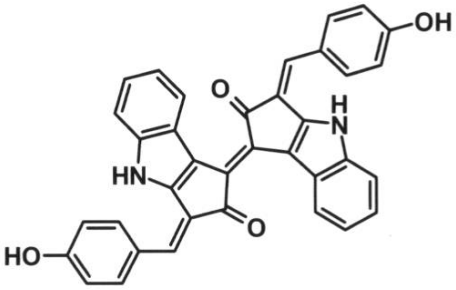
【００１２】

以下、本発明を具体化した実施形態のオートファジー性細胞死誘導剤を詳細に説明する。

本実施形態のオートファジー性細胞死誘導剤に有効成分として含有される還元型スキトネミンは、下記一般式（１）に示される構造を有する。

【００１３】

【化１】



・・・（１）

還元型スキトネミンは、高いオートファジー性細胞死誘導作用を有する。例えば、還元型スキトネミンを癌細胞に投与した場合には、癌細胞のオートファジー性細胞死が誘導されて、癌細胞の増殖が抑制される。

【００１４】

また、還元型スキトネミンは、オートファジーの進行に関与する因子であるＬＣ３レベルを増大させる作用を有する。ＬＣ３はオートファジーにおけるオートファゴソームの形成に関与するタンパク質であり、オートファゴソームへの移行に際して前駆型であるＬＣ３－Ｉから活性型であるＬＣ３－ＩＩへと変換（修飾）される。還元型スキトネミンを投与することにより、ＬＣ３レベルが増大するとともに、ＬＣ３－ＩからＬＣ３－ＩＩへの変換が促進される。

【００１５】

また、還元型スキトネミンは、オートファジーの抑制に関与する因子であるＡｋｔレベルを低下させる。オートファジーは、ｍＴＯＲが活性化しているときには誘導が抑制される。そして、ｍＴＯＲはＰＩ３Ｋ／Ａｋｔを介したリン酸化カスケードにより活性化される。上記還元型スキトネミンを投与することにより、ｍＴＯＲの活性化に関与するＡｋｔレベルが低下する。

【００１６】

よって、還元型スキトネミンを含有するオートファジー性細胞死誘導剤は、細胞のオートファジー性細胞死を誘導することができる。オートファジーは、発生、分化等の生理機能や、細胞質内に侵入したウイルスの排除等の感染防御機能にも関与する機構である。そのため、オートファジー性細胞死誘導剤は、癌治療（例えば、細胞増殖抑制剤）やウイルス感染防御（抗ウイルス剤）の分野への適用が期待できる。また、オートファジー性細胞死誘導剤は、ＰＩ３Ｋ／Ａｋｔ／ｍＴＯＲ経路の阻害剤としての適用も期待できる。

【００１７】

オートファジー性細胞死誘導剤は、例えば健康食品や食品等の飲食品等の添加剤、医薬品、及び医薬部外品として有用である。オートファジー性細胞死誘導剤は液状であってもよいし、固体状であってもよい。それらの剤形としては、特に限定されないが、例えば散剤、粉剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、液剤等が挙げられる。また、本発明の目的を損なわない範囲において、賦形剤、基剤、乳化剤、安定剤、溶剤、香料、甘味料等の添加剤を配合してもよい。

【００１８】

また、オートファジー性細胞死誘導剤に含有される還元型スキトネミンとしては、例えば天然素材由来の精製品、生化学品、及び化学合成品を適用することができる。天然素材からの精製品を適用する場合、天然素材原料としては、例えば、シアノバクテリア（藍色細菌）、ネンジュモ科ネンジュモ属の陸生藍藻の一種であるイシクラゲ（Nostoc commune）を挙げることができる。そして、還元型スキトネミンは、イシクラゲを原料として抽出

工程及び単離工程を行うことにより得ることができる。以下、イシクラゲから還元型スキトネミンを得る方法について記載する。

【００１９】

原料となるイシクラゲは、天然に自生する藻体であってもよいし、人工的に培養した藻体であってもよい。なお、安定供給が可能である点や品質保持が容易である点から、人工的に培養した藻体を用いることが工業的に好適である。また、原料としてのイシクラゲは採取したままの状態、採取後に破砕処理した状態、採取後に乾燥処理した状態、並びに採取後に破砕処理及び乾燥処理した状態のいずれの状態であってもよい。

【００２０】

抽出工程は、イシクラゲから還元型スキトネミンを含む抽出物を抽出する工程である。抽出工程に用いる抽出溶媒としては、水、親水性有機溶媒、又は水と親水性有機溶媒との混合溶媒を用いることができる。親水性有機溶媒としては、例えば、メタノールやエタノール等の低級アルコール類、アセトン、及び酢酸エチルが挙げられる。抽出方法としては、公知の抽出方法、例えば冷水抽出、温水抽出、熱水抽出、及び蒸気抽出のいずれの方法を用いてもよい。

【００２１】

抽出操作としては、抽出溶媒中にイシクラゲを所定時間浸漬させる。抽出操作においては、抽出効率を高めるべく、必要に応じて攪拌処理、加圧処理、及び超音波処理等の処理をさらに行ってもよい。抽出操作後、例えばろ過や遠心分離等の公知の分離法を用いて固液分離操作を行うことにより、抽出液と原料の残渣とを分離する。このとき、必要に応じて得られた抽出液（抽出物）の濃縮を行う。

【００２２】

単離工程は、抽出工程にて得られた抽出物中に含まれる還元型スキトネミンを単離・精製する工程である。還元型スキトネミンは、上記抽出物を１又は２以上のクロマトグラフィを用いて精製することにより単離される。クロマトグラフィとしては、公知のクロマトグラフィ、例えば液体クロマトグラフィ、超臨界流体クロマトグラフィ、及び薄層クロマトグラフィを用いることができる。液体クロマトグラフィとしては、例えばカラムクロマトグラフィを用いることができ、より具体的には高速液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）及びオープンカラムクロマトグラフィを挙げることができる。クロマトグラフィ担体としては、例えばイオン交換クロマトグラフィ、分配クロマトグラフィ（順相・逆相クロマトグラフィ）、吸着クロマトグラフィ、及び分子排斥クロマトグラフィが挙げられる。分配クロマトグラフィとして、より具体的にはシリカゲル担体やＯＤＳ担体を用いることが分離効率の観点から好ましい。

【００２３】

上記各種クロマトグラフィを適宜組み合わせて、公知の使用方法で上記還元型スキトネミンを単離・精製することができる。上記各種クロマトグラフィの使用方法としては、公知の方法を適宜採用することができる。上記還元型スキトネミンの同定は、構造決定により、又は精製品を指標とすることにより行うことができる。

【００２４】

次に、本実施形態における効果について以下に記載する。

（１）オートファジー性細胞死誘導剤は、還元型スキトネミンを有効成分として含有する。上記構成によれば、オートファジー性細胞死を誘導することができる。

【００２５】

（２）好ましくは、還元型スキトネミンはイシクラゲ由来である。上記構成によれば、イシクラゲに含まれる天然成分であることから、より副作用が少なく、生体に対してより安全に適用することができる。

【００２６】

なお、本実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

・　オートファジー性細胞死誘導剤は、還元型スキトネミンを単離・精製した状態で含有する構成に限らず、天然物の溶媒抽出物の状態で含有する構成であってもよい。例えば

、イシクラゲの溶媒抽出物を含有するオートファジー性細胞死誘導剤であってもよい。

【００２７】

次に、上記実施形態及び別例から把握できる技術的思想について記載する。

（イ）　還元型スキトネミンをイシクラゲの溶媒抽出物として含有する前記オートファジー性細胞死誘導剤。

【００２８】

（ロ）　還元型スキトネミンを有効成分として含有する細胞増殖抑制剤。

（ハ）　還元型スキトネミンの製造方法であって、水、親水性有機溶媒、又は水と親水性有機溶媒の混合溶媒を用いてイシクラゲから前記還元型スキトネミンを含む抽出物を抽出する抽出工程と、前記抽出物から前記還元型スキトネミンを単離する単離工程とを有する還元型スキトネミンの製造方法。

【実施例】

【００２９】

次に、実施例を挙げて上記実施形態をさらに具体的に説明する。

＜還元型スキトネミンの抽出・単離＞

イシクラゲの乾燥粉体（４００ｇ）にエタノール（４Ｌ）を添加して、室温にて２時間攪拌するとともに３０分間静置した後、上清を回収した。また、沈殿物に対して、エタノール（４Ｌ）を添加して、室温にて２時間攪拌するとともに３０分間静置した後、上清を回収した。この沈殿物に対する再抽出操作を合計１０回繰り返した。得られた全ての上清をろ紙によりろ過するとともに、そのろ液を減圧濃縮することにより、イシクラゲ抽出物（２０ｇ）を得た。

【００３０】

イシクラゲ抽出物に対して、複数のクロマトグラフィによる分画を組み合わせて行うことにより還元型スキトネミンの単離を行った。図１を参照して、還元型スキトネミンの単離工程について説明する。

【００３１】

イシクラゲ抽出物（１８ｇ）について、中性シリカゲルを用いた吸引液体クロマトグラフィを行うことにより８画分に分画し、ＴＬＣによる標品との比較に基づいて還元型スキトネミンが含有される画分（ＮＣ－５）を回収した。画分ＮＣ－５について、中性シリカゲルを用いた液体カラムクロマトグラフィを行うことにより５画分に分画し、ＴＬＣによる標品との比較に基づいて還元型スキトネミンが含有される画分（ＮＣ－５－４、ＮＣ－５－５）を回収した。

【００３２】

画分ＮＣ－５－４について、更に中性シリカゲルを用いた液体カラムクロマトグラフィを行うことにより６画分に分画した。また、画分ＮＣ－５－５について、更に中性シリカゲルを用いた液体カラムクロマトグラフィを行うことにより４画分に分画した。そして、ＴＬＣによる標品との比較に基づいて還元型スキトネミンが含有される画分（ＮＣ－５－４－４，ＮＣ－５－４－５，ＮＣ－５－５－３）を回収するとともに、これらを一つに合わせて画分ＮＣ－５－Ａとした。

【００３３】

画分ＮＣ－５－Ａについて、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　ＬＨ－２０を用いた液体カラムクロマトグラフィを行うことにより８画分に分画した。そして、ＴＬＣによる標品との比較に基づいて還元型スキトネミンが含有される画分（ＮＣ－５－Ａ－７）を回収するとともに、その画分ＮＣ－５－Ａ－７について、ＯＤＳ担体を用いた液体カラムクロマトグラフィを行うことにより還元型スキトネミンを単離した。

【００３４】

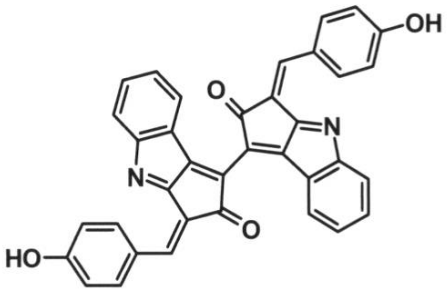
＜細胞増殖抑制試験＞

理化学研究所より入手したヒト白血病Ｔ細胞株Ｊｕｒｋａｔ細胞を、１０％牛胎児血清を含んだＲＰＭＩ１６４０培地（和光純薬工業株式会社製）にて、９５％空気－５％CO_2環境下で培養した。その後、Ｊｕｒｋａｔ細胞を１×１０５ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し

、これを２４ウェルマルチプレートに５００μＬずつ播種した。２時間後、ジメチルスルフォキシド（ＤＭＳＯ）に溶解させた還元型スキトネミンを終濃度が１．０，２．５，５．０μＭとなるように各ウェルに添加して、培養を継続した。そして、還元型スキトネミンの添加後、２４，４８，７２時間における細胞数を血球計算盤により計数した。また、比較例として、還元型スキトネミンに代えて下記一般式（２）：

【００３５】

【化２】



・・・（２）

に示すスキトネミンを添加して同様の試験を行った。それらの結果を図１のグラフに示す。

【００３６】

なお、図１のグラフ中のコントロール（ｃｏｎｔｒｏｌ）は被検サンプルと同量のＤＭＳＯにより処理した細胞を示す。また、同グラフ中の各プロットは平均値±標準誤差（ｎ＝６）を示している。

【００３７】

図２に示すように、還元型スキトネミンを投与した場合には、還元型スキトネミンの濃度依存的に細胞の増殖が抑制されている。また、還元型スキトネミンが有する細胞増殖抑制作用は、スキトネミンが有する細胞増殖抑制作用と比較して大きいものである。

【００３８】

＜ＬＣ３・Ａｋｔのウエスタンブロット解析＞

Ｊｕｒｋａｔ細胞を１×１０５ｃｅｌｌｓ／ｍＬに調整し、６ウェルマルチプレートに３ｍＬずつ播種した。播種後、還元型スキトネミンを終濃度が５．０μＭとなるように添加し、各ウェルの培養時間（処理時間）を異ならせつつ培養を行った。培養後、各細胞を遠心分離機（３，０００ｒｐｍ、１０分、４℃）にてそれぞれ回収した。回収した細胞をＰＢＳ（－）にて洗浄した後、２％Ｐｒｏｔｅａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｅｒ、２％Ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ含有ＲＩＰＡ Ｂｕｆｆｅｒ（２５ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．６），１５０ｍＭ ＮａＣｌ，１％ＮＰ－４０，１％ｓｏｄｉｕｍ ｄｅｏｘｙｃｈｏｌａｔｅ，０．１％ＳＤＳ）を用いて細胞を溶解するとともに、超音波砕機を用いて細胞を破砕した。細胞破砕液に対して遠心分離処理（１３，０００ｒｐｍ、５分間、４℃）を行い、上清を回収した。得られた上清のタンパク質濃度を所定濃度に調整した後、１０％メルカプトエタノール含有サンプルバッファーを加えて９８℃で５分間加熱し、これをサンプル溶液とした。

【００３９】

各サンプル溶液中に含まれるタンパク質を１０～１５％ＳＤＳ－ＰＡＧＥにて分離するとともに、これをＰＶＤＥ（Ｐｏｌｙｖｉｎｙｌｉｄｅｎｅ ｄｉｆｌｕｏｒｉｄｅ）膜に転写した。ＰＶＤＥ膜を０．１％Ｔｗｅｅｎ２０含有トリス緩衝化生理食塩水により溶解した５％脱脂粉乳溶液に浸して１時間のブロッキングを行った後、ＬＣ３又はＡｋｔの一次抗体を加え、４℃にて一晩振とうした。その後、洗浄処理を行うとともに二次抗体を加え、１時間振とうした。ＰＶＤＥ膜上の抗原－抗体複合体を、ＥＣＬ Ｐｌｕｓキット（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社製）で５分間処理することにより化学発光させるとともに、その化学発光を化学光検出装置（Ｄａｖｉｎｃｈ－Ｃｈｅｍｉ、和光純薬株式会社製）を用いて検出した。その結果を図３及び４に示す。

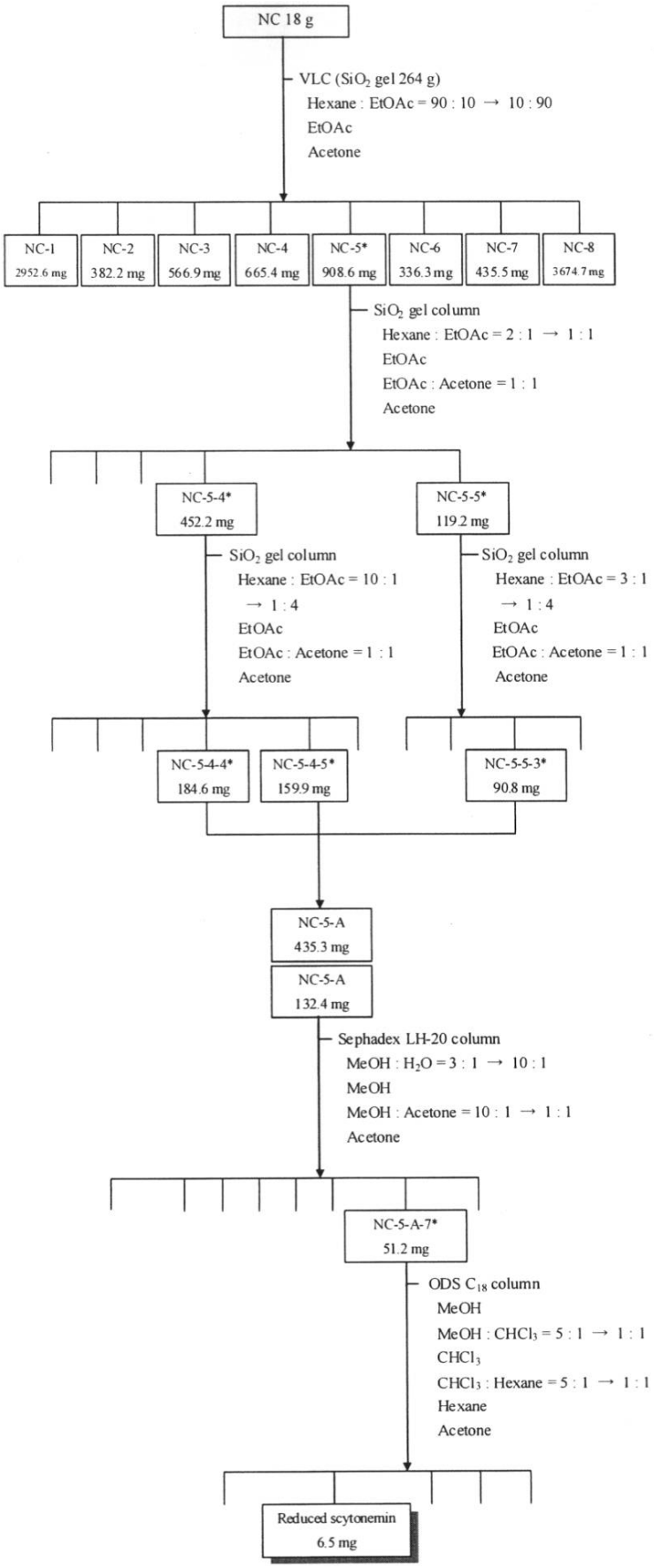
【００４０】

図３に示すように、還元型スキトネミンの投与後、特に６～１２時間後において、オートファジーの進行に関与する因子であるＬＣ３レベルが増大するとともに、ＬＣ３－ＩからＬＣ３－ＩＩへの修飾が促進されている。また、図４に示すように、還元型スキトネミンの投与後、オートファジーの抑制に関与する因子であるＡｋｔレベル、具体的には、Ａｋｔ及びその活性型であるリン酸化Ａｋｔのレベルが共に低下している。これらの結果から、還元型スキトネミンは、オートファジー性細胞死を誘導する作用を有し、その作用に基づいて細胞の増殖を抑制しているものと考えられる。

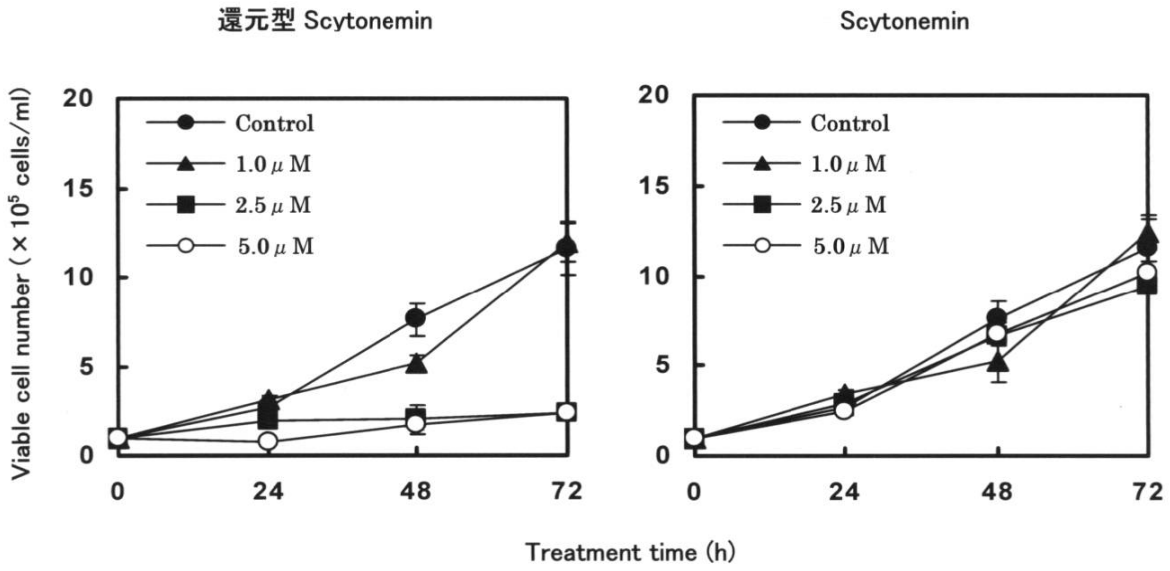
【００４１】

なお、詳細な記載は省略するが、各種Ｃａｓｐａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒの存在下において、上記と同様にして還元型スキトネミンによる細胞増殖抑制試験を行ったところ、Ｃａｓｐａｓｅ　ｉｎｈｉｂｉｔｏｒによる細胞増殖抑制の阻害作用は確認できなかった。また、還元型スキトネミン処理時におけるＤＮＡの状態を観察したところ、ＤＮＡの断片化は確認できなかった。これらの結果から、還元型スキトネミンが有する細胞増殖抑制作用は、アポトーシスに起因するものではないことが示唆される。

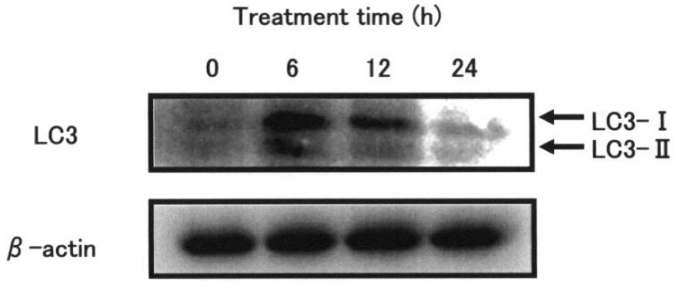
【図１】


NC 18 g
VLC (SiO_2 gel 264 g)
Hexane : EtOAc = 90 : 10 → 10 : 90
EtOAc
Acetone
NC-1 2952.6 mg
NC-2 382.2 mg
NC-3 566.9 mg
NC-4 665.4 mg
NC-5* 908.6 mg
NC-6 336.3 mg
NC-7 435.5 mg
NC-8 3674.7 mg
SiO_2 gel column
Hexane : EtOAc = 2 : 1 → 1 : 1
EtOAc
EtOAc : Acetone = 1 : 1
Acetone
NC-5-4* 452.2 mg
NC-5-5* 119.2 mg
SiO_2 gel column
Hexane : EtOAc = 10 : 1 → 1 : 4
EtOAc
EtOAc : Acetone = 1 : 1
Acetone
SiO_2 gel column
Hexane : EtOAc = 3 : 1 → 1 : 4
EtOAc
EtOAc : Acetone = 1 : 1
Acetone
NC-5-4-4* 184.6 mg
NC-5-4-5* 159.9 mg
NC-5-5-3* 90.8 mg
NC-5-A 435.3 mg
NC-5-A 132.4 mg
Sephadex LH-20 column
MeOH : H_2O = 3 : 1 → 10 : 1
MeOH
MeOH : Acetone = 10 : 1 → 1 : 1
Acetone
NC-5-A-7* 51.2 mg
ODS C_{18} column
MeOH
MeOH : $CHCl_3$ = 5 : 1 → 1 : 1
$CHCl_3$
$CHCl_3$: Hexane = 5 : 1 → 1 : 1
Hexane
Acetone
Reduced scytonemin 6.5 mg

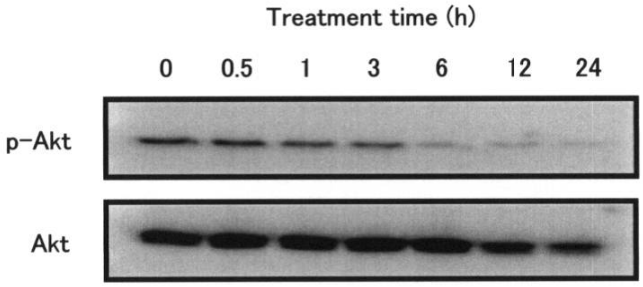
【図２】


還元型 Scytonemin
Scytonemin
Viable cell number (×10⁵ cells/ml)
Control
1.0 μ M
2.5 μ M
5.0 μ M
0
5
10
15
20
0
24
48
72
Treatment time (h)

【図３】


Treatment time (h)
0
6
12
24
LC3
LC3- I
LC3- II
β -actin

【図４】


Treatment time (h)
0
0.5
1
3
6
12
24
p-Akt
Akt

フロントページの続き

(72)発明者　纐纈　守
岐阜県岐阜市柳戸１番１　国立大学法人岐阜大学　内
(72)発明者　伊藤　智広
奈良県奈良市中町３３２７－２０４　学校法人近畿大学　農学部　内
(72)発明者　竹中　裕行
岐阜県岐阜市曙町４－１５　ＭＡＣ総合研究所　内

審査官　石井　裕美子

(56)参考文献　特開２００９－２０３１６８（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３１／４０４
Ａ６１Ｋ　３６／０２
Ａ６１Ｐ　３５／００
Ａ６１Ｐ　４３／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）