

The Third Symposium on Pharmaceutical Food Science

O-05

「Fundamental and progressive findings of Brazilian herb plant, Taheebo, *Tabebuia avellanedae*」 ブラジル産薬用植物由来タヒボの基礎的新知見

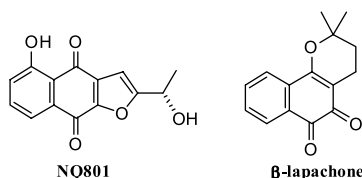
Akira Iida (Faculty of Agriculture, Kinki University), Mitsuaki Yamashita and Masafumi Kaneko (Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare), Shoji Hirata (Hirata Clinic for Oral and Maxillofacial Surgery and Medical Oncology Cancer Care Village Sapporo), Harukuni Tokuda and Nobutaka Suzuki (Kanazawa University, Graduate School of Medical Science)

ノウゼンカズラ科植物 *Tabebuia avellanedae* (タヒボ) は、ブラジル北部からアルゼンチン北部に至るいわゆる南米アマゾン地域に植生する樹高20～30mにもなる大木で、その幹は水にも沈むほど堅牢な樹木として知られている。この樹木の厚さわずか7mmの内地部分は、遠くインカの時代より種々の疾患に効能がある伝承薬用植物として用いられてきたことから、現在、その有益性に関する研究が広く行われている。我々は20年近く前より、*T. avellanedae* のもつ生物活性、なかでも特にがんに対する有効性を明らかにすべく研究を続け、ナフトキノンNQ801^{1, 2)}を発がん抑制物質として特定した。その後わが国でも、一般に健康茶の形態で提供され、多くの方々にその効能が理解され愛飲され続けている。

—昨年、*T. avellanedae* に含有される発がん抑制成分の一つである β -lapachoneがすでに米国におけるがん臨床試験でフェーズIIまで進んでいる事、また β -lapachoneが大量合成されていたことが判明した。現時点では、治療が困難とされるすい臓がん等に対して、特殊な形態での静脈投与が行われており、抗がん剤としての開発を目指しているものと思われる。

一方、同時期、タヒボの有用性をより高める目的で、我々がこれまで研究に用いてきた実際の市販品であるタヒボエキス(タヒボジャパン社提供)に、NQ801やその類縁体を有意に含有する粗抽出分画を新たに加えた、いわゆるデザイナーフードの形態をとった素材であるX6(バイシックス)(タヒボジャパン社提供)とよぶ市販品が開発された。また、 β -lapachoneより生物活性に優れたNQ801の化学合成^{3, 4)}も達成された。今回、X6とNQ801を試験試料として、それらのがんに対する抑制活性試験を行ったので、その結果について報告する。

これまで実際にかん疾患患者に使用された事例より、特にヒト由来の肺がん細胞であるA549と乳がん細胞であるMCF-7を用いて、X6の増殖抑制作用を調べた。細胞がシャーレに完全に付着した状態の基礎培地1mlに被験化合物を加え、3日間反応後、すべての細胞を蓄集し、特異的なトリパンブルーにて染色、その生存細胞を計測するとともに、その形態に関しても観察を行った。それぞれ3回の試験を行ったが、これまでのタヒボエキスと比較して約6倍の細胞増殖抑制作用を示した。細胞の形態は、通常の繊維芽細胞様から円状構造への明確な変化を示した。また、その割合はX6のほうが多く、さらに高濃度でより高くなる傾向が認められたことから、X6がこの2種のがん細胞に対して、高感受性であることが示唆された。さらにこの形態変化は殺細胞作用とは異なり、細胞分裂の抑制の一つの過程である細胞休止期を維持していると考えられる。それゆえ、実際の生体内でX6によって引き起こされると予想される種々の傷害は軽度であると考えられることから、X6は有用ながん予防薬となる可能性を秘めている。一方、NQ801の上記2種のがん細胞に対する作用を既存の5FUやマイトマイシンCのそれらと比較すると、その殺細胞能は弱いものの、顕著な細胞毒性は認められなかった。したがって、 β -lapachoneと同様、NQ801もまた医療への応用が期待できるものと考えている。



■English translation

The Bignoniaceae plant *Tabebuia avellanedae* (taheebo) is a large tree that reaches a height of 20-30 m, and a native of the so-called Amazon region of South America, which ranges from northern Brazil to northern Argentina. The tree is known for its very dense wood; the trunk sinks in water. Its inner bark, which is only about 7 mm thick, has been used in traditional medicine since the time of Incas for treating various diseases, and a wide range

of research on its usefulness is now in progress. For near 20 years, we have been studying *T. avellanedae* to examine its biological activity, particularly its effectiveness against cancer, and have identified the naphthoquinone NQ801^{1, 2)} as an anti-tumor promoting compound. Currently, Taheebo is available as a healthy beverage in Japan and its efficacy is acknowledged by many people who consume Taheebo.

The year before last, we knew that a clinical trial with β -lapachone, one of the anticancer components present in *T. avellanedae*, advanced to phase II in USA, and that β -lapachone was synthesized in bulk. Presently β -lapachone is administered intravenously, in a special form, to patients of intractable pancreatic cancer and it appears that this compound is planned to be developed as an anticancer drug.

Around the same time, a commercial product X6 (pronounced "by six", Taheebo Japan, Co.) was developed. X6 is a designer food that was prepared by adding a crude extract fraction containing significant amounts of NQ801 and its analogs to improve the effectiveness of the available commercial product Taheebo extract (Taheebo Japan, Co.), which we have been studying. Further, NQ801, which is biologically superior to β -lapachone, has also been successfully synthesized.^{3, 4)} We report herein anti-proliferative activity of X6 and NQ801. In addition, we also describe some clinical cases.

The anti-proliferative activity of X6 was examined using the human lung cancer cell line A549 and the human breast cancer cell line MCF-7. The test compound was added to 1 mL of basal medium at the stage when the cells were completely attached to the petri dish. After 3 days of reaction, all the cells were collected and stained with trypan blue, the viable cells were counted, and their morphology was observed. Three replicate tests were done in each case. The anti-proliferative effect of X6 was about 6 times that of the hitherto used Taheebo extract. The cell morphology showed a clear change from the usual fibroblast-like shape to a circular shape. The proportion of circular cells was higher with X6, and showed an increasing trend with increase in the X6 concentration used. These results suggested that X6 was more sensitive to these two types of cancer cells than Taheebo extract. Unlike cytotoxic action, this morphological change is believed to maintain the cells in the resting phase, one of the phases where cell division is suppressed. Therefore, it is expected that the different types of damage that X6 might cause *in vivo* would be mild. Thus, X6 has the potential to become a useful cancer preventive drug. We also compared the effect of NQ801 on the two cancer cell lines with that of current cancer drugs like 5FU and mitomycin C. Although NQ801 had a low level of cytotoxic activity, it had no pronounced cytotoxicity to normal human cells. Therefore, NQ801 also appears to be a promising substance for medical use as well as β -lapachone.

X6とNQ801の有意な細胞増殖抑制作用が確認できたことから、次に小動物であるマウスを用いた発がん抑制試験を行った。発がん抑制作用に関しては、世界的に認められ、かつ簡便に明確なデータが得られるマウス皮膚二段階発がん抑制試験を進めた。SENCARマウスの背部を剃毛し、1日後、その部位に発がんイニシエーションとしてDMBAのアセトン溶液を塗布、その1週間後に発がんプロモーターとして同部位にTPAを塗布する試験系で、発がんプロモーター塗布1時間前にTPA量の50倍のタビボエキシ、X6、NQ801をそれぞれ塗布し、溶剤であるアセトンのみを塗布する陽性コントロールと比較することで評価を行った。腫瘍の発生率と発生数から判断して、X6はタビボエキシより強い抑制効果を示した。また、NQ801はX6よりさらに顕著な抑制効果を示した。さらに、腫瘍の発生に関して遅延効果が認められ、この効果は生体において発がんに至る経過が少なくとも数年間、回避されることを示している。また、腫瘍の形態を陽性コントロールのそれと比較すると、腫瘍径が減少しており、生体を維持する能力が高いことを示した。このような結果から、現時点においては、タビボエキシは健康を志向する一般的なヒトを対象として、一方、X6は生体内にがんの症状を感じたヒトを対象として用いることを考えている。ヒトに対して有用なものとして伝承的にのみ膾炙された“もの”が、がん研究の最先端を行く米国において科学的手法により詳細な研究がおこなわれている事実は、我々が永年に亘り研究を続けてきたタビボという有用天然素材を次なるステップへ発展させる方向性を確実なものとした。その成果について、今回、若干の臨床例も報告する予定である。

参考文献

- 1) Ueda, S., Tokuda H. *Planta Med.*, 56, 669 (1990) 2) Ueda, S., Umemura, T., Dohguchi, K., Matsuzaki, T., Tokuda, H., Nishino, H., and Iwashima A. *Phytochemistry*, 36, 323 (1994) 3) Yamashita, M., Kaneko, M., Iida, A., Tokuda H., and Nishimura, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 6417 (2007) 4) Yamashita, M., Kaneko, M., Tokuda, H., Nishimura, K., Kumeda Y., and Iida, A. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 6286 (2009)

We could confirm that both X6 and NQ801 had significant antiproliferative activity. In the next step, we investigated *in vivo* anti-tumor promoting activity using two-stage mouse skin carcinogenesis test. In this study model, hair is shaved from the backs of SENCAR mice. One day after the shaving, an acetone solution of DMBA is applied for initiating cancer. One week later, TPA, a tumor promoter, is applied at the same site. In our study, Taheebo extract, X6, or NQ801, each 50 times the amount of TPA used, was applied to the site one hour before applying the tumor promoter, and the results were evaluated by comparison with a positive control in which acetone (solvent) alone was applied. Judging from the incidence of tumor formation among the mice, and the number of tumors, X6 had a stronger cancer preventive effect than Taheebo extract, and NQ801 had a more pronounced inhibitory effect than X6. Moreover, X6 had a delaying effect on tumor onset, which suggested that its use could result in a delay of tumor onset by several years. Compared to the positive control, the tumor size was small in the X6 treated animals, suggesting that it had a protective effect on the living body. Based on these results, we are considering the use of Taheebo extract generally for people who wish to improve their health, and X6 for treating people showing symptoms of cancer.

統合腫瘍学会～第6回 国際会議

■2009年11月12日～13日 米国ニューヨーク州・ニューヨーク

Society for Integrative Oncology-6th International Conference

「Chemopreventative components from Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*」 ブラジル産薬用植物タバブイア・アベラネダエに含有されるがん予防成分

Nobutaka Suzuki and Harukuni Tokuda (Kanazawa University, Graduate School of Medical Science), Mitsuaki Yamashita and Masafumi Kaneko (Faculty of Pharmacy, Takasaki University of Health and Welfare), Akira Iida (Faculty of Agriculture, Kinki University)

In our ongoing studies for chemopreventive active constituent from medicinal plants, Brazilian medicinal plant have been screened using the *in vitro* synergistic assay indicated by inhibitory effects on the induction of Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) by TPA. In this assay, *Tabebuia avellanedae* (TA) and its including compounds exhibited the potential inhibitory effects on EBV-EA activation without strong cytotoxicity on Raji cells. In our experiments, inhibitory effects of TA essence (TA ess.) and including naphthoquinone, NQ801 were same as that of curcumin, which is known anti-tumor promoting supplements. On the basis of the results by the *in vitro* assay, the inhibitory effects of these compounds were investigated in a two-stage carcinogenesis test of mouse skin papillomas using DMBA as an initiator and teleocidin as another type potential promoter. Teleocidin isolated from *Streptomyces mediocidicus* and also exerts a broad spectrum of biological effects in addition to tumor promoting activity *in vivo* with potencies equivalent to those of TPA. In the present work, TA ess. and NQ801 were topically applied for 1 hr. before the each promotion treatment, using teleocidin and showed inhibited mouse skin carcinogenesis promoted by indole alkaloids type compounds. These active potency were essentially identical with those produced by TPA and we thought that TA ess. and NQ801 also might be as potential as TPA in term of anti-tumor-promoting activity on mouse skin against teleocidin. This is the first finding to prove that usual medicinal plant may protect tumor promoting potency from microbiological product.

■日本語訳

薬用植物からのがん予防成分の研究過程で、ブラジル産薬用植物をTPAにより発現される試験管内試験法で検索したところ抑制作用を示した。

この試験法では、タバブイア・アベラネダエ (TA) とそこに含有される化合物は、Raji細胞で強い細胞毒性を示すことなく、がん予防作用が発現される。われわれの実験においてはTAのエッセンス (TA ess.) とそこに含有されるナフトキノ化合物、NQ801は、よく知られたがん予防サプリメントであるクルクミンと同様の活性を有する。この試験管内試験法の結果を基に、これらの化合物をDMBAを発がんイニシエーターとし、テレオシジンとよばれる他のタイプの発がんプロモーターを用いるマウス皮膚二段階発がん抑制試験を行った。テレオシジンはストレプトミセス・メジオリジカスから単離されて、幅広い抗菌性とともTPAと同程度の生物活性を示すものである。この実験ではTA ess.とNQ801を発がんプロモーターを塗布する1時間前に処理することで、インドールアルカロイドタイプの発がんプロモーターに対しても作用することが判明した。この抑制活性はTPAに対して同程度で、TA ess. とNQ801がテレオシジンに対しても効果を有することが示された。これは通常使用されている薬用植物が、微生物由来の発がんプロモーターに対しても有効であることを、始めて示したものである。