

氏 名 あはめど もはめど あぶでる らちふ もはめど たびら  
Ahmed Mohammed Abdel Latif Mohammed Tawila

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 345 号

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程  
薬科学専攻

学位論文題目 Highly potent antiausterity agents from *Callistemon* species  
from Egypt and their mechanism of action against  
the PANC-1 human pancreatic cancer cell line  
(エジプト産のカリステモン種からの強力な栄養飢餓耐性解除  
抗がん物質の探索とそれらのヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 に  
対する作用機序)

論文審査委員

(主査)	教 授	松谷 裕二
(副査)	教 授	森田 洋行 (指導教員)
(副査)	准教授	渡辺 志朗
(副査)	准教授	Suresh Awale

# Highly potent antiausterity agents from *Callistemon* species from Egypt and their mechanism of action against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line

Ahmed Mohammed Tawila  
Natural Drug Discovery Lab  
Institute of Natural Medicine  
University of Toyama

Pancreatic cancer is a major leading cause of mortality with the lowest five-year survival of 9%. It was ranked as the third and fifth leading cause of cancer-related death in Japan in the year 2019, with an annual mortality rate of nearly 35,000 persons. The majority of pancreatic cancer patients at the time of diagnosis possess metastatic colonies in the duodenum, stomach, and liver, making corrective surgery almost impossible. The prognostic outcome of chemotherapeutic agents in pancreatic cancer is poor due to its intrinsic resistance to almost all agents in clinical use. Therefore, there is a desperate need to find effective new chemotherapeutic agents for pancreatic cancer.

Cancer cells grow and proliferate in an aggressive manner, which requires an excessive nutrient supply for the cells. The majority of tumors form new blood vessels within their microenvironment for the effective supply of nutrients, a process termed as 'angiogenesis'. Unlike other tumors, pancreatic tumors have poor blood supply. However, pancreatic tumor cells can overcome these harsh conditions of hypoxia and starvation through modulation of their energy metabolism, which lead to acquiring tolerance to nutrition starvation, a phenomenon termed as "austerity". The search for new agents that inhibit the ability of pancreatic cancer cells to tolerate nutrition starvations is a promising approach in anticancer drug discovery.

In the present study, plant extracts from Egypt were screened for their preferential cytotoxic activity against the PANC-1 human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions. Among these, *Callistemon citrinus* and *Callistemon subulatus* (Myrtaceae) showed strong preferential cytotoxicity. The phytochemical investigation of the active extracts was carried out in order to identify the active constituents responsible for the preferential cytotoxic activities.

## 1. Chemical constituents of *Callistemon citrinus* extract

*Callistemon citrinus* is a small tree native to Australia and cultivated in Egypt as ornamentals. Traditionally, it is used for treating hemorrhoids, gastrointestinal, and respiratory disorders. The phytochemical investigation of *C. citrinus* leaf extract resulted in the isolation of seven new compounds, callistrilones L–Q (**1–6**) and epicallistrilone Q (**7**), together with twenty-two previously reported compounds.<sup>1–4</sup> The <sup>1</sup>H NMR spectrum of **1** displayed a pair of signals in a ratio of 4:1, suggesting the possibility of the presence of two isomers. Further purification of the compound by semi-preparative HPLC resulted in isolation of two peaks. Each peak displayed a pair of signals in <sup>1</sup>H NMR spectrum which resemble d the original mixture. Repeated HPLC separation of these two peaks resulted in a reproducible chromatogram of two peaks at similar retention time, suggesting the presence of this compound as a mixture of two equilibrating conformational isomers. Callistrilone L (**1**) displayed two different sets of NOESY correlations around C-7 suggesting a change in interproton

distance due the presence of the two conformations. The absolute configuration was assigned using theoretical calculations of ECD spectrum and the specific optical rotation.<sup>1</sup> Compounds **2–5** were also isolated as mixture of conformational isomers for each. However, **2–5** differ mainly from **1** in the way of attachment of the  $\alpha$ -phellandrene to the acylated phloroglucinol ring. In callistrilone L (**1**), the  $\alpha$ -phellandrene is attached to C-4' and C-5' while in **2–5**,  $\alpha$ -phellandrene is attached to C-5' and C-6' through a dihydrofuran ring. The absolute configuration of **2** and **3** was determined based on comparison of their ECD spectra to that of callistrilone E (**8**), while the absolute configuration of callistrilone O (**4**) and P (**5**) was deduced by ECD calculation.<sup>1,2</sup> Callistrilone Q (**6**) and epicallistrilone Q (**7**) represents unusual callistrilone structures as  $\alpha$ -phellandrene is only attached to C-5'. Theoretical calculations of ECD spectra of **6** and **7** suggested that both compounds possess a 1''*R*,4''*R*,6''*R* configuration. However, ECD was indecisive in determination of the absolute configuration of C-7. Therefore, theoretical calculations of specific optical rotations were employed to remove the ambiguities regarding the absolute configuration at C-7 for compounds **6** and **7**.<sup>4</sup>

## 2. Chemical constituents of *Callistemon subulatus* extract

*C. subulatus* is a small shrub cultivated in Egypt for its abundant crimson flowers. No available data was traced concerning chemical constituents or a traditional use as medicine. The phytochemical investigation of *C. subulatus* leaves extract resulted in the isolation of one new compound named subulatone (**30**), together with fourteen previously reported compounds belonging to seven meroterpenoids, three flavonoids, one lignan and three triterpenes. The <sup>1</sup>H NMR of the new compound **30** displayed the presence of six methyl groups and an olefinic methine. The <sup>13</sup>C NMR showed the presence of two olefinic carbons, six methyls, two quaternary carbons and an oxygenated carbon. Analysis of HMBC correlations suggested that **30** is a 5-(2-hydroxypropan-2-yl)-2,2,6,6-tetramethylcyclohex-4-ene-1,3-dione.<sup>5</sup>

## 3. Antiausterity activity of the Isolated Compounds

The isolated compounds were tested for their antiausterity activity against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line in standard nutrient-rich medium (DMEM) and nutrient-deprived medium (NDM). Among the tested compounds, all callistrilones displayed unprecedented antiausterity activities that supersedes the positive control with PC<sub>50</sub> values of less than 100 nM. Of these, callistrilone L (**1**) and O (**4**) induced alterations in PANC-1 cell morphology under nutrient-deprived conditions.<sup>1,2</sup>

Pancreatic cancer remains challenging due to its remarkable metastatic properties as it migrates to distant organs in human body forming secondary tumors. Therefore, the effect of callistrilones L (**1**) and O (**4**) against PANC-1 tumor cell migration and colony formation was investigated. Both compounds strongly suppressed PANC-1 cell migration and colony formation under nutrient rich conditions (DMEM) in real-time.<sup>1,2</sup> Mechanistically, **1** was found to inhibit the key survival protein Akt and mTOR expression and phosphorylation and inhibited autophagy pathway.<sup>1</sup>

The active triterpene, 3 $\beta$ -hydroxy-urs-11-en-13(28)-olide (**22**) was able to induce dramatic changes in PANC-1 cell morphology after 12 h and plasma blebbing after 14 h leading to cell death in a real-time experiment. It also displayed antimetastatic properties under DMEM conditions.

Further investigation of the mechanism of action suggested that besides inhibiting Akt/mTOR pathway, it blocks the unfolded protein response in PANC-1 cells, leading to apoptosis under glucose deprivation.<sup>3</sup>

## Conclusion

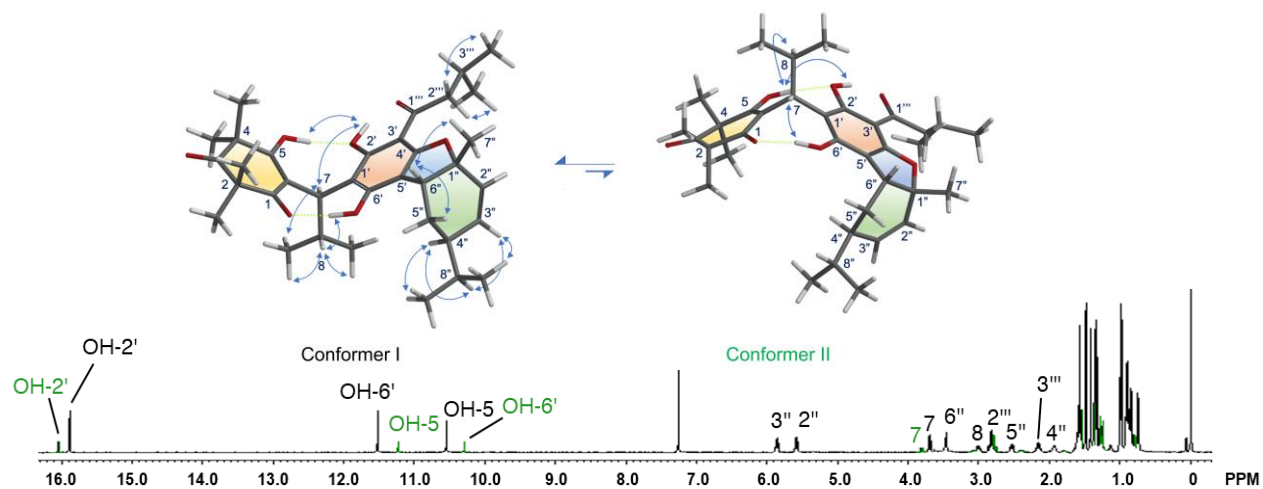
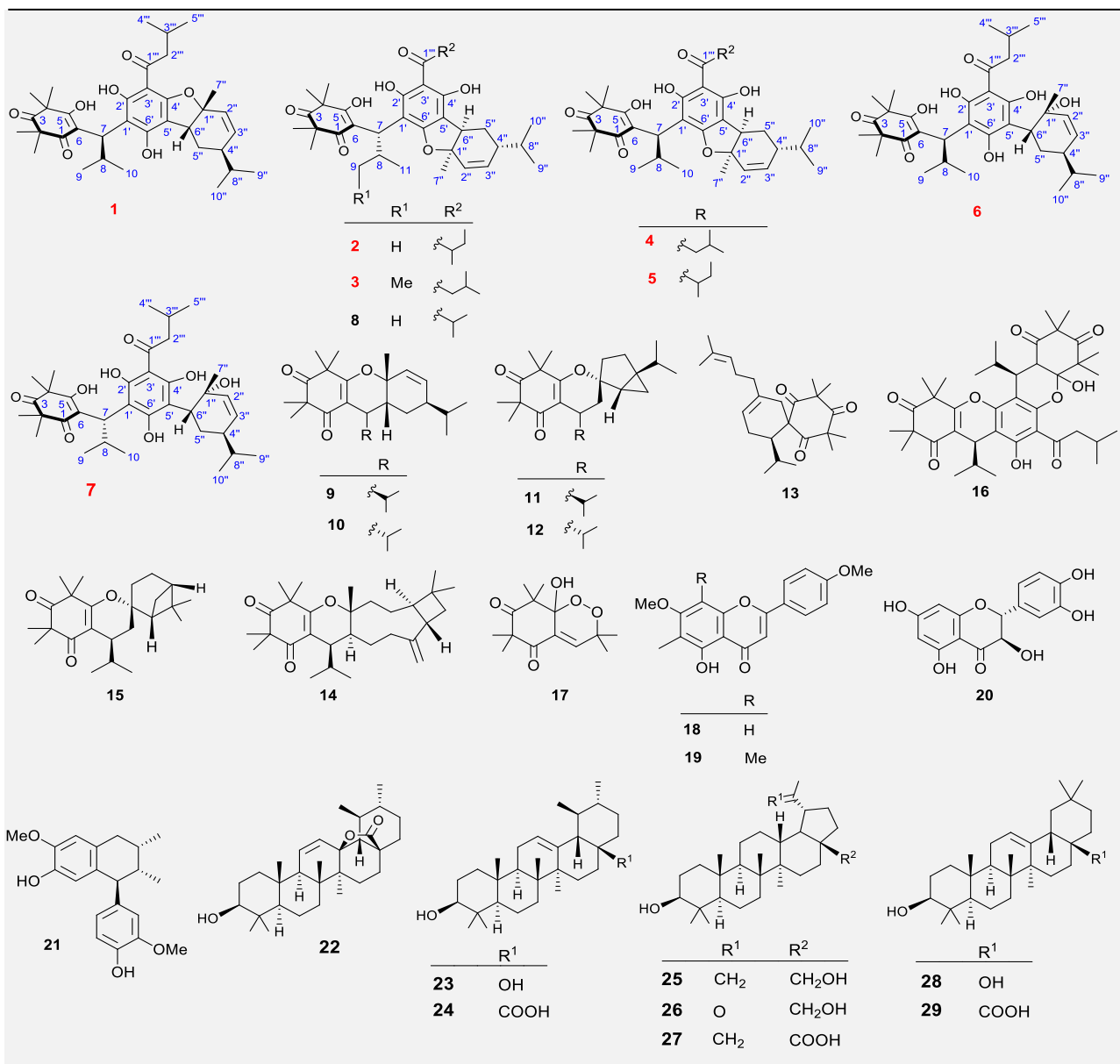
Phytochemical investigation of the active *Callistemon* extracts of led to the isolation of thirty-six compounds. Among these, seven new structurally challenging meroterpenoids named callistrilones L–Q (**1–6**) and epicallistrilone Q (**7**) from *C. citrinus* and a new compound from *C. subulatus* named subulatone (**30**). The absolute configuration for the isolated callistrilone compounds was determined based on theoretical calculations of the ECD, and specific optical rotation. The isolated callistrilone compounds showed unprecedented preferential cytotoxic activities against PANC-1 human pancreatic cancer cells at the sub-nanomolar level. Callistrilones L (**1**) and O (**4**) inhibited PANC-1 cells tumor migration and colony formation in DMEM, suggesting that these compounds are the most potent antiausterity agents with antimetastatic properties. Further investigation of the mechanism of action of callistrilone L (**1**) suggested that its activity is mediated via suppression of Akt/mTOR signaling cascade and autophagy pathway.

## References

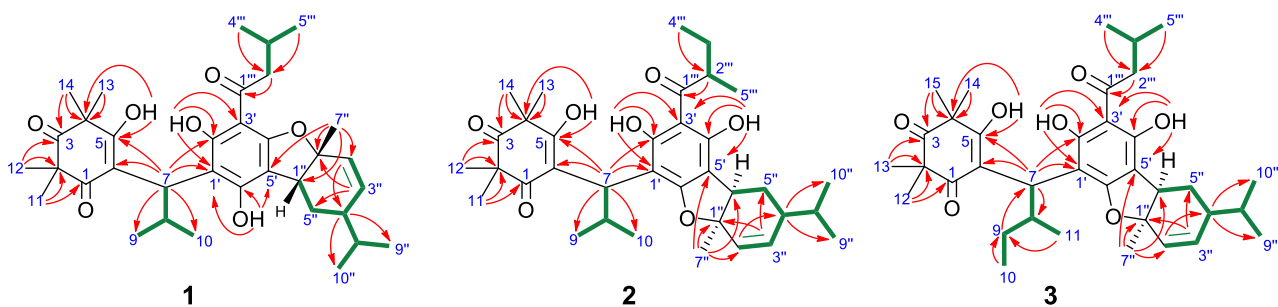
---

- 1- **Ahmed M. Tawila**, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Naoki Toyooka and Suresh Awale.  
Highly potent antiausterity agents from *Callistemon citrinus* and their mechanism of action against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *J. Nat. Prod.* 2020,  
<https://doi.org/10.1021/jnatprod.0c00330>.
- 2- **Ahmed M. Tawila**, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Naoki Toyooka and Suresh Awale.  
Chemical constituents of *Callistemon citrinus* from Egypt and their antiausterity activity against PANC-1 pancreatic cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020,  
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127352>.
- 3- **Ahmed M. Tawila**, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, and Suresh Awale.  
A triterpene lactone from *Callistemon citrinus* inhibits the PANC-1 human pancreatic cancer cells viability via suppression of unfolded protein response. *Chem. Biodivers.*  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202000495>
- 4- **Ahmed M. Tawila**, Ashraf M. Omar, Sijia Sun, Min Jo Kim, and Suresh Awale.  
Chiral discrimination of new callistrilone anomers from *Callistemon citrinus* and their antiausterity activity against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. In preparation.
- 5- **Ahmed M. Tawila**, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, and Suresh Awale.  
Chemical constituents of *Callistemon subulatus* and their antiausterity activity against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. In preparation.

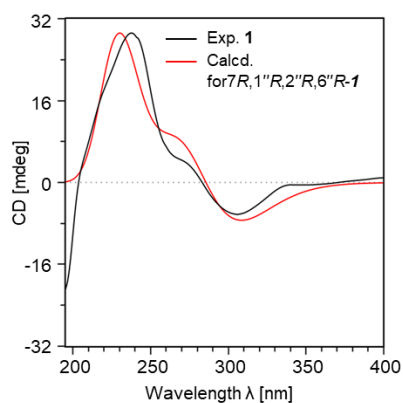
**Chart 1.** Compounds isolated from *C. citrinus*



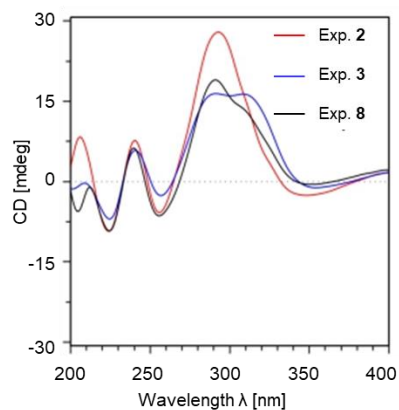
**Figure 2.** <sup>1</sup>H NMR and NOESY correlations observed for conformers I and II of callistrilone L (1).



**Figure 1.** COSY (bold green lines) and key HMBC (red arrows) correlations in 1–3.

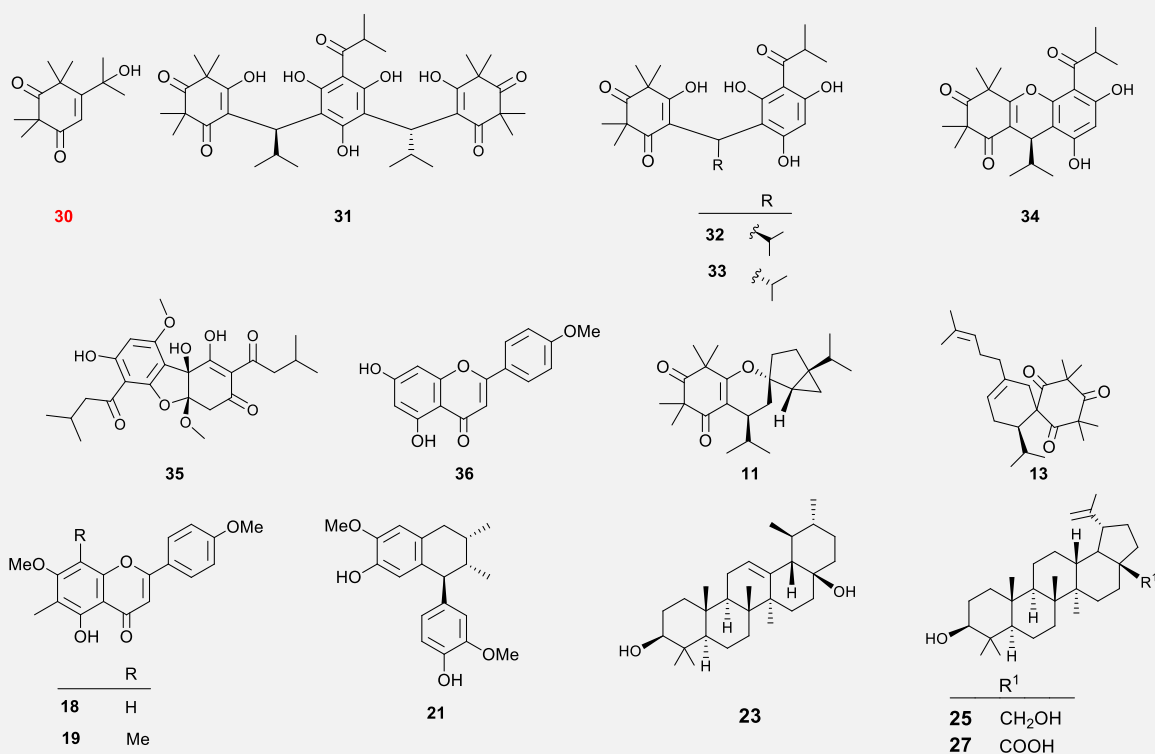


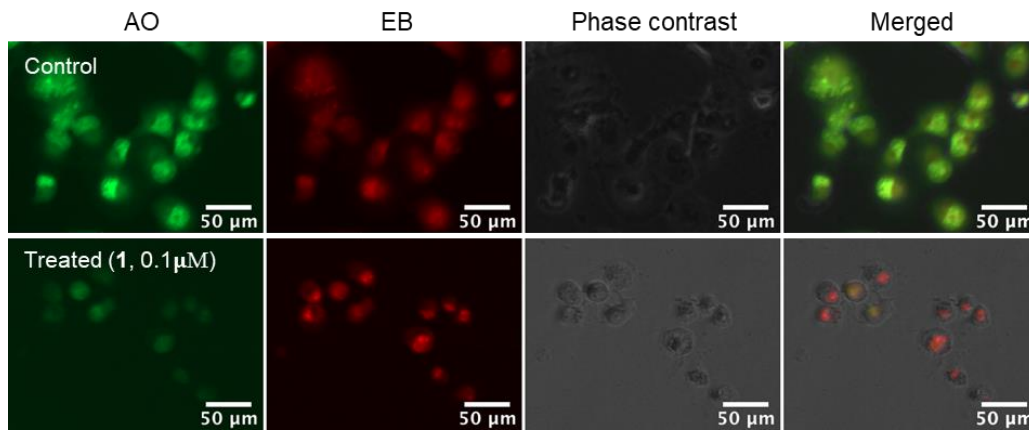
**Figure 3.** Experimental and calculated ECD spectra of compound 1.



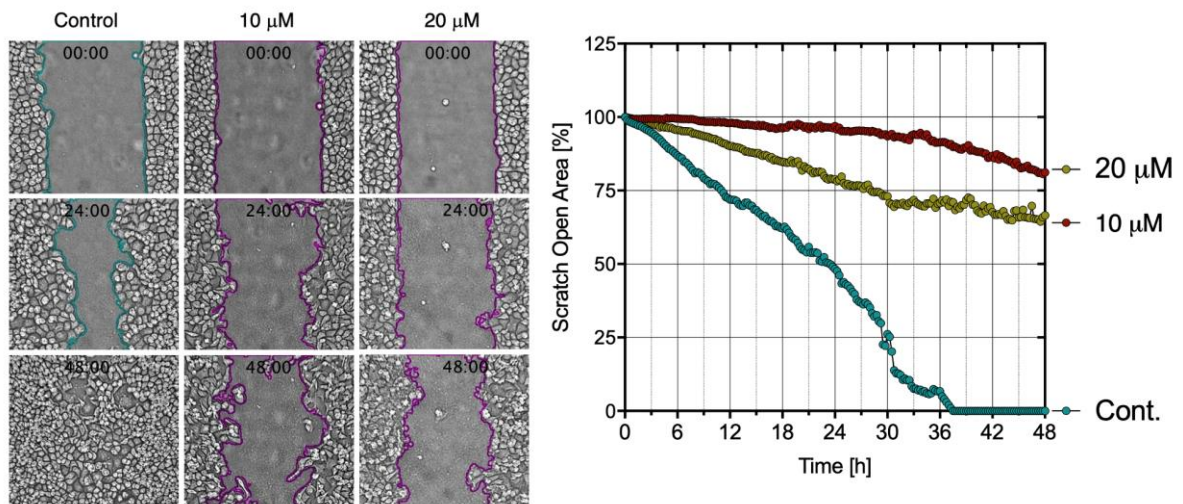
**Figure 4.** Comparison of the experimental ECD spectra of compounds 2 and 3 with that of the known compound 8.

## Chart 2. Compounds isolated from *C. subulatus*

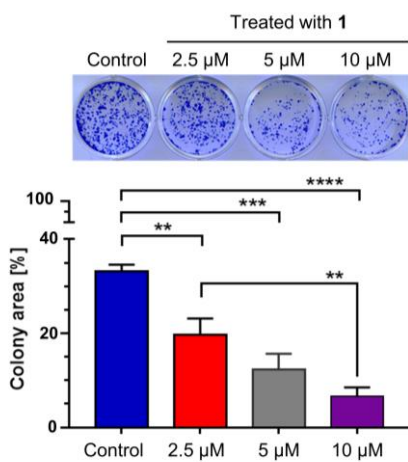




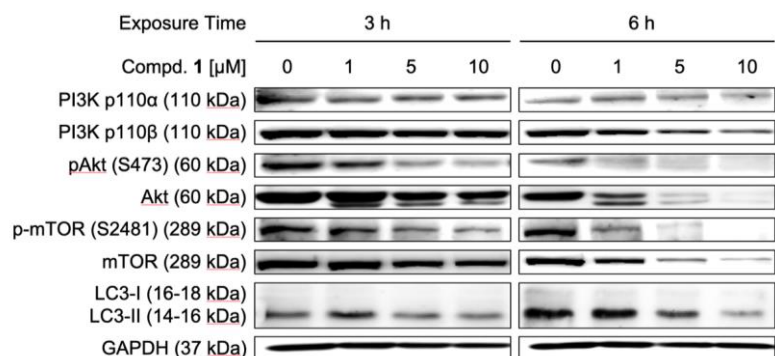
**Figure 5.** PANC-1 cell death induced by callistrilone L (1) in nutrient-deprived medium (NDM).



**Figure 6.** Callistrilone O (4) suppresses the migration of PANC-1 cells in a wound-healing assay in real time.




**Figure 7.** Effect of callistrilone L (1) on PANC-1 cells colony formation.



**Figure 8.** Effect of callistrilone L (1) on key proteins involved in PI3K/Akt/mTOR/autophagy signaling under NDM in PANC-1 cells.

学位論文審査の要旨

報告番号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	AHMED MOHAMMED ABDEL LATIF MOHAMMED TAWILA
審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 准教授 (副査) 准教授	氏 名 松谷 裕二 森田 洋行 渡辺 志朗 スレス アワレ	
(論文題目) Highly potent antiausterity agents from <i>Callistemon</i> species from Egypt and their mechanism of action against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line (エジプト産のカリステモン種からの強力な栄養飢餓耐性解除抗がん物質の探索とそれらのヒト膵臓がん細胞株PANC-1に対する作用機序)		(判定) 合格	
<p>膵臓がんは最も致死率の高いがんであり、5年生存率は10%未満と、極めて低い値となっている。膵臓がんにおける化学療法剤の効果は限定的であり、これら薬剤のほとんどに対して耐性が報告されている。従って、膵臓がん治療のための効果的な新しい化学療法剤の開発は、喫緊の課題とされている。</p> <p>がん細胞は、一般に増殖が極めて速く、多くの栄養素の供給を必要とする。一方、膵臓は血管に乏しい臓器であることから、他の腫瘍とは異なり膵臓腫瘍は血液供給が不十分であるとされる。しかしながら、エネルギー代謝を変化させることで低酸素状態と飢餓の過酷な状態を克服でき、栄養飢餓耐性を獲得する。この現象は、「緊縮」と呼ばれる。このような、膵臓がん細胞の栄養飢餓に耐える能力を阻害する、すなわち栄養飢餓耐性を解除することができる化合物の探索は、新しい膵臓がん治療薬開発への、斬新で有望なアプローチとなる。</p> <p>今回、エジプト産 <i>Callistemon citrinus</i> および <i>Callistemon subulatus</i> (フトモモ科) エキスが、ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 に対して、上記栄養飢餓耐性を強力に解除することを見出した。これらの研究成果について、以下に要約する。</p> <p><b>1. <i>Callistemon citrinus</i> エキスの化学成分</b></p> <p><i>C. citrinus</i> 葉の抽出物に含まれる化合物の単離同定操作により、7つの新規化合物、callistrilones L-Q (1-6) と epicallistrilone Q (7) が、22個の既知化合物とともに単離された。新規化合物である Callistrilone L (1) の <sup>1</sup>H NMR スペクトルは、4:1の比率で一对のシグナルを示したことから、2つの異性体の存在の可能性が示唆された。HPLCによりこれらの分離を行い、それぞれの <sup>1</sup>H NMR スペクトルを測定したところ、元の混合物と類似した <sup>1</sup>H NMR スペクトルを示した。さらに、これら混合物の繰り返し HPLC 分離は、同様の保持時間で2つのピークの再現性のあるクロマトグラムをもたらしたが、これらの <sup>1</sup>H NMR スペクトルに変化が認められなかったことから、この2つのピークは平衡配座異性体の混合物であることを強く示唆する結果となった。なお、Callistrilone L (1) の絶対配置は、ECD スペクトルの理論計算と比旋光度により決定された。化合物 2-5 も Callistrilone L (1) と同様に、それぞれの配座異性体の混合物として単離された。しかし、化合物 2-5 は、phloroglucinol 環への <math>\alpha</math>-phellandrene の結合様式が 1 と異なっていることが判明した。Callistrilone L (1) では、<math>\alpha</math>-phellandrene は C-4' と C-5' に結合しているのに対し、2-5 では、<math>\alpha</math>-phellandrene はジヒドロフラン環を介して C-5' と C-6' に結合していることが明らかとなった。化合物 2 と 3 の絶対配置は、callistrilone E (8) の ECD スペクトルとの比較から決定された。Callistrilone O (4) と P (5) の絶対配置は、ECD 計算によって推測された。Callistrilone Q (6) と epicallistrilone Q (7) は、<math>\alpha</math>-phellandrene が C-5' にのみ結合するという、callistrilone 類の中では特異な構造を有していることが明</p>			



らかとなった。化合物 6 と 7 の ECD スペクトルの理論計算は、両方の化合物ともに 1''R,4''R,6''R 配置を持っていることを示し、C-7 位の絶対配置については、比旋光度の理論計算を使用して決定された。

## 2. *Callistemon subulatus* エキスの化学成分

*C. subulatus* 葉抽出物に含まれる化合物の単離同定操作により、7 つのメロテルペノイド、3 つのフラボノイド、1 つのリグナン、および 3 つのトリテルペンに属する、合計 14 種類の既知化合物とともに、subulatone (30) という 1 つの新規化合物が単離された。

## 3. 単離された化合物の antiausterity 作用

単離された化合物について、標準的な富栄養培地(DMEM)と栄養欠乏培地(NDM)で、PANC-1 ヒト膵臓がん細胞株に対する細胞毒性を検討した。その結果、すべての callistrilone 化合物が強力な栄養欠乏培地(NDM)選択的細胞毒性を示し、PC<sub>50</sub>値は 100 nM 未満であることが明らかとなった。これらのうち、callistrilone L (1)と O (4)は、栄養欠乏条件下で PANC-1 細胞の形態に変化を引き起こし、さらに PANC-1 腫瘍細胞遊走とコロニー形成に対する効果も検討したところ、両方の化合物ともに、栄養豊富な正常条件でも PANC-1 細胞の遊走とコロニー形成を強く抑制した。この栄養欠乏培地(NDM)選択的細胞毒性発現メカニズムとしては、主要な生存タンパク質 Akt/mTOR の発現とリン酸化を阻害すること、さらに栄養欠乏状態におけるオートファジーを阻害することが判明した。また活性トリテルペン、3β-hydroxy-urs-11-en-13(28)-olide (22)は、リアルタイム実験で 12 時間後に PANC-1 細胞形態に劇的な変化を誘発し、細胞死に至ることが分かった。これら作用機序の検討により、Akt/mTOR 経路を阻害することに加えて、それが PANC-1 細胞における展開されたタンパク質応答をブロックし、グルコース欠乏下での細胞死につながるということが示唆された。

以上本研究では、カリステモンエキスの有効成分の探索により、36 個の化合物が単離された。特に、*C. citrinus* からの callistrilones L-Q (4-6) および epicalistrilone Q (7) という構造的に新奇で特異な構造を有する新規メロテルペノイドが見出された。さらに、*C. subulatus* から subulatone (30) という新規化合物が単離同定された。単離された callistrilone 類の絶対配置は、ECD の理論計算と比旋光度に基づいて決定された。単離された callistrilone 類は、PANC-1 ヒト膵臓がん細胞に対して、ごく低濃度にて栄養欠乏培地(NDM)選択的細胞毒性を示した。さらに、Callistrilones L (1)と O (4)は、DMEM 中で PANC-1 腫瘍細胞遊走およびコロニー形成を抑制し、これらの化合物が抗転移特性をも併せ持つ有力な化合物であることが示唆された。Callistrilones L (1)の作用機序は、Akt/mTOR シグナル伝達カスケードとオートファジー経路の抑制を介して、栄養欠乏培地(NDM)選択的細胞毒性を示すことも明らかとなった。これらの研究成果は、新規な膵臓がん治療薬の開発を目指した研究領域において、大きく貢献し得るものと評価できる。

主査および副査は、申請者 AHMED MOHAMMED ABDEL LATIF MOHAMMED TAWILA 氏に面接と共に論文内容について審査を行い、博士(薬科学)の学位を授けるに値すると判定した。

(学位論文のもとになる論文 著者名,論文題目,掲載誌名,巻,最初の頁と最後の頁,年を記載)

1. Ahmed M. Tawila, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Naoki Toyooka and Suresh Awale. Highly potent antiausterity agents from *Callistemon citrinus* and their mechanism of action against the PANC-1 human pancreatic cancer cell line. *J. Nat. Prod.* 2020, 7, 2221-2232. <https://doi.org/10.1021/jnatprod.0c00330>.
2. Ahmed M. Tawila, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, Jun-ya Ueda, Naoki Toyooka and Suresh Awale. Chemical constituents of *Callistemon citrinus* from Egypt and their antiausterity activity against PANC-1 pancreatic cell line. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2020, 127352. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127352>.
3. Ahmed M. Tawila, Sijia Sun, Min Jo Kim, Ashraf M. Omar, Dya Fita Dibwe, and Suresh Awale. A triterpene lactone from *Callistemon citrinus* inhibits the PANC-1 human pancreatic cancer cells viability via suppression of unfolded protein response. *Chem. Biodivers.* Revised submitted