

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18201042
 研究課題名（和文） 分子標的抗がん剤創製を指向した天然活性物質の探索
 研究課題名（英文） Search for Bioactive Natural Products for
 Molecular Target Chemotherapy of Cancer
 研究代表者
 小林 資正（KOBAYASHI MOTOMASA）
 大阪大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：40116033

研究成果の概要（和文）：がん細胞特異的に作用する抗がん剤のリード化合物創製を目的に、海綿などの海洋生物の抽出エキス、海洋由来微生物の培養物および薬用植物の抽出エキスから、最新の分子生物学の知見に基づいて構築した評価系を使用し、活性天然物の探索を行った。そして合計 7 種の活性物質を見出し、全合成、構造活性相関の解析、モデル化合物合成ならびに作用メカニズム解析等の検討を行った。

研究成果の概要（英文）：To explore new lead compounds for molecular target chemotherapy of cancer, we have established screening systems based on the novel biological and molecular biological findings of cancer. Then, we have searched bioactive natural compounds from the extracts libraries of marine organisms, marine-derived microbe and medicinal plants by constructed bioassay-guided separation. As a result, we have found seven bioactive compounds totally and examined total synthesis, structure-activity relationship, and synthesis of model compounds. Moreover, the mechanistic-studies were performed by the chemical biology method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2007 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2008 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009 年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
総計	39,900,000	11,970,000	51,870,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：海洋生物、分子標的、海綿、血管新生、活性試験、抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

がん治療において抗がん剤の果たす役割は非常に大きい。しかしながら、現在使用されている抗がん剤のほとんどが、がんの無限増殖能に着目した細胞毒性物質であるため、正常細胞でも、骨髄細胞、毛根細胞や粘膜細胞などのように、活発に分裂を行っている細

胞や組織に対して同様な毒性を示し、副作用の大きな原因となってきた。一方、近年の分子生物学的解析の進歩はめざましく、がん化に関わる様々な因子の同定が進むにつれて、これまで難しかったがん細胞と正常細胞の差別化が可能となってきた。またこれに伴って、がんに対する薬剤開発も、がん細胞

のみが持っている特徴を分子レベルで捉え、がん細胞特異的な代謝、シグナル伝達経路や微小環境を標的とする「分子標的抗がん剤」の開発が行われるようになった。しかし、本研究開始当初は、天然薬物資源からの活性天然物の探索研究において、分子標的抗がん剤を指向した研究はほとんど行われていなかった。さらに分子標的抗がん剤のリード化合物の創製とともに、全合成、誘導体合成、モデル化合物合成およびケミカルバイオロジーを基盤とする作用メカニズム解析までを総合的に実施する研究はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究は、副作用が少ない新しい抗がん剤シーズの創製を目的に、最新の分子生物学的知見に基づいたスクリーニング法を用いて、がん細胞特異的な因子に選択的に作用する活性天然物を、海綿類を中心とする海洋生物の抽出エキス、海洋由来微生物の培養物、薬用植物の抽出エキ斯拉イブラリーから探索する。発見した活性物質の抗腫瘍作用を *in vitro* および *in vivo* モデル系で評価し、有望な微量活性物質については、全合成による供給を検討する。また、モデル化合物合成による構造活性相関の解析、より簡便に合成できる活性類縁体の合成等の合成化学的検討を加え、新たな分子標的抗がん剤としての展開を図る。さらに、得られた活性物質を用いるケミカルバイオロジー研究により、その標的分子を明らかにし、制がんに関わる新規薬剤ターゲットの開拓を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者らが独自に保有する、海綿類を中心とする海洋生物の抽出エキス、海洋由来微生物の培養物、薬用植物の抽出エキ斯拉イブラリーを探索源として、以下の評価系により活性天然物の探索を実施する。活性の見られたサンプルについて、活性試験の結果を指標に分画・精製を行い、その化学構造を明らかにする。

(1) p21 プロモータ活性化物質 (がん細胞特異的細胞周期阻害剤) : p53 ネガティブであるヒト骨肉腫細胞 MG63 に cdk inhibitor である p21 promoter を融合した luciferase レポータープラスミドを導入・安定発現させた遺伝子改変細胞 (MG63^{Luc+}) を用いて、p53 などの宿主細胞の情報伝達系に依存せず p21 プロモータを直接活性化するサンプルをスクリーニングする。さらに得られた化合物について、タンパク質レベルでの p21 の発現量を明らかにする。

(2) 血管新生阻害物質 : がん血管新生のいずれの過程にも関与している、血管内皮細胞

に着目し、正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とそれ以外の細胞としてヒト咽頭上皮がん細胞 KB3-1 を用いて、HUVEC 選択的に増殖阻害活性を示すサンプルをスクリーニングする。得られた化合物について、血管内皮細胞の遊走、管腔形成に対する効果および *in vivo* での血管新生阻害作用、抗腫瘍活性を検討する。

(3) がん転移阻害物質 : がん転移の過程を網羅的かつ簡便に観察することが可能なスクラッチ法を用いて、ヒト子宮頸部がん HeLa 細胞に対して、毒性を示さない濃度において、スクラッチ痕の再生を阻害することが可能なサンプルをスクリーニングする。そして、得られた化合物について、転移のどの過程を阻害しているのかを確認する。

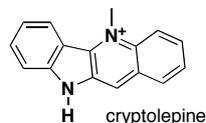
(4) 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 : 腫瘍内部の低酸素環境に適応したがん細胞が、がんの増悪に関わるという知見を基に、ヒト前立腺がん DU-145 細胞を 1% 低酸素環境で培養し、低酸素環境に適応したがん細胞と同様な表現型を誘導する。そして、本条件選択的に増殖阻害活性を示すサンプルをスクリーニングする。得られた化合物については、*in vivo* での抗腫瘍活性を確認する。

またスクリーニングから見出した活性物質のうち、医薬リード化合物として有望な活性を示す微量活性物質について、全合成による供給、モデル化合物合成による構造活性相関の解析、より簡便に合成できる活性類縁体の合成等の検討を加え、さらに、プローブ分子の作成等のケミカルバイオロジーの手法により、その標的分子を明らかにする。

4. 研究成果

研究期間内において各スクリーニング系から以下のような化学構造の活性物質を見出し、各種検討を行った。

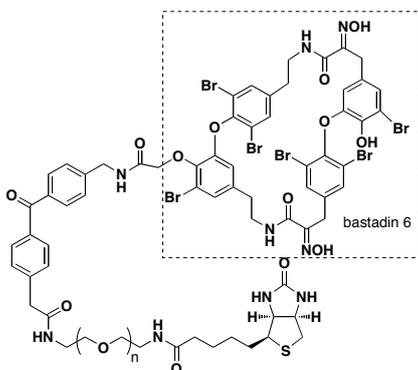
(1) p21 プロモータ活性化物質 : p21 プロモータ活性化物質として、インド・アーユルヴェーダ生薬から cryptolepine を見出し、タンパク質レベルでも p21 の発現量を上昇させていることを明らかにした。



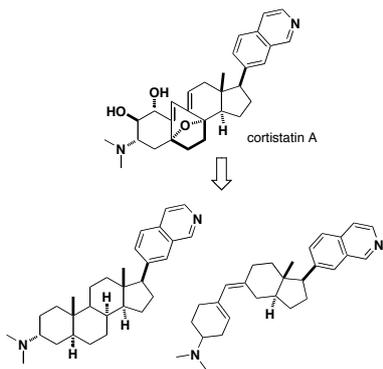
(2) 血管新生阻害物質 : HUVEC 特異的に増殖を抑制できる化合物を探索し、海綿からは大環状プロモチロシン誘導体 bastadin 類、新規イソマラバリカン型トリテルペン globostellatic acid X methyl ester 類や新

規ステロイドアルカロイド cortistatin 類を見出し、生薬セネガからは、サポニンである senegin 類、海洋由来真菌からは pyripyropene 類に、HUVEC 選択的な増殖阻害活性を見出した。またこれら化合物について、*in vitro* または *in vivo* モデル系での活性評価、全合成やモデル化合物合成、標的分子の解析を実施し、特に bastadin 類と cortistatin 類に関しては、以下に示す知見を得た。

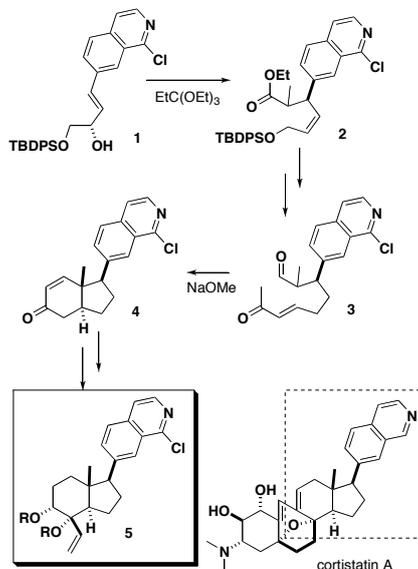
① bastadin 類: 主活性成分 bastadin 6 は、血管新生促進因子によって誘発されるヒト HUVEC の遊走や管腔形成を阻害するとともに、マウス角膜を用いた *in vivo* 試験で血管新生を阻害し、腫瘍移植モデルマウスに対して抗腫瘍効果を示した。また、効率的な全合成法 (9 工程、総収率 28%) を確立するとともに、構造活性相関を明らかにするため、種々のアナログ化合物を合成して活性評価を行った結果、分子全体のコンホメーションが活性発現に重要であることを明らかにした。さらに、標的分子を明らかにすることを目的に、光親和性基を導入したフォトアフィニティープローブを合成した。



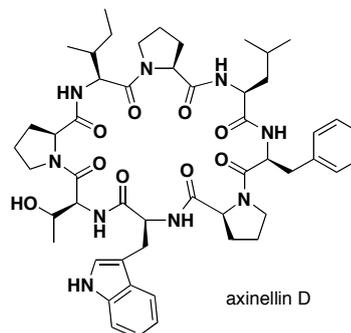
② cortistatin 類: 4 種の活性物質の他にこれまでに 7 種の微量類縁体を見出し、それらの構造活性相関から、側鎖のイソキノリン環と A 環の官能基が HUVEC 選択的増殖阻害に重要であることを明らかにした。最も強い活性を有する cortistatin A は、他のがん細胞と比較して、3000 倍以上の HUVEC 選択的増殖阻害 ($IC_{50} = 1.8 \text{ nM}$) を示す他、濃度依存的に HUVEC の遊走を阻害した。天然類縁体の構造



活性相関の情報をもとに、短工程で合成可能な各種アナログ化合物の設計・合成を行った。さらに cortistatin A の合成研究を展開し、Johnson-Claisen 転位反応による不斉転写と分子内 Michael-aldol 反応を鍵工程とする CD 環フラグメントの立体選択的合成に成功した。

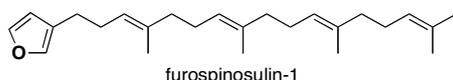


(3) がん転移阻害物質: スクラッチ法による探索の結果、新規環状ペプチドである axinellin D を見出した。またその作用メカニズム解析を行った結果、axinellin D は細胞毒性を示さない濃度範囲において、がん転移過程のうち、浸潤過程を阻害することを明らかにした。



(4) 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質: がんの増悪に関与する低酸素環境に適応したがん細胞の増殖を特異的に阻害する化合物を探索した結果、海綿よりフラノセスタテルペンである furospinosulin-1 を見出した。furospinosulin-1 は 1-100 μM まで濃度依存的かつ低酸素環境選択的に前立腺がん DU-145 細胞の増殖を阻害し、*in vivo* のがん細胞移植モデルマウスにおいても、経口で良好な抗腫瘍活性を示した。またその作用メカニズムを解析した結果、furospinosulin-1 は、低酸素環境で特異的に発現誘導される IGF-2

を転写レベルで阻害することを明らかにした。さらに furospinosulin-1 の化学構造を基盤に誘導体合成研究を展開し、その構造活性相関を解析した。



これらの検討の他に、以前より見出していた微量抗腫瘍活性物質 arenastatin A について、これまで困難であった、側鎖エポキシ基を立体選択的に合成する手法や arenastatin A の標的分子を明らかにするためのプローブ分子の作成にも成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

- 1) Hayashi, A.; Arai, M.; Fujita, M.; Kobayashi, M. Pyripyropenes, fungal sesquiterpenes conjugated with α -pyrone and pyridine moieties, exhibits anti-angiogenic activity against human umbilical vein endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **32**, 1261-1265. (2009) 査読有り
- 2) Suna, H.; Arai, M.; Tsubotani, Y.; Hayashi, A.; Setiawan, A.; Kobayashi, M. Dysideamine, a new sesquiterpene aminoquinone, protects hippocampal neuronal cells against iodoacetic acid-induced cell death. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 3968-3972. (2009) 査読有り
- 3) Kong, D.; Aoki, S.; Sowa, Y.; Sakai, T.; Kobayashi, M. Smenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces G1 arrest or apoptosis in different leukemia cells. *Marine Drugs* **6**, 480-488 (2008) 査読有り
- 4) Kotoku, N.; Sumii, Y.; Hayashi, T.; Kobayashi, M. Synthesis of CD-ring structure of cortistatin A, an anti-angiogenic steroidal alkaloid from marine sponge. *Tetrahed. Lett.* **49**, 7078-7081 (2008) 査読有り
- 5) Kotoku, N.; Hiramatsu, A.; Tsujita, H.; Hirakawa, Y.; Sanagawa, M.; Aoki, S.; Kobayashi, M. Structure-activity relationships study of bastadin 6, an anti-angiogenic brominated-tyrosine derived metabolite from marine sponge. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **341**, 568-577 (2008) 査読有り
- 6) Kotoku, N.; Tamada, N.; Hayashi, A.;

Kobayashi, M. Synthesis of BC-ring model of globostellatic acid X methyl ester, an anti-angiogenic substance from marine sponge. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3532-3535 (2008) 査読有り

- 7) Aoki, S.; Watanabe, Y.; Tanabe, D.; Arai, M.; Suna, H.; Miyamoto, K.; Tsujibo, H.; Tsujikawa, K.; Yamamoto, H.; Kobayashi, M. Structure-activity relationship and biological property of cortistatins, anti-angiogenic spongean steroidal alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 6758-6762 (2007) 査読有り
- 8) Aoki, S.; Sanagawa, M.; Watanabe, Y.; Setiawan, A.; Arai, M.; Kobayashi, M. Novel isomeric triterpenes, exhibiting selective anti-proliferative activity against vascular endothelial cells, from marine sponge *Rhabdastrella globostellata*. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4818-4828 (2007) 査読有り
- 9) Aoki, S.; Watanabe, Y.; Sanagawa, M.; Setiawan, A.; Kotoku, N.; Kobayashi, M. Cortistatin A, B, C, and D, anti-angiogenic steroidal alkaloids, from the marine sponge *Corticium simplex*. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3148-3149 (2006) 査読有り

[学会発表] (計 65 件)

- 1) 小林資正 Cell-based assay を基盤とする天然薬物由来の医薬シーズの探索 (日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山) (招待講演)
- 2) 荒井雅吉 インドネシア産海綿由来 furospinosulin-1 の低酸素環境特異的がん細胞増殖阻害活性 (第 51 回天然有機化合物討論会、2009 年 10 月 8 日、名古屋)
- 3) 古徳直之 Anti-angiogenic marine natural products (Frontiers in Medicinal Chemistry, 2009 年 3 月 17 日、ドイツ)
- 4) 小林資正 Bioactive metabolites from marine sponges and marine microorganisms (Gordon Research Conference, 2008 年 2 月 24 日、米国) (招待講演)
- 5) 荒井雅吉 海洋由来新規ステロイドアルカロイド cortistatin 類の血管新生阻害作用と構造活性相関 (第 12 回がん分子標的治療研究会総会、2008 年 6 月 27 日、東京)
- 6) 古徳直之 海綿由来血管新生阻害物質 globostellatic acid X methyl ester の構造活性相関 (第 17 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2008 年 11 月 14 日、福岡)
- 7) 古徳直之 海綿由来の血管新生阻害物質 cortistatin 類の構造活性相関と作用メカニズムの解析 (第 50 回天然有機化合物討論会、2007 年 9 月 25 日、仙台)

8) 古徳直之 Synthetic studies of bastadin 6, an anti-angiogenic substance from marine sponge. (IUPAC International Conference on Biodiversity and Natural Products, 2006年7月24日、京都)

[図書] (計1件)

小林資正 共著, (株) アイピーシー,
天然物化学 -海洋生物編-,
2008年, P228-P242

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規プレニルアレーン化合物およびその用途

発明者: 小林資正、古徳直之、荒井雅吉、河内崇志

権利者: 国立大学法人大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-107749

出願年月日: 2010年5月7日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI MOTOMASA)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 40116033

(2) 研究分担者

青木 俊二 (AOKI SHUNJI)
大阪大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 60252699

(3) 研究分担者

古徳 直之 (KOTOKU NAOYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 20362618

(4) 研究分担者

荒井 雅吉 (MASAYOSHI ARAI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: 80311231