

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06566

研究課題名(和文) 癌の薬剤耐性を制御する物質の創出

研究課題名(英文) Exploration of substance controlling cancer drug resistance

研究代表者

安達 勇光 (ADACHI, HAYAMITSU)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主席研究員

研究者番号：00250051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の薬剤耐性化によりヘパラーゼの発現が著しく高まることが明らかになってきた。新しいヘパラーゼ阻害剤を見出すことを目的として、ヘパラーゼ阻害評価系を構築し冬虫夏草類代謝産物ライブラリー、天然化合物ライブラリーから阻害剤の探索を行い、阻害活性を示す化合物を見出した。また、天然物由来のヘパラーゼ阻害剤Heparastatinの構造-活性相関の検討から、Heparastatinの活性と構造の不安定性に関する新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出すヘパラーゼ阻害剤は、微生物の代謝産物に由来する天然物やプロスライブラリーから探索する。天然物ヘパラーゼ阻害剤をベースにした合成探索は、当研究所で開発した高度な認識構造を有する天然物阻害剤をベースにしており、創製される化合物は学術的に独自性が高い。また阻害剤の探索資源として、独自に開発してきた冬虫夏草類代謝産物ライブラリーは、がん、免疫などに薬効を示すと期待されており、抗がん薬のシーズを見つけるという社会的な要請に応えらるる。

研究成果の概要(英文)：Heparanase has been proven to express significantly in drug-resistant cancer. To discover a new heparanase inhibitor, we have screened an inhibitor from libraries of Tochu-Kaso and natural product to find active compounds, whereas structure-activity relationship study gave new findings for stability and activity of Heparastatin, a natural heparanase inhibitor.

研究分野：天然物化学、創薬化学

キーワード：がんの浸潤、転移、増殖 ヘパラーゼ 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸糖タンパク質糖鎖修飾酵素ヘパラーゼは、転移性癌細胞の基底膜浸潤に關するマトリックス分解酵素として同定された。ヘパラーゼは、細胞外マトリックスのヘパラン硫酸を分解し癌細胞の浸潤・転移を促進する。また細胞表面のヘパラン硫酸糖タンパク質 (Syndecan, Glypican) を切断し、糖鎖に結合している VEGF, FGF などの増殖因子を遊離し、癌の増殖を促進する。最近、癌患者の癌細胞の薬剤耐性獲得の過程でヘパラーゼの発現が著しく高まることが報告されてきた (*Oncotarget*, 2015, 7, 1598-1607; *Neoplasia*, 2015, 17, 101-113)。Syndecan や Glypican の糖鎖構造の変化は、薬剤に対する感受性を変化させ薬剤耐性を誘導すると考えられている。また細胞表面糖鎖の修飾により引き起こされるエクソソーム (細胞外分泌小胞) の分泌により、ホスト (間質) 細胞に薬剤耐性を伝えるなど、ヘパラーゼはこれまでの増殖、浸潤・転移の因子に加え新たに薬剤耐性化の因子が加わり、臨床上極めて重要な標的として注目されている。薬剤耐性を制御する試みとして、高分子多糖のヘパラーゼ阻害剤が臨床試験で試されたが未だ医薬品に至るものがなく、低分子合成阻害剤も十分な活性をもつものは無い (*Future med. chem.*, 2016, 8, 647)。

2. 研究の目的

従来の高分子多糖のヘパラーゼ阻害剤の物性と低分子阻害剤の活性の問題点を克服した新しいヘパラーゼ阻害剤を創出することを目的とする。さらにヘパラーゼの分泌と薬剤耐性を指標とした細胞系を用い、ヘパラーゼの分泌を抑制し、癌細胞の薬剤耐性を制御する物質を独自に開発した冬虫夏草菌代謝産物ライブラリーから探索し、抗癌医薬品のシーズを獲得することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の方法は、癌の薬剤耐性を制御する薬剤のシーズを見出すことであり、以下の課題に沿って研究を実施する。

課題 1 : 両性イオン型認識構造を有する新規ヘパラーゼ阻害剤の合成

Siastatin B を出発原料として Heparastatin のメタンジアミン構造 ($-N(1)-CH(-NH_2)-$) とは異なる構造を有する化合物、Heparastatin と N-acetylglucosamine を結合した二糖誘導体の合成を検討した。

課題 2 : 冬虫夏草菌代謝産物からのスクリーニングと標的の同定

ヘパラーゼの酵素阻害アッセイ系を構築し、独自に菌を分離、培養しライブラリー化した冬虫夏草代謝産物や天然化合物ライブラリーからヘパラーゼ阻害剤の探索を行う。またヘパラーゼを分泌する細胞の評価系を構築し、分泌を阻害する物質のスクリーニングを行う。活性化合物が得られた場合は標的の探索を行う。

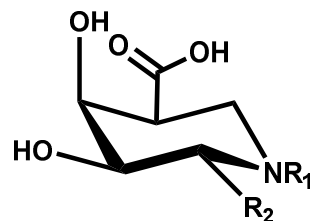
課題 3 : 得られた化合物の動物試験

耐性制御物質のマウスに対する急性毒性、がん細胞の皮下移植モデルマウスを用いて単剤および抗癌剤との併用における抗癌活性を評価する予定であったが、課題 2 において基準を超えるものが得られなかったため、動物試験は行わなかった。

4. 研究成果

課題 1 . 両性イオン型認識構造を有する新規ヘパラーゼ阻害剤の合成

以前当研究所で見出されたヘパラーゼ阻害剤 Heparastatin の活性と構造の情報に基づき Heparastatin の出発原料である天然物シアスタチン B を用い、メタンジアミン構造を変換した阻害剤、2-MeO-N(Boc)siastatin B (1)、2-deacetylamino-siastatin B (2)を合成した(図)。Heparastatin と N-acetylglucosamine を結合した二糖化合物は得るに至らなかった。



Heparastatin:
 $R_1 = H, R_2 = NHCOCF_3$

Siastatin B:
 $R_1 = H, R_2 = NHCOCH_3$

1: $R_1 = COOC(CH_3)_3, R_2 = OCH_3$
2: $R_1 = H, R_2 = H$

化合物 1, 2 は、メタンジアミン構造 (-N(1)-CH(-NH)-) を持たない構造であり、1 は $7.8 \mu g/ml$ 、2 は $30.9 \mu g/ml$ の阻害活性 (IC_{50}) を示した (ヘパラーゼ阻害活性は課題 2 において構築されたアッセイ系により評価された)。1 は酵素アッセイ系中で加水分解を受け徐々にアミナル構造に変化することが示され、このアミナル構造が活性に寄与していると考えられた。

課題 2 : 冬虫夏草菌代謝産物からのスクリーニングと標的の同定

当初、MDA-MB-231 (乳がん)、HEK293 (ヒト胎児腎細胞)、HEP-G2 (ヒト肝癌細胞株由来) をもちいてヘパラーゼ高発現細胞を作成し、細胞外にヘパラーゼが分泌されていることを確認したが、分泌される量が低く分泌阻害を評価するスクリーニングに耐える量ではなかった。これにより、ヘパラーゼの分泌を阻害する評価系の構築は中止とし、ヘパラーゼ酵素阻害アッセイ系による阻害剤のスクリーニングをメインに行うこととした。

ヘパラーゼの酵素活性を呈色試薬により検出する探索系を完成した。MDA-MB-231 細胞破砕液とリコンビナントヘパラーゼ酵素を酵素源として、酵素反応の基質として酵素の切断部位を含む 5 糖 (Fondaparinux) と反応検出試薬 (WST-1) を用いた探索系を確立した。このスクリーニング系を用いて、試験的に当研究所が保有する既知天然化合物ライブラリーから阻害剤を探索し低活性ながら、Oxanthromycin、Panosialin、Dioxamycin、vegfrecine などの天然物阻害剤を見出すことができた。Vegfrecine は文献 1 において VEGFR-1 tyrosine kinase の阻害剤として報告したが、ヘパラーゼ阻害活性も有することが明らかになった。

阻害剤スクリーニングに冬虫夏草類微生物代謝産物プロスサンプルをもちいると、当初予想していなかった偽陽性が検出された。偽陽性は、非還元末端をもつ糖化合物によることが明らかになり、水溶性の糖化合物を除いたプロスの酢酸エチル抽出物からスクリーニングを行った。またこの探索系を補完するスクリーニング系として、LC/MS を用いて酵素阻害を検出する系を構築し、糖類を含むプロスサンプルでもスクリーニングが可能となったが、これまでプロスサンプルからのヒット化合物は得られていない。

ヘパラーゼの阻害剤スクリーニングにおいて対照化合物として使用している Heparastatin は、当研究所に於いて開発された強力な天然物由来のヘパラーゼ阻害剤である。共同研究先に提供しており、学会発表が行われた (学会発表の項)。

本研究を通じ、がんの薬剤耐性により発現が上昇するヘパラーゼに着目し、その阻害剤を探索する過程で、数種の天然物の阻害剤を見出し、活性に寄与する部分構造などの情報を得ることができた。一方阻害剤の合成による探索により、Heparastatin の特徴的な構造であるメタンジアミン構造を変化させた場合の活性変化から今後の研究の展開に重要な示唆が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 H. Adachi, C. Nosaka, S. Atsumi, K. Nakae, Y. Umezawa, R. Sawa, Y. Kubota, C. Nakane, M. Shibuya, Y. Nishimura	4. 巻 74
2. 論文標題 Structure-activity relationships of natural quinone vegfrecine analogs with potent activity against VEGFR-1 and -2 tyrosine kinases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Antibiotics	6. 最初と最後の頁 734-742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00445-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Onodera, I. Momose, H. Adachi, Y. Yamazaki, R. Sawa, S.-I. Ohba, M. Kawada	4. 巻 295
2. 論文標題 Human pancreatic cancer cells under nutrient deprivation are vulnerable to redox system inhibition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 16678-16690
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 I. Momose, T. Onodera, H. Doi, H. Adachi, M. Iijima, Y. Yamazaki, R. Sawa, Y. Kubota, M. Igarashi and M. Kawada	4. 巻 82
2. 論文標題 Leucinostatin Y: A Peptaibiotic Produced by the Entomoparasitic Fungus <i>Purpureocillium lilacinum</i> 40-H-28	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Nat. Prod	6. 最初と最後の頁 1120-1127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.8b00839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 H. Adachi, K. Nakae, S. Sakamoto, C. Nosaka, S. Atsumi, M. Shibuya, N. Higashi, M. Nakajima, T. Irimura, Y. Nishimura	4. 巻 71
2. 論文標題 Microbial metabolites and derivatives targeted at inflammation and bone diseases therapy: chemistry, biological activity and pharmacology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Antibiotics	6. 最初と最後の頁 60-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ja.2017.138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 史佳、生田駿乃介、福村修示、大熊晴香、鈴木聖也、金田碧、福田明々人、重田奈緒、高橋勝彦、奥輝明、安達勇光、西村吉雄、中島元夫、入村達郎、東伸昭
2. 発表標題 ヘパラーゼ阻害物質heparastatin(SF4)による結腸癌細胞の増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生田駿乃介、大熊晴香、鈴木聖也、金田 碧、福田明々人、福村修示、史 佳、高橋勝彦、安達勇光、西村吉雄、中島元夫、入村達郎、東伸昭
2. 発表標題 ヘパラーゼ阻害物質heparastatin(SF4)の結腸癌細胞増殖抑制機構
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大熊晴香、金田 碧、鈴木聖也、福田明々人、安達勇光、西村吉雄、中島元夫、入村達郎、高橋勝彦、東 伸昭
2. 発表標題 ヘパラーゼ阻害物質heparastatin(SF4)は結腸癌細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所ホームページ
<https://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	百瀬 功 (MOMOSE ISAO) (10270547)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・主席研究員 (72801)	
研究協力者	坂本 修一 (SAKAMOTO SYUICHI) (60346070)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・主任研究員 (72801)	
研究協力者	土井 宏育 (DOI HIROYASU) (60300810)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・研究員 (72801)	
研究協力者	細川 信夫 (HOSOKAWA NOBUO) (10250052)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・研究員 (72801)	
研究協力者	大石 智一 (OISHI TOMOKAZU) (50442546)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・主任研究員 (72801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関