

機関番号：31603

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度 ~ 2010 年度

課題番号：20590107

研究課題名 (和文) 微生物二次代謝産物を用いた分子標的癌治療薬の探索研究

研究課題名 (英文) Search on molecular target cancer drug from microbial secondary metabolites

研究代表者

金 容必 (KIM YONGPIL)

いわき明星大学・薬学部薬学科・准教授

研究者番号：70337997

研究成果の概要 (和文)：癌に対して選択的な効果の高い治療薬を目指し、微生物代謝産物から HIF-1 α (低酸素応答性因子) を分子ターゲットにして探索を行い、新しいタイプと思われるリード化合物を得た。今後、これら化合物の作用機序が解析できれば、新しい作用機序を持つ抗癌分子標的薬の開発に結びつく可能性が高いと思われる。

研究成果の概要 (英文)： It aimed at the treatment with high selective effect for cancer, HIF-1 α (hypoxic inducible factor-1 α) was made a molecular target from microbial secondary metabolites, we obtained a new type lead compounds. We expect that these compounds become a new type anti-cancer drug if anti-cancer mechanism action is clarified in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：微生物薬品化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：分子標的治療薬、微生物二次代謝産物、HIF-1 α 、低酸素

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の酸素濃度は平均 1.3% 程度と報告されている。しかし、殆どの正常組織には血管を通じて十分に酸素が供給されている。このことは、低酸素環境を標的とする治療法が腫瘍特異的となる可能性を示唆している。

低酸素を標的とする第一の方法は低酸素によって活性化される転写因子 Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) 機能の抑制である。HIF は α サブユニットと β サブユニットのヘテロ二量体で、低酸素条件下で α サブユニットの分解が停止して細胞内に

蓄積され活性化し核内に移行する。移行した HIF-1 α は hypoxia response element (HRE) に結合して、グルコース輸送タンパク質、血管内皮増殖因子 (VEGF)、造血因子エリスロポイエチンなどの多くの遺伝子の発現を転写レベルで誘導する。この HIF-1 経路こそ低酸素環境下での腫瘍細胞の生存・増殖を可能にしており、HIF-1 が魅力的な腫瘍特異的分子標的となる理由である。

現在、既知の化合物のなかに HIF-1 α 機能を抑制する薬剤が知られている。Geldanamycin などの熱ショックタンパク質 HSP90 の阻害剤また taxol などが HIF-1 α 機

能を制御すると報告されている。しかし、殆どの化合物が細胞増殖を抑制する濃度よりはるかに高い濃度でしか HIF-1 α タンパク質発現を抑制しないことから、HIF-1 α 機能を制御する分子標的薬としては不十分と思われる。

2. 研究の目的

腫瘍組織内は腫瘍新生血管の構造異常や間質圧の上昇などによって低酸素環境におかれているにもかかわらず、腫瘍細胞は生存増殖する。むしろ低酸素環境は、腫瘍細胞の悪性化、血管新生、放射線抵抗性や抗がん剤耐性の誘導など腫瘍増殖にプラス要因として働いている。これらのことを可能にしている因子は、低酸素条件下の腫瘍細胞内で活性化され、血管内皮増殖因子を制御することにより腫瘍細胞の増殖や転移を促進する作用を持つ HIF-1 α である。従って、HIF-1 α 機能を制御する化合物は、選択性の高い新しいタイプのがん分子標的治療薬になる可能性が高いので微生物二次代謝産物からがん分子標的治療薬を目指して探索研究を行う。

3. 研究の方法

(1) スクリーニング方法

スクリーニングは Western blot 法により測定を行った。細胞培養用 6 ウェルプレートの各ウェルにサンプルのメタノール溶液 50 μ l (1 mg/ml) を添加し、メタノールが自然にドライアップすることを待ってから、 1.0×10^6 cells/ml の HeLa 細胞懸濁液を 1 ウェルに 2 ml ずつ分注して 5% CO₂、37 °C の条件下で 3 時間インキュベートした後、低酸素にするウェルと通常酸素のプレートは別におけられ、低酸素のプレートは 1% O₂、94% N₂、5% CO₂ の条件に置換してから 37 °C で 4 時間インキュベートした。インキュベート終了後、細胞質内タンパク質を lysis buffer を用いて抽出し、Western blot 法で HIF-1 α タンパク質を検出した。

(2) 活性成分の単離精製

スクリーニングで活性を示した土壌由来糸状菌を米培地を用いて、25 日間培養して酢酸エチルで抽出後、減圧下乾固することで培養画分を得た。これを Silica gel 60 を用いたカラムクロマトグラフィーおよび ODS HPLC による精製を行った。その結果、IMU-0051-2-3-7 を 16 mg、IMU-0051-2-3-9 を 36 mg そし IMU-0051-2-3-10 を 9 mg 黄色粉末として単離した。

(3) 活性成分の構造解析

質量分析は FAB-MS を用いて測定した。NMR は重クロロホルム (¹³C: 77.0 ppm, ¹H: 7.26 ppm) および重 DMSO (¹³C: 39.5 ppm) を

内部標準として用いた。

(4) Western blot 法による細胞内 HIF-1 α 及び HIF-1 β タンパク質の検出

6 well 細胞培養プレート中で 1.0×10^6 個のヒト子宮頸がん細胞 HeLa を薬物および低酸素 (1% O₂) 処理し、4 時間培養した後、氷上で PBS (pH 7.4) で洗浄し、lysis buffer を 75 μ l 添加してラバーポリスマンを用いて細胞を剥離してチューブに回収した。13,000 rpm、4 °C で 20 分間遠心後、上清 60 μ l に 3 x sample buffer を 30 μ l 加え、100 °C で 5 分間放置して cell lysate とした。Cell lysate を SDS-polyacrylamide gel (7.0% acrylamide) に添加し、125 V 定電圧で電気泳動を行った。泳動終了後、blotting 装置を用いて PVDF 膜に blotting した。次に、PVDF 膜を blocking solution に浸して blocking した後に、1 次抗体液に 4 °C で一晩浸した。その後、ビオチン標識 2 次抗体溶液に 4 °C で 4 時間浸し、さらに ABC reagent に室温で 30 分浸した後、ECL reagent を用いて化学発光させ Intelligent dark box で検出した。1 次抗体には、HIF-1 α 抗体 (BD Transduction Laboratories) 及び HIF-1 β (abcam) を用いた。また、2 次抗体には、ビオチン化 anti-mouse IgG (Vector Laboratories) を用いた。

(5) Western blot 法による核内 HIF-1 α および HIF-1 β タンパク質の検出

細胞培養用プレート (100-mm in diameter) にまいた 5.0×10^6 個の HeLa、MCF-7 および T47D 細胞を低酸素条件下で各種薬物を含む EMEM 10 ml 中で 37 °C 4 時間培養した。氷上で PBS で洗浄した後、PBS 1 ml を添加してセルスクレーパーを用いて細胞を剥離してチューブに回収した。1,500 rpm、4 °C で 5 分間遠心して得られたペレットに 20 mM Tris-buffered KCl solution (pH 7.8) 400 μ l を加えて穏やかに懸濁し、氷上で 10 分間静置し、さらに lysis buffer (1.2% Np-40 含有) 400 μ l を加え、10 秒間攪拌した。さらに 13,000 rpm、4 °C で 1 分間遠心し、得られた核ペレットに Tris-extract buffered 500 mM KCl solution 30 μ l を加えて攪拌後、氷上で 1 時間静置した。その後、13,000 rpm、4 °C で 20 分間遠心し、その上清を核抽出液とした。核抽出液に 3 x sample buffer を 15 μ l 加え、100 °C で 5 分間放置して cell lysate とした。Cell lysate を SDS-polyacrylamide gel (7.0% acrylamide) に添加し、125 V 定電圧で電気泳動を行った。電気泳動の過程および抗体反応は細胞内の検出方法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 低酸素条件下で HIF-1 α の細胞内蓄積を抑制する化合物の探索

新たな抗悪性腫瘍薬のリード化合物を見出すことを目的に低酸素条件下 HIF-1 α の細胞内蓄積抑制作用を示す化合物の探索を行った。ヒト子宮頸がん細胞 HeLa 細胞を用いて HIF-1 α の細胞内タンパク質のレベルを Western blot 法により測定し、その阻害活性を指標にスクリーニングを実施した。

①スクリーニング結果

主に糸状菌の培養画分を対象にスクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは、低酸素条件下で HIF-1 α の細胞内蓄積抑制作用を示し、かつ、再現性が得られ培養画分を選択し、2 次スクリーニングでは、1 次スクリーニングで選択された画分の中から DFO 刺激と比べ低酸素条件下の HIF-1 α に選択的抑制活性を示し、さらに抑制作用が濃度依存的である培養画分を選択した。計 126 サンプルをスクリーニングした結果、糸状菌 IMU-0051 株の画分中に目的とする HIF-1 α の細胞内蓄積抑制作用を確認した (Table 1)。

Table 1 Results of screening for decreasing the accumulation of HIF-1 α protein by hypoxia

Number of strain	Number of extract fractions	1st screening	2nd screening
16	126	20	7

スクリーニングで活性を示した 7 画分は IMU-0051 (いわき三崎公園で採取) IMU-0052 (いわき市中央台鹿島で採取) IMU-0089 (いわき市いわき公園で採取) の 3 株からであり、そのうち、最も選択性の高かった IMU-0051 の fraction 2 を用いて活性成分の研究を行った。

(2) IMU-0051 株の菌学的性状

糸状菌 IMU-0051 株はいわき市三崎公園で採取した土壌より分離された。糸状菌の分類、同定には Pitt の分離法に基づき顕微鏡で分生子柄、分生子などの形状、サイズを観察した結果 IMU-0051 株は *Penicillium* 属と同定された (Fig. 1)。



Fig. 1 Photomicrograph of IMU-0051 strain.

(3) IMU-0051 株の培養

種培養として、グルコースを主成分とする種培地 10 ml を含む試験管に、斜面培地で

培養した *Penicillium* sp. IMU-0051 株を 1 白金耳植菌し、27 $^{\circ}$ C、170 rpm の条件下で 3 日間振盪培養した。本培養はルー瓶 4 本に 300 g のいわき産米を分注し、種培養を 2 ml ずつルー瓶に植菌した。培養は 25 $^{\circ}$ C、25 日間静置培養した。

(4) IMU-0051 株が生産する活性物質の精製

25 日間静置培養した米を酢酸エチルで抽出後、濾紙で濾過し培養米を除去した。得られた酢酸エチル抽出液を減圧下濃縮乾固することで褐色油状物質 6.4 g を得た。酢酸エチル抽出物をクロロホルム-メタノール溶媒系を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。得られた Fr. 2-3 (132.8 mg) を ODS カラムを用いて分取 HPLC により精製し、Fr. 2-3-7 (16 mg)、Fr. 2-3-9 (36 mg) および Fr. 2-3-10 (9 mg) をそれぞれ単離した。

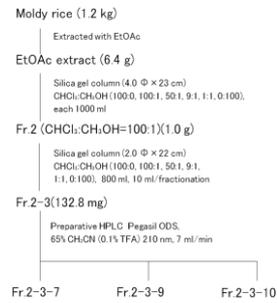


Fig. 2 Isolation of IMU-0051-2-3-7, 8, 9

(5) IMU-0051 株が生産する活性物質の構造解析

IMU-0051-2-3-7、IMU-0051-2-3-9 および IMU-0051-2-3-10 はメタノールおよびクロロホルムに可溶性黄色粉末状物質として得られた。これら化合物の UV スペクトルは 234 nm、290 nm、327 nm、421 nm 付近に極大吸収を示し、271 nm および 339 nm にショルダーピークを示すという類似した特徴的な UV 吸収が観測された。また、低分解能 FAB マススペクトルにおいて、IMU-0051-2-3-7、IMU-0051-2-3-9 および IMU-0051-2-3-10 は分子イオンピーク 546 が観測されたことから分子量 546 が、高分解能 FAB マススペクトルにより分子式 $C_{30}H_{26}O_{10}$ と推定された。比旋光度においては、IMU-0051-2-3-7 は +1130、IMU-0051-2-3-9

Table 3 Physico-chemical properties of IMU-0051-2-3-7, IMU-0051-2-3-9 and IMU-0051-2-3-10

	IMU-0051-2-3-7	IMU-0051-2-3-9	IMU-0051-2-3-10
Appearance	Yellow powder	Yellow powder	Yellow powder
M.F.	$C_{30}H_{26}O_{10}$	$C_{30}H_{26}O_{10}$	$C_{30}H_{26}O_{10}$
M.W.	546	546	546
HR-FAB-MS (m/z)			
Found	546 (1518)	546 (1518)	546 (1518)
Calcd	546 (1526)	546 (1526)	546 (1526)
$[\alpha]_D^{25}$	+1130 (c 0.1 dioxane)	+647 (c 0.1 dioxane)	-194 (c 0.1 dioxane)
UV λ_{max} nm (log ϵ)	234 (4.50), 271, sh (4.50), 291 (4.61), 328 (4.65), 339, sh (4.00), 421 (3.83)	234 (4.68), 271, sh (4.68), 291 (4.79), 328 (4.22), 339, sh (4.17), 421 (4.12)	233 (4.34), 271, sh (4.36), 291 (4.47), 328 (3.88), 339, sh (3.83), 420 (3.79)
Solubility	$CHCl_3$, CH_3OH	$CHCl_3$, CH_3OH	$CHCl_3$, CH_3OH
Color reaction			
Positive	20% H_2SO_4	20% H_2SO_4	20% H_2SO_4
Negative	Ninhydrin, Dragendorff	Ninhydrin, Dragendorff	Ninhydrin, Dragendorff

は -647, IMU-0051-2-3-10 は -194 と大きく異なる値を示した。さらに NMR スペクトラムの結果を解析して IMU-0051-2-3-7 と IMU-0051-2-3-9 は isochaetochromin B₁ および isochaetochromin B₂ と物理化学的性質および機器分析データが文献と一致したので同一化合物であることが明らかとなった。しかし、IMU-0051-2-3-10 化合物はデータが一致するものがなく、新しい化合物であると考えられた。

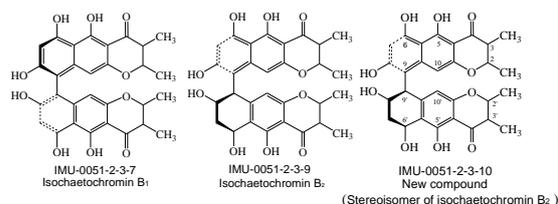


Fig. 3 Structures of IMU-0051-2-3-7, IMU-0051-2-3-9 and IMU-0051-2-3-10

(6) HIF-1 α および HIF-1 β に対する IMU-0051-2-3-7、IMU-0051-2-3-9 および IMU-0051-2-3-10 の作用

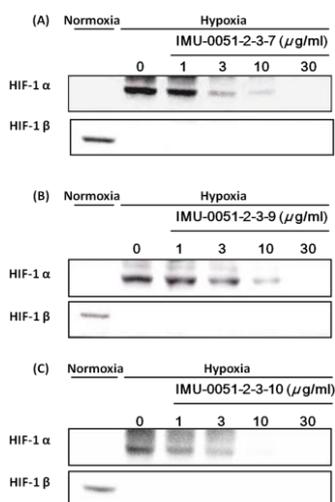


Fig. 4 Effects of IMU-0051-2-3-7, IMU-0051-2-3-9 and IMU-0051-2-3-10 on hypoxia-accumulated HIF-1 α and HIF-1 β proteins in HeLa cells.

ヒト子宮頸がん細胞 HeLa を低酸素条件下 (1% O₂) で 4 時間培養し、HIF-1 α のタンパク質を Western blot 法により検出したところ、HIF-1 α タンパク質細胞質内蓄積のレベルは低酸素下で著しく上昇した。一方、細胞質内の HIF-1 β タンパク質のレベルは大きく低下していた。また、1~30 μ g/ml の濃度の IMU-0051-2-3-7、IMU-0051-2-3-9、IMU-0051-2-3-10 化合物を添加しても HIF-1 β タンパク質のレベル低下に変化しなかった。しかし、低酸素下による細胞質内 HIF-1 α タンパク質レベルの上昇は 1~30 μ g/ml の濃度範囲の IMU-0051-2-3-7 化

物により濃度依存的に抑制された。また、IMU-0051-2-3-9 は 3~30 μ g/ml の濃度範囲で、IMU-0051-2-3-10 は IMU-0051-2-3-7 と同様に 1~30 μ g/ml の範囲で濃度依存的に抑制作用を示した (Fig. 4)。

(7) 各種がん細胞において低酸素条件下による HIF-1 α および HIF-1 β の核移行に対する IMU-0051-2-3-7 の作用

単離された 3 つの活性成分のうち最も強い抑制活性を示した IMU-0051-2-3-7 を用いて HeLa を含むヒト乳がん細胞 MCF-7 および T47D 細胞に対して核内 HIF-1 α および HIF-1 β のタンパク質レベルを Western blot 法により検出した。

低酸素条件下 (1% O₂) で HeLa、MCF-7 および T47D 細胞を 4 時間培養すると、HIF-1 α タンパク質の核内レベルは通常の酸素条件と比べ著しく上昇した。また、HIF-1 β タンパク質の核内レベルも HIF-1 α 同様に变化した。その条件下で、HeLa 細胞において IMU-0051-2-3-7 は 1~10 μ g/ml の濃度範囲で HIF-1 α のタンパク質の核内レベルを濃度依存的に抑制した。しかし、HIF-1 β タンパク質の核内レベルにおいては若干の変化は見られたものの殆ど抑制活性を示さなかった。また、IMU-0051-2-3-7 は 30 μ g/ml の濃度では HeLa 細胞において細胞数の減少が観られた。同じ条件下で、MCF-7 および T47D 細胞に対して IMU-0051-2-3-7 は 3~30 μ g/ml の濃度範囲で HIF-1 α のタンパク質の核内レベルを濃度依存的に抑制したが、HIF-1 β タンパク質に関しては HeLa 細胞と同様に若干の変化は見られたものの殆ど抑制活性を示さなかった (Fig. 5)。しかし、細胞数においては HeLa 細胞と違い変化は見られなかった。

HeLa 細胞において IMU-0051-2-3-7 の HIF-1 α タンパク質の核内レベルに対する抑制活性は HIF-1 α タンパク質の細胞質内レベルに対する抑制活性とほぼ一致した。また、核内 HIF-1 α タンパク質のレベルの検出は細胞質内と比べプロテアソームの影響も少なくはっきりとした結果を得ることができた。

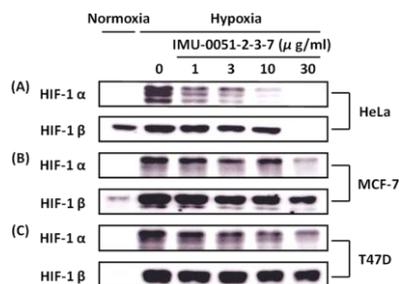


Fig. 5 Effects of IMU-0051-2-3-7 on hypoxia-accumulated HIF-1 α and HIF-1 β proteins in nuclear of HeLa cells, MCF-7 cells and T47D cells.

(8) IMU-0051-2-3-7 による HIF-1 α の核内蓄積抑制とその作用機序

がん細胞が低酸素の状態を刺激を受けて HIF-1 α タンパク質を細胞内で蓄積する際には、Raf-MEK-1-p44/42 MAP kinase 経路、PI3 kinase-Akt-mTOR 経路またはミトコンドリアからの ROS (reactive oxygen species) などの細胞内シグナル伝達経路がその蓄積機構に深く関わっているとされている。したがって、MEK-1 阻害薬である U0126、PI3 kinase 阻害薬である LY294002 およびミトコンドリア電子伝達系 Complex 1 阻害薬の rotenone を用いて HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積を抑制する作用機序について解析した。

(9) 低酸素条件下また DF0 刺激による HIF-1 α 、 β の核内タンパク質レベルに対する様々なシグナル伝達阻害薬の作用

低酸素条件下または DF0 刺激で HeLa 細胞を 4 時間培養すると、HIF-1 α 、 β タンパク質の核内レベルは通常の酸素条件と比べ共に著しく上昇した。その条件下で MEK-1 阻害薬である U0126 は 10 μ M 濃度で HIF-1 α タンパク質の核内レベルを抑制した。しかし、HIF-1 β タンパク質の核内レベルにおいては若干の変化は見られたものの HIF-1 α タンパク質ほど抑制活性を示さなかった。一方、DF0 刺激において U0126 は HIF-1 α 、 β タンパク質の核内レベルを殆ど抑制しなかった。また、同じ条件下で PI3 kinase 阻害薬である LY294002 は 50 μ M の濃度で HIF-1 α タンパク質の核内レベルを抑制した。また、その他の低酸素下 HIF-1 β タンパク質の核内レベル、DF0 刺激による HIF-1 α 、 β の核内タンパク質レベルにおける抑制作用傾向は U0126 と非常に類似していることが示唆された。一方、ミトコンドリア電子伝達系 Complex 1 阻害薬の rotenone (0.1 μ M) は低酸素下または DF0 刺激共に HIF-1 α 、 β タンパク質の核内レベルを強く抑制した (Fig. 6)。これらの結果から、IMU-0051-2-3-7 の HIF-1 α 、 β のタンパク質核内レベルにおける抑制作用傾向は U0126 または LY294002 の阻害傾向と類似していることが示唆された。

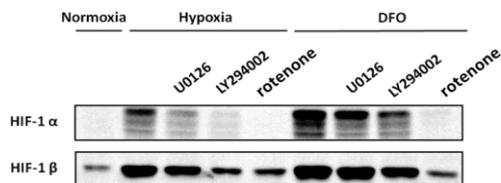


Fig. 6 Effects of U0126, LY294002 and rotenone on hypoxia-accumulated or DF0-accumulated HIF-1 α and HIF-1 β proteins in nuclear of HeLa cells.

(10) 低酸素条件下における Akt および p44/42 MAP kinase のリン酸化に対する各種阻害薬の作用

IMU-0051-2-3-7 の HIF-1 α 、 β の核内タンパク質レベルに対する抑制活性が U0126 および LY294002 の阻害傾向と非常に類似している (Fig. 6) ことから、2 時間の低酸素条件下で生じる p44/42 MAP kinases および Akt のリン酸化に対する IMU-0051-2-3-7 の影響について実験を行った。まず、HeLa 細胞を低酸素条件下で 120 分間培養すると p44/42 MAP kinases および Akt の再リン酸化は上昇した。その条件下で U0126 (10 μ M)、LY294002 (50 μ M)、rotenone (0.1 μ M) および 10 μ g/ml の濃度の IMU-0051-2-3-7 を添加してそれぞれのリン酸化を検出したところ、p44/42 MAP kinases のリン酸化に対しては U0126 のみ抑制活性を示し、Akt のリン酸化に対しては LY294002 のみ抑制活性を示した。なお、10 μ g/ml の濃度の IMU-0051-2-3-7 は両方のリン酸化に対して抑制活性を示さなかった (Fig. 7)。

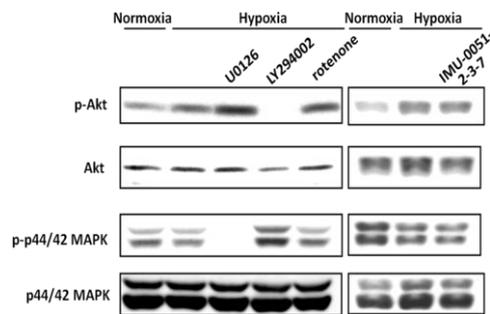


Fig. 7 Effects of U0126, LY294002, rotenone and IMU-0051-2-3-7 on hypoxia-induced phosphorylation of Akt and p44/42 MAP kinases in HeLa cells.

(11) 総括

糸状菌の 126 培養画分でスクリーニングを行った結果、最も HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制活性の強かった IMU-0051 の fraction 2 が選択された。糸状菌 IMU-0051 株はいわき市三崎公園で採集した土壌より分離され、Pitt の分離法に従って菌学を行った結果、*Penicillium* 属と同定された。本菌株を米を主成分とする生産培地で 25 日間静置培養し、酢酸エチルを用いて抽出した後、得られた抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離して最終的に ODS カラムを用いて分取 HPLC を行って 3 つの活性成分を単離した。黄色粉末状物質で単離された 3 成分は NMR を初めとする各種機器分析の解析により IMU-0051-2-3-7 は isochaetochromin B₁ であり、IMU-0051-2-3-9 は isochaetochromin B₂ であることが明らかとなり、IMU-0051-2-3-10 は新規化

化合物であることが明らかとなった。

IMU-0051 株から活性成分として単離された 3 つの化合物は HeLa 細胞において低酸素条件下で細胞質内に蓄積する HIF-1 α タンパク質を濃度依存的に抑制した。そのうち活性の強かった IMU-0051-2-3-7 を用いて 3 種類の細胞で低酸素下または DFO 刺激による核内に移行した HIF-1 α タンパク質レベルを検討した。その結果、全ての細胞において IMU-0051-2-3-7 は低酸素下によって核移行した HIF-1 α タンパク質を濃度依存的に強く抑制し、低酸素下によって核移行した HIF-1 β タンパク質核内レベルには殆ど抑制活性を示さなかった。IMU-0051-2-3-7 の抑制作用は HIF-1 α タンパク質に選択的であることが明らかになった。一方、DFO 刺激により核移行した核内 HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対する作用は低酸素条件のように強い抑制活性は見られなかった。以上の結果から、IMU-0051-2-3-7 は低酸素下の核内 HIF-1 α タンパク質レベルに対して最も強い活性を示し、DFO 刺激により核移行した核内 HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対する作用が弱いことから、がん治療における選択的な治療薬として副作用の少ない抗腫瘍薬になる可能性が示唆された。

がん細胞が低酸素下で HIF-1 α タンパク質を細胞内で蓄積するには、p44/42 MAP kinase 経路 PI3 kinase-Akt-mTOR 経路またはミトコンドリアからの ROS などの細胞内シグナル伝達経路がその蓄積機構に深く関わっている。そこで、IMU-0051-2-3-7 の抑制作用機序を明らかにすることを目的に 3 つの経路の阻害薬を用いて作用機序の解析を行った。低酸素条件下あるいは DFO 刺激で U0126、LY294002、rotenone を添加すると低酸素下で 3 つの阻害薬は HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対して強い抑制活性を示し、DFO 刺激では U0126 および LY294002 は弱い抑制活性を、rotenone は低酸素下および DFO 刺激共に強い抑制活性を示した。以上のことから、IMU-0051-2-3-7 の HIF-1 α 、 β の核内タンパク質レベルにおける抑制作用傾向と U0126 または LY294002 の阻害傾向と類似していることが示唆され、p44/42 MAP kinase および Akt のリン酸化に対する IMU-0051-2-3-7 の効果について解析したところ、両方共に抑制活性は示さなかった。

以上の知見から、IMU-0051-2-3-7 による低酸素下 HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制作用はいままで知られている p44/42 MAP kinase、Akt シグナル経路およびミトコンドリア経路を介さないことが明らかとなり、新しい経路の存在が強く示唆された。今後、これらの化合物の作用機序が解析出来れば、新しい作用機序を持つがん分子標的薬に

なる可能性が高いと思われる。

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 9 件)

1) R. Uchida, M. Iwatsuki, Y. P. Kim, S. Ohte, S. Omura, H. Tomoda “Nosokomycins, new antibiotics discovered in an in vivo-mimic infection model using silkworm larvae. I: Fermentation, isolation and biological properties.” *J. Antibiotics*, 査読有, 2010, 151-155

2) M. Ozawa, T. Etoh, M. Hayashi, K. Komiyama, A. Kishida, A. Ohsaki, “TRAIL-enhancing activity of Erythrin alkaloids from *Erythrina velutina*.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 査読有, 2009, 234-236

3) A. Fukumoto, Y. P. Kim, A. Matsumoto, Y. Takahashi, K. Shiomi, H. Tomoda S. Omura “Cyslabdan, a New Potentiator of Imipenem Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Streptomyces* sp. K04-0144 I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Structural Elucidation” *J. Antibiotics*, 査読有, 2009, 1-6

[学会発表] (計 6 件)

(1) 低酸素下 HIF-1 α の細胞内蓄積抑制作用を有する化合物の作用機序

金容必、関寧、江藤忠洋、林正彦、田中晴雄
日本薬学会 第 131 年会 (静岡) (2011)

(2) 土壌糸状菌由来 chaetochromin 類の低酸素応答性転写因子 HIF-1 に対する作用

関寧、金容必、江藤忠洋、林正彦、田中晴雄
日本薬学会 第 130 年会 (岡山) (2010)

(3) TLR シグナル伝達阻害物質 berkeleyacetal C の標的分子の解明

江藤忠洋、金容必、田中晴雄、林正彦
日本薬学会 第 130 年会 (岡山) (2010)

(4) 土壌由来糸状菌の生産する抗炎症物質 berkeleyacetal C の作用機序に関する研究

江藤忠洋、金容必、田中晴雄、林正彦
日本薬学会 第 129 年会 (京都) (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 容 必 (KIM YONGPIL)

いわき明星大学・薬学部薬学科・准教授
研究者番号：70337997

(2) 研究分担者

林 正彦 (HAYASHI MASAHIKO)

いわき明星大学・薬学部薬学科・教授
研究者番号：20164965