

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591115

研究課題名（和文） 単糖骨格由来合成化合物の造血器腫瘍治療薬開発に関する研究

研究課題名（英文）

Development of phosphor sugar derivatives for hematological malignancy therapy

研究代表者

中村 悟己 (NAKAMURA SATOKI)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20377740

研究成果の概要（和文）：白血病細胞に対して特異的に作用し、その進行を抑え込む新しい分子標的治療薬の開発の基礎的研究を行った。人工合成低分子化合物の設計、合成、その標的分子（遺伝子や蛋白質）の同定、作用機序を明らかにし、白血病を含めた様々な癌腫に効果があることが示された。本研究成果に基づき、より特異性の高い化合物の合成と臨床応用への基礎的研究を継続していきたい。

研究成果の概要（英文）：We investigated the synthesis, identification of target molecules, and characterization of molecular targeted drugs as a new class of potential anti-proliferative materials for leukemia cells and other cancer cells. We will perform the development of cancer-specific drugs for cancer therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：7209

キーワード：癌、シグナル伝達、糖化合物、薬理学、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

白血病の治療はこれまで他のどの腫瘍に比較しても治癒を目指した治療が行われてきました。白血病治癒を目指すためには、白血病細胞を完全に根絶しなくてはならないとする“Total cell kill”の概念の元に、これまで数多くの抗癌剤による強力な化学療法が行われてきました。しかしながら、

抗癌剤による治療の最大の問題点は、腫瘍細胞への特異性が低いことです。また、再発を繰り返す症例では次第に抗癌剤に対して耐性を示す難治性疾患に進展するようになります。これらの事実から抗癌剤治療の限界とともに、更に優れた新たな概念の治療法の開発が必要であることが推測されます。また、驚くべき有効性を示すレチノイン酸による

急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法、慢性骨髄性白血病に対する BCR/ABL 選択的チロシン・キナーゼ阻害薬 STI571 等の分子標的療法は臨床的にも有効であることから、癌化の責任遺伝子産物に特異的選択的に作用する分子標的療法が最も理想的であると考えられます。

我々は、単糖のフルクトースを基本骨格とし、この糖の環状構造の酸素原子をリンで置換し、更に側鎖をハロゲン化原子に置換した化合物を世界で初めて化学合成することに成功し、リン糖誘導体 (TMPP, DMPP) と命名しました。これらの化合物には、白血病細胞の増殖を抑制し、また、細胞周期の停止を誘導することがわかりました。また、これらの化合物の正常造血細胞への毒性はほとんど認められませんでした。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、もっとも抗腫瘍効果の強い TMPP を中心に、抗腫瘍効果をしめす作用機序 (シグナル経路や誘導遺伝子) とその標的分子を明らかにし、in vivo での抗腫瘍効果を評価し、新しい分子標的治療薬の開発の基礎的研究を行うことを目的としました。

3. 研究の方法

(1)TMPP の化学合成と抗腫瘍効果の評価。
TMPP の細胞増殖抑制効果を種々の白血病細胞株を用いて IC₅₀ で評価した。白血病細胞の細胞周期に与える効果とアポトーシス誘導効果をフローサイトメトリーにて解析した。細胞周期とアポトーシス関連蛋白質へ及ぼす効果を western blot にて評価した。

(2)TMPP,DMPP の標的蛋白質の同定
白血病細胞における標的分子の同定のためにドッキングシュミレーションソフトを用

いて解析した。

(3)In vivo での抗腫瘍効果について明らかにする。

白血病細胞株や乳癌、前立腺癌、肺癌、大腸癌、胃癌等の他の癌細胞を NOD/SCID マウスに移植し、In vivo における薬剤の抗腫瘍効果の評価を、腫瘍容積を算出し、腫瘍の増大、縮小にて評価し、マウスの生存率を経時的に解析する。同時に、死亡マウスと生存マウスにおける肝臓、肺、心臓等各種類の臓器を摘出し、TMPP,DMPP 投与による副作用や臓器への影響の有無を確認する。

(4)臨床検体を用いた抗腫瘍効果の検討。

白血病臨床検体と造血前駆細胞に及ぼす影響を cell viability にて評価する。

白血病患者及びその他の癌患者から得られた臨床検体における、TMPP、DMPP の抗腫瘍効果を評価します。

(5) TMPP 処理により発現誘導される 遺伝子の癌細胞での影響。

我々が、TMPP 処理により白血病細胞株からクローニングされた 8 種類の遺伝子は① BM02、② Q9P092、③ NP_054886.1、④ P2RY8、⑤ SUI12、⑥ XP_496721.1、⑦ NP_057211.4、⑧ Q8TDK5 でした。白血病細胞で認められた細胞増殖抑制効果、アポトーシス誘導効果が、他の癌細胞においても認められるかどうかを評価します。また、遺伝子から蛋白合成を行い、その蛋白質の抗腫瘍効果についても評価します。

(6) ノックアウトマウスによる同定遺伝子の発生、分化に及ぼす影響の検討。

8 種類の遺伝子①BM02、②Q9P092、③ NP_054886.1、④ P2RY8、⑤ SUI12、⑥ XP_496721.1、⑦NP_057211.4、⑧Q8TDK5 のそれぞれのノックアウトマウスを作成し、造血系細胞の分化への影響やその他の臓器の発生に関する役割を明らかにする。

(7) TMPP, DMPP 及びその派生物による癌治療への応用。

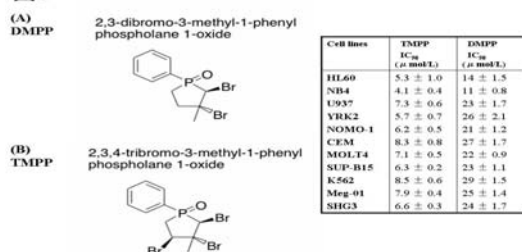
TMPP, DMPP の精製を向上させ、より低濃度での抗腫瘍活性を持つ化合物とすることや、新たに低濃度で効果を持つ化合物を合成する。

4. 研究成果

(1) TMPP の化学合成と抗腫瘍効果。

TMPP と DMPP の細胞増殖抑制効果を種々の白血病細胞株を用いて IC₅₀ で評価した (図 1)。TMPP は平均 IC₅₀ が 6.25 μM、DMPP の平均 IC₅₀ は 23.7 μM であった。

図 1



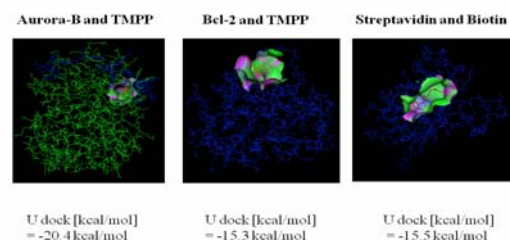
リン糖誘導体による白血病細胞の細胞周期に与える効果とアポトーシス誘導効果の検討では、白血病細胞株 U937 細胞において、10 μM の TMPP と 20 μM の DMPP で処理 16 時間後より、S 期、G2/M 期の分画の増加が認められ、G1 期の分画の減少が認められた。S 期と G2/M 期の増加は DMPP よりも TMPP の方が強く認められた。また、TMPP による細胞周期とアポトーシス関連蛋白質へ及ぼす効果の検討では白血病細胞株 U937 と YRK2 細胞を用いて、10 μM と 20 μM の TMPP で FoxM1、Skp2、Cdc25B、Cyclin D1、Survivin、KIS、Aurora kinase B は TMPP の濃度依存的に発現低下が認められ、CDKI の p27 と p21 の発現は TMPP の濃度依存的に増加が認められた。また、25 μM と 50 μM の TMPP で濃度依存的な Caspase9 と Caspase3 の活性化が認められ、PARP の分解も同様の結果であった。さらに、bcl-2 発現についても TMPP

は濃度依存的に減少することが示された。

(2) TMPP の標的蛋白質の同定。

TMPP が直接に影響する分子を同定するためにドッキングシミュレーションソフトを用い、western blot 解析で用いた蛋白質の中で、立体構造の判明している Aurora-B、Bcl-2 について検討した。ドッキングの度合 (ドッキングエネルギー) をひずみを考慮して、 $U_{dock} [kcal/mol]$ 値 ($U_{dock} = U_{ele} + U_{vdw} + U_{strain}$) で表す。この値がマイナスに大きいほどドッキングしたとき安定であることを示す。対照として、Streptavidin と Biotin の結合を計算すると、 $U_{dock} = -15.5$ であった。Aurora-B と Bcl-2 はそれぞれ、-20.4 と -15.3 であり、TMPP と Aurora-B の結合はかなり強力であり、TMPP の直接的な標的分子の一つである可能性が示された (図 2)。

図 2



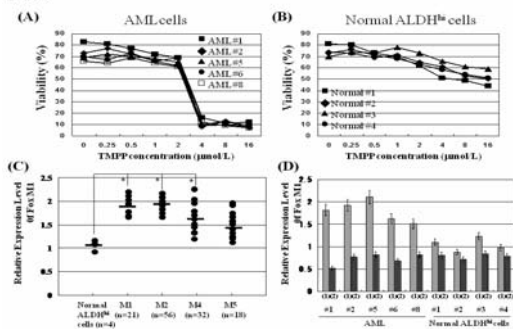
(3) In vivo での抗腫瘍効果。

マウス尾静脈から TMPP を投与した結果、マウス血管内で静脈炎等が併発し、血栓形成傾向が認められたため、静脈投与からの TMPP の抗腫瘍効果については出来ませんが、TMPP に暴露した K562 細胞はマウス内での増殖は抑制され、生着は認められませんでした。

(4) 臨床検体を用いた抗腫瘍効果の検討。白血病患者由来白血病細胞(#1; AML M1,

#2; AML M2, #5; AML M2, #6; AML M4, #8; AML M5)と正常健常人の造血幹細胞分画(ALDH^{hi}細胞)を各濃度にて 24 時間 TMPP 処理し、Cell viability を評価した。白血病細胞では 4 μ M から Cell viability の低下が認められたが、正常造血前駆細胞への影響は軽度であった(図 3 A,B)。また、TMPP による細胞周期司令塔としての機能を持つ FoxM1 への影響を定量的 PCR で評価したところ、白血病臨床検体では正常造血前駆細胞よりも、FoxM1 は高発現しており(図 3 C)、10 μ M TMPP の 24 時間処理により白血病細胞で優位に低下させることが明らかとなった(図 3 D; (1)未処理、(2)TMPP 処理後)。

図 3



(5) TMPP 処理により発現誘導される遺伝子の癌細胞での影響。

8 種類の遺伝子①BM02、②Q9P092、③NP_054886.1、④P2RY8、⑤SUI12、⑥XP_496721.1、⑦NP_057211.4、⑧Q8TDK5 をクローニングし、白血病細胞へ遺伝子導入した結果、すべてにおいて増殖抑制効果が認められ、中でも③ NP_054886.1、⑥ XP_496721.1、⑦NP_057211.4 において、強い抗腫瘍効果が認められた。

(6) ノックアウトマウスによる同定遺伝子の発生、分化に及ぼす影響の検討。

③ NP_054886.1、⑥ XP_496721.1、⑦ NP_057211.4 を含めたノックアウトマウス

は現在作成中であり、今後、順次評価していく予定である。

(7) TMPP, DMPP 及びその派生化合物による癌治療への応用。

TMPP 合成過程において高濃度の合成を行えるようになったため、 μ M 単位の濃度から nM 単位の濃度での抗腫瘍効果を示すことができるようになりました。さらに、リン糖骨格における側鎖への結合物質をその他のハロゲン分子(ヨウ素)へ変更することにより、白血病細胞への抗腫瘍活性をもつ化合物の合成も行い、今後、評価していく予定です。

以上の研究成果から TMPP の抗白血病効果は in vitro においては作用機序、標的分子も明らかにすることができましたが、in vivo においては血管内での凝固促進作用や炎症誘発作用が認められたため、TMPP の溶媒変更やより低濃度での抗腫瘍効果を今後評価していく必要があると考えられました。また、新たに合成した化合物についての抗腫瘍活性評価を今後継続していく必要があると考えら、造血器腫瘍治療薬開発の基礎的研究の成果を今後の臨床応用への可能性につながると考えられました。

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 20 件)

- ① Nakamura S, Hirano I, Okinaka K, Takemura T, Yokota D, Ono T, Shigeno K, Shibata K, Fujisawa S, Ohnishi K. **The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Carcinogenesis*.**

- 31, 2012-2021, 2010 (査読有)
- ② Yamashita J, Suyama T, Asai K, Yamada M, Niimi T, Fujie M, Nakamura S, Ohnishi K, Yamashita M. **Research and development of phospho sugar anti-cancer agents with anti-leukemic activity.** *Heterocyclic communications*. 2, 89-98, 2010 (査読有)
- ③ Yamada M, Asai K, Yamashita J, Suyama T, Niimi T, Maddali K, Fujie M, Nakamura S, Kimura M, Tanaka Y, Toda M, Yamashita M. **Synthesis of some 1-aryl-2,3-dibromophospholanes as novel anti-cancer agents.** *Heterocyclic communications*. 2, 165-171, 2010 (査読有)
- ④ Fujie M, Nakamura S, Asai K, Niimi T, Yamashita J, Kiyofuji K, Shibata K, Suzuki M, Aoshima R, Urano T, Yamashita M. **A novel phospho sugar analogue: synthesis and evaluation of 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-oxide as a new class of potential anti-proliferative materials for leukemia cells.** *Heterocyclic Communications*. 30, 945-950, 2010 (査読有)
- ⑤ Yamada M, Yamashita M, Suyama T, Yamashita J, Asai K, Niimi T, Ozaki N, Fujie M, Maddali K, Nakamura S, Ohnishi K. **Preparation and characterization of novel 4-bromo-3,4-dimethyl-1-phenyl-2-phospholene 1-oxide and the analogous phosphorus heterocycles or phospho sugars.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20(19): 5943-5946, 2010. (査読有)
- ⑥ Nakamura S, Yamashita M, Yokota D, Hirano I, Ono T, Fujie M, Shibata K, Niimi T, Suyama T, Maddali K, Asai K, Yamashita J, Iguchi Y, Ohnishi K. **Development and pharmacologic characterization of**

deoxybromophospho sugar derivatives with antileukemic activity. *Investigational New Drugs* 28(4):381-91, 2010. (査読有)

- ⑦ Fujie M, Nakamura S, Asai H, Yamashita J, Kiyofuji K, Yamashita M. **A novel phospho sugar analogue: synthesis and evaluation of 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-oxide having potential anti-proliferative effects for human tumors.** *Journal of Environmental Biology* 30(6): 945-50, 2009. (査読有)
- ⑧ Ito S, Yamashita M, Niimi T, Fujie M, Valluru KR, Totsuka H, Buchammagari H, Maddali KR, Nakamura S, Asai K, Suyama T, Yamashita J, Iguchi Y, Gang Y, Oshikawa T. **Preparation and Characterization of Phospholenes and Phospho Sugars as Novel Anti-cancer Agents.** *Heterocyclic Communications*. 15: 23-30, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① Nakamura Satoki; Identification of target molecules and anti-leukemic effects of novel phospho sugar derivative, TMPP. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research. 2010 年 4 月 19 日, Washington DC, USA.
- ② Nakamura Satoki; Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospho sugar derivatives with anti-leukemic effects: Inhibition of cell cycle progression through FoxM1 regulation. 100th annual meeting of American Association for Cancer Research, 2009 年 4 月 20 日, Denver, Colorado, USA.
- ③ 山下 光司; 癌 (がん) の早期発見・早期治療のための医用材料のイノベーション

ン. イノベーションジャパン 2009, 2009
年 9 月 16 日～18 日, 東京国際会議場、東京

- ④「中村 悟己; 新規合成リン糖誘導体
TMPP の標的分子同定と抗白血病効果の
機序の解明. 第 71 回 日本血液学会総会,
2009 年 10 月 23 日, 国立京都国際会館、
京都

- ⑤「
〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 1 件)

名称: 含リン化合物及び抗腫瘍剤
発明者: 山下光司、中村悟己、藤江三千男
権利者: 国立大学法人静岡大学
種類: 特許
番号: 特願 2007-35083
出願年月日: 平成 19 年 2 月 15 日
国内外の別: 国内

- 取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 悟己 (NAKAMURA SATOKI)
浜松医科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 2 0 3 7 7 7 4 0

(2) 研究分担者

小野 孝明 (ONO TAKAAKI)
浜松医科大学・がん教育センター・助教
研究者番号: 4 0 4 0 2 2 7 6

(3) 研究分担者

藤江 三千男 (FUJIE MICHIO)

浜松医科大学・実験実習機器センター・技
術専門職員

研究者番号: 9 0 3 9 7 3 7 3

(4) 研究分担者

大西 一功 (OHNISHI KAZUNORI)
浜松医科大学・医学部附属病院・教授
研究者番号: 8 0 2 5 2 1 7 0