

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20611015  
 研究課題名（和文） 水溶性NF- $\kappa$ B阻害剤のデザイン・合成と卵巣癌の抑制  
 研究課題名（英文） Molecular design and synthesis of soluble NF- $\kappa$ B inhibitor and suppression of ovarian carcinoma  
 研究代表者  
 梅澤 一夫（UMEZAWA KAZUO）  
 慶應義塾大学・理工学部・教授  
 研究者番号：70114402

## 研究成果の概要（和文）：

私たちの見出した DHMEQ は特異性が高く、in vivo で有効な NF- $\kappa$ B 阻害剤であるが、溶解性が低い。そこで、活性コア以外の部分をかえて、溶解性を向上させた。また、酵素を用いて、医薬開発に必要な光学活性体を効率的に合成できるようにした。一方、DHMEQ は培養卵巣癌細胞の浸潤を抑制し、その新しい機構として CXCL12/CXCR4 系および下流のタンパク質分解酵素の発現抑制が関与することを見出した。さらに DHMEQ は卵巣癌細胞の抗癌剤感受性を向上させ、卵巣癌担癌マウスへの DHMEQ の投与で悪液質が抑えられることがわかった。

## 研究成果の概要（英文）：

Our newly found NF- $\kappa$ B inhibitor DHMEQ is very specific and ameliorates many disease models in animal experiments. However, it is hardly soluble to most solvents. Then, we have prepared more soluble DHMEQ analogs. We found that DHMEQ inhibited cellular invasion of ovarian carcinoma cells. As the new mechanism of inhibition, inhibition of the CXCL12/CXCR4 system with downstream proteases was suggested to be involved. In addition, DHMEQ increased the sensitivity of ovarian carcinoma cells to anticancer agents, and suppressed cachexia in ovarian cancer-bearing mice.

## 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	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：DHMEQ; NF- $\kappa$ B; 卵巣癌; 分子デザイン; 腹腔内播種; 浸潤; 転移; 抗癌剤

## 1. 研究開始当初の背景

癌化学療法として従来から核酸合成阻害剤や細胞分裂阻害剤が広く使用されている。これらの抗癌剤は増殖の速い癌細胞に対して選択的に作用することもあるが、正常細胞でも増殖の速い、骨髄、消化管上皮、皮膚、生殖器等にしばしば傷害を与え、重篤な副作用を与える。近年、より選択的な抗癌剤を求めて、分子標的治療の開発が癌化学療法でも盛んになっている。

一方、私たちは 2000 年ごろに強力な NF- $\kappa$ B 阻害剤 dehydroxyepoxyquinomicin (DHMEQ)を発見した(J. Biol. Chem, 2002)。この化合物は毒性のない抗生物質 epoxyquinomicin の構造をもとに、NF- $\kappa$ B を阻害するように分子デザインして合成した。最近、阻害の分子標的が NF- $\kappa$ B の構成因子そのものであり、結合して、その DNA 結合能や核への移行が阻害されることが示唆された(J. Med. Chem. 277, 27625, 2008)。DHMEQ は p65 分子に 1 : 1 で共有結合することが MALDI TOF-MS の結果から示され、この阻害機構により、高い特異性が説明できるようになった。DHMEQ はラセミ体として合成され、キラルカラムで光学活性体に分けられる。そして(-)体のほうが高活性である(Tetrahedron 60, 7061, 2004)。構造活性相関として、フェニルの水酸基はオルトの必要があること、水酸基をなくしてもアルキル基やハロゲンにかえても失活し、OH を OMe または OEt にしても活性は保たれる、などがわかっている。さらに動物実験で予想以上に強力な抗炎症活性、抗癌活性を示した。DHMEQ はマウスのリウマチ、癌悪液質、糖尿病性網膜症モデルを、またラットで腎炎症

モデルを抑制した。特にリウマチモデルでは発症後に投与して骨破壊を抑制し、改善効果がみられている。さらにマウスの前立腺癌、膀胱癌、甲状腺癌、乳癌、膵癌、多発性骨髄腫、成人 T 細胞白血病モデルで抑制効果または延命効果を示した(Cancer Sci. 97, 900, 2006)。いずれの動物実験でも毒性はみられていない。このように動物実験で毒性がなく、活性が強いことから、現在、抗炎症剤として開発中で、前臨床試験が行われている。一方、開発における問題点として、DHMEQ には水に溶けにくいことや生産コストが比較的高い欠点がある。水溶性に優れた類縁化合物が得られれば、開発はずっと容易になることから、ケミカルバイオロジーの方法による今回のプロジェクトを構成した。

## 2. 研究の目的

動物に薬剤を投与するのに、投与部位として、技術的に簡単なことから、腹腔内投与が多く利用される。一方、臨床の治療では腹腔内投与はほとんど使われないが、婦人科領域の卵巣癌治療においては腹腔内投与がとりあげられることもある。それは卵巣癌は腹腔内に進入することが多いからである。そこで実験系と同じ腹腔内投与が通用する卵巣癌を DHMEQ の対象疾患として注目した。本研究では前半でまず、卵巣癌の培養細胞に対する、DHMEQ の抗癌活性、抗転移活性を培養細胞および動物実験で明らかにする。増殖抑制、アポトーシス誘導能のほか、特に、癌細胞の出す炎症性サイトカインに対する発現・分泌抑制効果や転移に關与する CXCR4, VEGF, MMP への発現抑制効果も明らかにする。卵巣癌細胞を用いた動物実験の結果も出す。そ

して、同時進行で始める水溶性 DHMEQ 誘導体の活性を評価して、構造活性相関を解析し、さらに絞り込んだ化合物をデザイン・合成する。そして抗癌活性が強く、毒性が低く、水溶性で開発に有利な化合物を選んで動物実験まで行う。このようにケミカルバイオロジーの手法を用いて、特に卵巣癌に対して、有用性の高い新規 NF- $\kappa$ B 阻害剤を提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究「水溶性 NF- $\kappa$ B 阻害剤のデザイン・合成と卵巣癌の抑制」はケミカルバイオロジーとして、化学および生物学両方の手法を用いる。化学面では、開発に必要な光学活性 DHMEQ をより効率的に合成できるようにする。さらに、糖をつけた DHMEQ をデザイン・合成する。糖の種類を変え、疑似糖も付加する。一方、DHMEQ の構造活性相関の研究を行い、活性を保ちながら、水溶性および優れたアナログを合成する。生物面では、未知である DHMEQ による卵巣癌細胞への増殖抑制、細胞死誘導を調べる。さらに、卵巣癌細胞株を用いて、アポトーシス誘導、抗アポトーシス因子の発現、炎症性サイトカインの分泌、浸潤活性、転移促進因子の発現などの点から調べる。それに比較して、合成した DHMEQ 誘導体の活性も調べる。特に、培養細胞を用いて転移抑制能を調べて、機構を解析する。さらに、卵巣癌を移植したマウスにおける DHMEQ の抑制効果を調べる。

### 4. 研究成果

(1)DHMEQ による CXCL12/CXCR4 系および卵巣癌細胞浸潤の抑制 (梅澤)

卵巣癌は婦人科癌の中では子宮癌について2番目に多い癌である。しかし、その死亡

数は他のどの婦人科癌より多い。それは転移能が高いことが一因であり、周辺部位に直接浸潤するだけでなく、リンパ管を通して骨盤内や腹部などに転移する。また血流に乗って、肝や肺などにも転移する。中でも卵巣癌に最もよくおこる転移は、腹腔への転移であり、転移は卵巣の表面からちょうど種をまくように癌細胞が腹膜に広がっていくので腹膜播種と言われている。腹膜播種は卵巣の周りに起こりやすいが、卵巣から遠く離れた腹膜である、横隔膜にもよくみられる。腹膜播種が進むと腹水がたまる。また、そこからリンパ節転移もよく起こる。このように腹腔への転移を起こしやすいので、卵巣癌治療には、抗癌剤を投与する際に、静脈内投与と併用して投与したほうが、効果が高いことが報告されている。

一方、梅澤らの研究室では NF- $\kappa$ B 阻害剤として、2000年に NF- $\kappa$ B 阻害剤 DHMEQ(dehydroxymethylepoxyquinomicin)を発見した。DHMEQは epoxyquinomicinCの構造をもとに、NF- $\kappa$ Bの阻害活性を持つように新規に合成された化合物である (Fig. 1)。DHMEQはラセミ体として合成され、光学分割後は(-)-DHMEQのほうが(+)-DHMEQより10倍活性が強い。(-)-DHMEQはNF- $\kappa$ B構成因子の特異的 cysteine 残基に結合して、DNAへの結合を阻害する。例えば p65においては38Cysを認識して結合する。DHMEQは多くの疾患モデルマウスに抑制を示すが、これらの動物実験では主に投与ルートとして腹腔内投与が用いられており、DHMEQにおいては腹腔内投与が、確立された効果のある投与方法といえる。

このように、抗癌剤の腹腔内投与がすでに行われているので、卵巣癌は、DHMEQの早期抗癌剤開発に適当な癌といえる。そこで(-)-DHMEQを用いて、卵巣癌細胞の浸潤能

に対する抑制効果を調べ、さらに(-)-DHMEQがケモカイン CXCR4 やマトリックス分解プロテアーゼなど、転移促進因子の発現に与える影響を検討した。

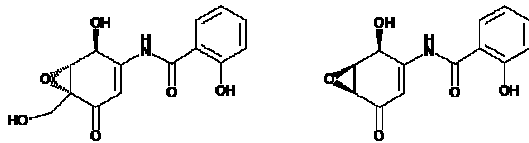


Fig. 1 epoxyquinomicin (左) から(-)-DHMEQ (右) の分子デザイン

3 種の卵巣癌細胞株から RMG1 を選び、RMG1 細胞において(-)-DHMEQ は恒常的に活性化している NF- $\kappa$ B を阻害した。次に転移において重要な浸潤能に与える(-)-DHMEQ の影響を検討した。Matrigel chamber assay を行い、(-)-DHMEQ により RMG1 細胞の浸潤は顕著に抑制された。

次に、(-)-DHMEQ の転移に関連する因子の発現抑制を調べたところ、ケモカイン/ケモカインレセプターの CXCL12/CXCR4 のどちらも抑制することがわかった。そこで、CXCR4 をノックダウンしたところ、意外なことに浸潤能が低下した(Fig. 2)。

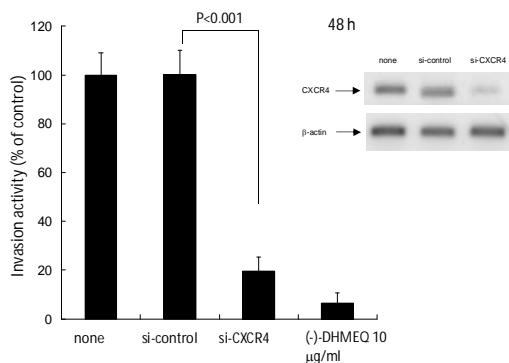


Fig. 2 CXCR4 ノックダウンによる浸潤の抑制。

さらに、CXCR4 をノックダウンした細胞と無処理の細胞で、どのようなタンパク質発

現がかわっているか、アレイ解析を行った。その結果、浸潤に関与するタンパク質として、MMP-9, uPA の発現が低下していることがわかった。この2つの低下はPCRでも確認した。この2つのタンパク質の発現は直接、NF- $\kappa$ B の支配下にある。そこで、(-)-DHMEQ を添加した場合には直接的低下と CXCL12/CXCR4 系を介した低下と両方が働くと考えられる。

以上の結果を Fig. 3 に図でまとめた。卵巣癌細胞において、(-)-DHMEQ を用いた研究で、NF- $\kappa$ B 阻害剤が細胞浸潤を阻害すること、および新しい浸潤のためのシグナルとして、ケモカイン/ケモカインレセプターの CXCL12/CXCR4 が autocrine に働くことを見出した。この結果は BBRC 403, 154, 2010 に発表した。

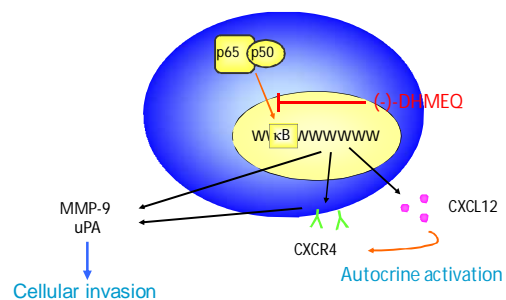


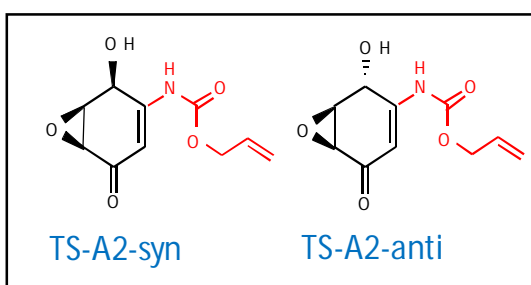
Fig.3 CXCL12/CXCR4 を介した卵巣癌細胞浸潤の活性化。

## (2) DHMEQ の構造活性相関と溶解性の向上した DHMEQ アナログの合成 (梅澤)

DHMEQ の新たな誘導体を合成し、溶解性の優れた化合物の創製を行うこととした。活性試験については、マクロファージにおいて、LPS 刺激により誘導される NO 産生が NF- $\kappa$ B に依存していることから、マクロファージ様 RAW264.7 細胞に対する NO 産生抑制効果を活性の指標とした。

サリチル酸部位を除去し、アミノ基を有す

る、最も単純な構造を有する化合物の合成を試みたが、不安定であったため生物活性の解析が困難であった。そこで、より安定な誘導体の創製を目指し、アミノ基に数種類の置換基を結合させたところ、allyloxycarbonyl 基 (Alloc 基) を付与した化合物(Fig. 1)の anti 体が比較的強い NO 産生阻害能を示した。この anti 体は DHMEQ と比べてメタノールやアセトニトリルといった極性溶媒に可溶で、化合物としての安定性も向上していることが分かった。

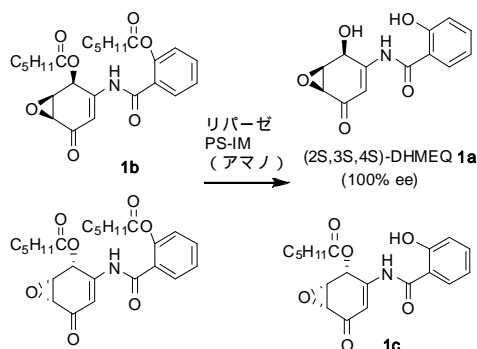


Soluble to MeOH and CH<sub>3</sub>CN at 1 mg/ml

Fig. 1 溶解性が向上した新しい誘導体

(3)水溶性誘導体調製に寄与しうる、新しい合成前駆体・中間体の創製 (須貝)

DHMEQ は多様な生理活性を示すが、非常に疎水性で、水溶性誘導体が求められている。一方で医薬開発のために安価な光学分割法が求められている。須貝、梅澤は(2S,3S,4S)-体の調製法として、ラセミ体ジアシル DHMEQ を酵素分割する方法を見出した。



さらに進んだ(2S,3S,4S)-DHMEQ の不斉

合成にあたり、エポキシ化に有効な新しい基質と反応条件を見出し、さらにリパーゼを用いて不要な鏡像異性体を除去するという、化学 - 酵素法を相乗的に活用するルートを確立した。

(4) DHMEQ による卵巣癌細胞の抗癌剤感受性向上 (阪埜)

卵巣癌は自覚症状に乏しく、しばしば進行した状態で発見され、婦人科癌の中で最も致死率が高い。特に卵巣明細胞腺癌は抗癌剤抵抗性症例が多く、40%~60%が 期で発見されるにもかかわらず他の組織型に比して予後不良である。現在、卵巣癌の標準的な化学療法として、白金製剤とタキサン製剤またはトポイソメラーゼ阻害剤 CPT-11 の併用による治療が行なわれているが、十分ではない。本研究で卵巣明細胞腺癌細胞株 RMG1 において DHMEQ が抗癌剤感受性を高めることが示された。動物実験では、卵巣癌担癌マウスへの DHMEQ の投与で悪液質が抑えられることがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及びには下線)  
〔雑誌論文〕(計50件)

1) 原著論文 (39件、すべて査読あり)

1. M. Hamada, Y. Niitsu, C. Hiraoka, I. Kozawa, T. Higashi, M. Shoji, K. Umezawa and T. Sugai:

Chemoenzymatic synthesis of (2S,3S,4S)-form, the physiologically active stereoisomer of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a potent inhibitor on NF-κB. Tetrahedron 66:7083-7087, 2010.

2. N. Miyanishi, Y. Suzuki, S. Simizu, Y. Kuwabara, K. Banno and K. Umezawa: Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 403: 154-159, 2010.

3. E. Suzuki, Y. Ninomiya and K. Umezawa: Induction of histidine decarboxylase in macrophages inhibited by the novel NF-kappa B inhibitor (-)-DHMEQ. Biochem. Biophys. Res. Commun. 379: 379-383, 2009.

4. I. Kozawa, K. Kato, T. Teruya, K. Suenaga and K. Umezawa: Unusual intramolecular N>O acyl group migration occurring during conjugation of (-)-DHMEQ with cysteine. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19: 5380-5382, 2009.

5. M. Yamamoto, R. Horie, M. Takeiri, I. Kozawa and K. Umezawa: Inactivation of nuclear factor kappa B components by covalent binding of (-)-dehydroxymethylepoxyquinomicin to specific cysteine residues. J. Med. Chem., 51: 5780-5788, 2008.

2) 原著論文以外総説等 (11件、査読なし)

1. 須貝威、梅澤一夫: 新しい NF-κB 阻害剤 DHMEQ の生物有機化学と抗炎症・抗がん剤への展望。化学と生物 印刷中。

〔学会発表〕(計 61 件)

1. 梅澤一夫: 阻害剤のケミカルバイオロジーから得られる NF-κB の疾患における役割。日本ケミカルバイオロジー学会 (招待講演) 2010.5.18 横浜

2. 嶋田知佳、鈴木絵里子、斉藤毅、石川裕一、西山繁、梅澤一夫: NF-κB 阻害物質 DHMEQ 活性 core 分子のデザインと生物活性 2010.5.18 横浜

3. 梅澤一夫: 転写因子に対する分子標的医薬の探索と抗癌活性。バイオ EXPO 特別講演 2009.7.3 東京

4. 宮西那実、梅澤一夫: (-)-DHMEQ による CXCL12/CXCR4 経路の卵巣癌細胞浸潤の抑制。(口演) 第 13 回がん分子標的治療学会学術総会 2009.6.25 徳島

5. 梅澤一夫: 生理活性物質の探索とヒト細胞機能の制御。第 26 回日本ヒト細胞学会学術集会 (特別講演) 2008.8.30 東京

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: Nrf2 活性化剤  
発明者: 梅澤一夫、袴田雅俊、後藤優子  
権利者: 慶應義塾  
種類: 用途  
番号: 特願 2010-230930  
出願年月日: 2010.10.13  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.umelab.net>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 一夫 (UMEZAWA KAZUO)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 70114402

(2) 研究分担者

須貝 威 (SUGAI TAKESHI)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 60171120

阪埜 浩司 (BANNO KOUJI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 70265875