

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06956

研究課題名（和文）間質細胞のcomplex Vを標的とした抗がん剤の創薬化学研究

研究課題名（英文）Medicinal Chemistry of Anti-tumor Agents Targeted at Stromal Complex V

研究代表者

渡辺 匠（Watanabe, Takumi）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長

研究者番号：80270544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：前立腺がん由来の細胞と対応する間質細胞との共培養条件下においては、ロイシノスタチンAが間質細胞由来のcomplex Vに作用し、その結果としてIGF-1の分泌を抑制することを明らかにした。すなわち、complex Vは抗がん剤探索における間質、すなわち正常細胞由来の適切な分子標的となりうることを示された。

また、ロイシノスタチンAの異常アミノ酸の一つであるAHMODをより単純な構造のアラニンに置換した類縁体（LCS-7）も活性を保持しているが、側鎖構造の大きな変更に伴いcomplex Vとの結合時のペプチド鎖全体のトポロジーがロイシノスタチンAのそれと異なることが示唆された（共同研究）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

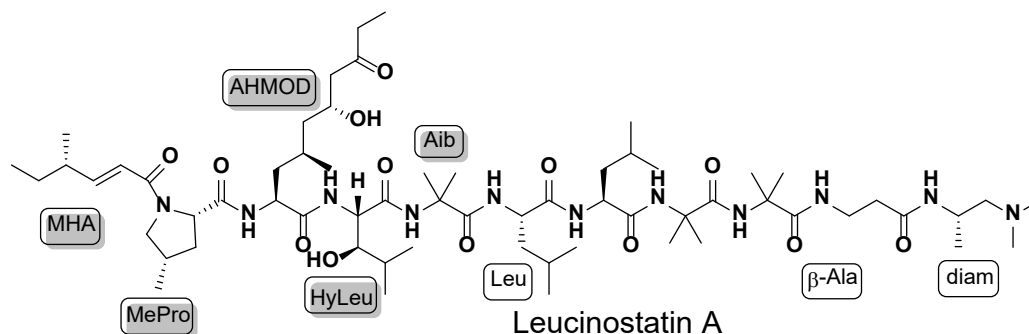
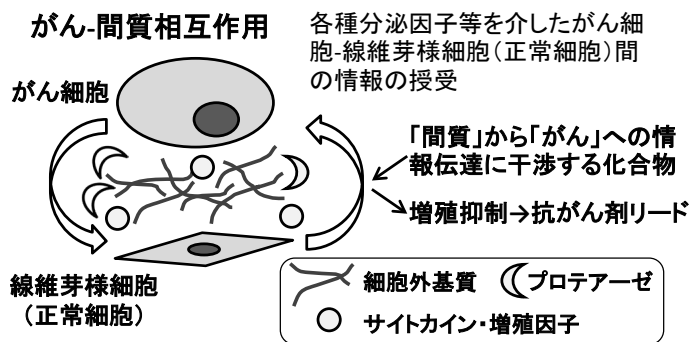
がん化学療法の分野においては現在、分子標的薬と抗体医薬が大きな成功を収めている。いずれもがん細胞に特徴的な標的をもつもので、従来の細胞毒と比較し優れた治療成績と良好なQOLをもたらしている。一方、がん組織に存在する正常細胞もがん細胞の増殖に関与していることも知られており、これが新しい抗がん剤の標的になればがん細胞の遺伝子不安定性に由来する容易な耐性獲得が回避される可能性があると考えられてきた。本研究では正常細胞のcomplex Vが抗がん剤の標的になりうることを示唆するに至り、将来的な新しいがん化学療法の方法論の構築に結び付く可能性がある点で意義をもつ。

研究成果の概要（英文）：It was found that leucicostatatin A acts on complex V of prostate stromal cells co-cultured with prostate tumor cells to inhibit exhibition of IGF-1. It proved that complex V from stromal cells can be a good target of antitumor agents. Changing an unnatural amino acid residue of leucicostatatin A, AHMOD, maintained its biological activity. However, it was suggested that the alteration of the side chain structure resulted in changes of topology of whole main chain structure of the peptide to make it bind to different position of the target enzyme from that for leucicostatatin A.

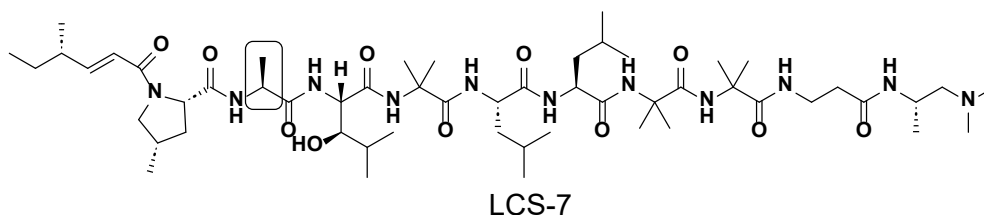
研究分野：医薬化学

キーワード：がん・間質相互作用 全合成 天然物 医薬化学

1. 研究開始当初の背景



低分子化合物に属する抗がん剤の中で、分子標的薬ががん化学療法の治療成績向上に果たした役割は大きい。その一方で、がん細胞における遺伝子の不安定性はこれら薬剤の標的分子の変異を容易に惹起し薬剤耐性へと帰結し、しばしば治療効果が継続しない。ところでがん組織はがん細胞だけではなく、周囲を取り巻く正常細胞（線維芽細胞等）を含む成分で構成された間質と混在した形で成立し、その間に見られる情報の授受をがん-間質相互作用と称する（上図上段）。特に、がん細胞のシグナルに応答し活性化を受け、がん細胞に有利な分泌因子（後述の IGF-I（インスリン様成長因子）など）を放出する間質の線維芽細胞は cancer-associated fibroblast (CAF) とよばれ、現在がん治療戦略上有力な標的の一つに挙げられる。申請者らはその研究分野が確立する黎明期からがん-間質相互作用に干渉しがん細胞の増殖を阻害する物質の探索に携わり、ペプチド系天然物ロイシノスタチン A（上図下段）に求める活性を見出した。更に最近、本化合物は前立腺がんにおける間質細胞のミトコンドリア電子伝達系 complex V を阻害することを明らかにした（投稿中）。正常細胞を標的とすることでその遺伝子の安定性に鑑み、原理的に耐性の生じにくい、既存薬にはない機序で奏功する抗がん剤リードの創製が期待される。更には、間質細胞の complex V 阻害によるがん治療戦略の拡張性、とりわけ難治性がんへの適用可能性にも興味を持たれる。



2. 研究の目的

本申請ではがん組織と周囲の間質との情報伝達に作用する天然物ロイシノスタチン A（上図右）の構造活性相関（SAR）研究を基盤に、正常細胞をターゲットとした画期的抗がん剤のリードとなり得る新たな生物活性物質の創製を目的とする。具体的にはこれまで得られた知見を活用し、(1) complex V 阻害活性を指標とした構造活性相関 SAR 研究の実施、(2) in vivo 評価を経た開発候補化合物の選定、(3) 難治性がんに対する適

用範囲拡大の検討とがん分子標的としての **complex V** の有用性評価、を基軸とした全く新しい作用機序の抗がん剤リード創製を目指すこととした。

3. 研究の方法

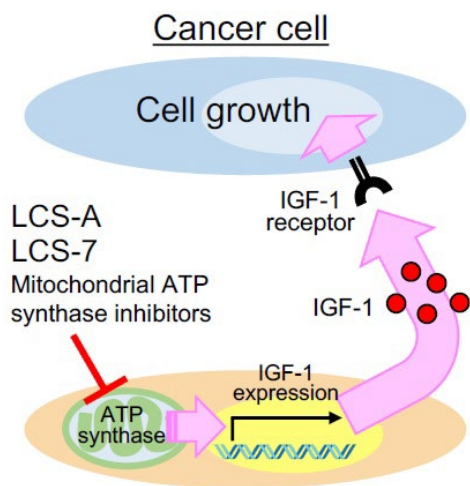
これまでにロイシノスタチンAを構成する各種アミノ酸のうち、活性発現に必須であるものを同定している。これを踏まえ、生物活性に対する重要性が相対的に低いアミノ酸残基、およびN末端アシル基に注目し、それぞれ入手容易なアミノ酸およびカルボン酸由来のアミドに置換する計画を立案した。異常アミノ酸については既に報告しているロイシノスタチンAの触媒的不斉全合成法に従い調製可能である。多段階合成を必要とする異常アミノ酸・AHMODを含有しない類縁体については全工程を自動合成機を用いることで調製が可能である。

生物活性に関しては、前立腺がん由来のDU-145細胞の増殖について、対応する間質細胞に由来するPrSC細胞の共存下（共培養条件）における阻害強度が非共存下よりも高い化合物を同定した上で、共存下における活性強度を比較することで評価するものとした。有望な化合物については**complex V**阻害活性の評価も検討する計画とした。

また、*in vitro*の活性が有望な化合物については適宜*in vivo*抗がん活性試験を実施することとした。ここではマウスに前立腺がん由来DU-145細胞と前立腺間質由来の細胞PrSCを移植し、がん組織の体積を比較し評価するものとした。

さらに、共同研究者（Indian Institute of Technology, Indore ; Saqib, U. と Baig, M. S.）によりロイシノスタチン関連化合物と**complex V**のドッキングスタディを行った。この際、既に報告のあるオリゴマイシンとの複合体の結晶構造をベースに最適化を行っている。

4. 研究成果

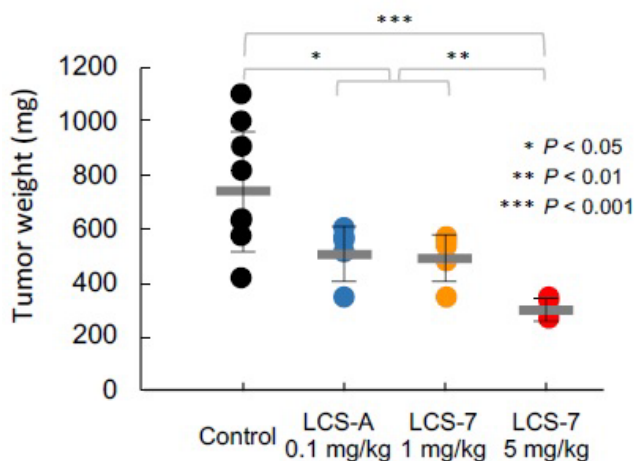
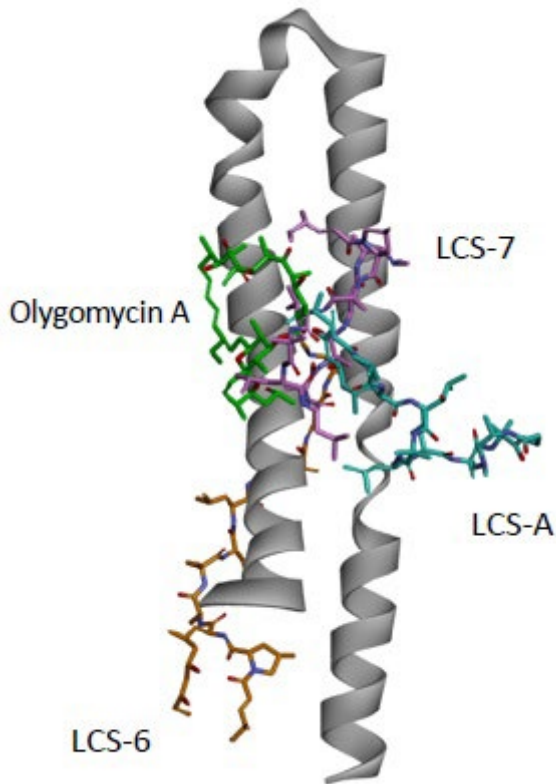
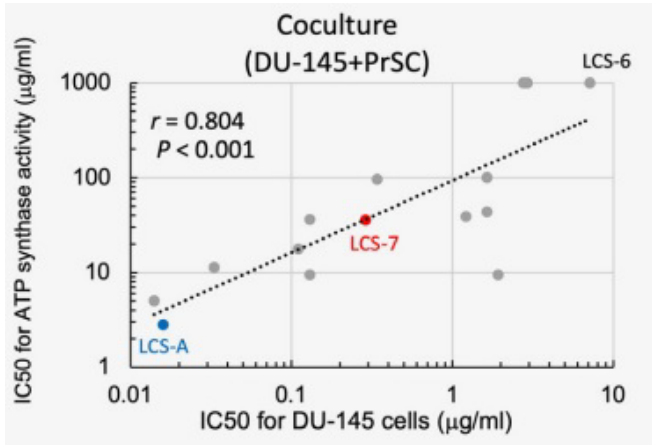


ロイシノスタチンA は前立腺間質由来の細胞PrSC共存下で培養した前立腺がん由来のDU-145細胞の増殖を、単独培養時と比較し有意に強く阻害した。研究協力者・川田のグループで細胞レベルでの生物活性を詳細に調べたところ、ロイシノスタチンA はPrSC細胞のIGF-1の発現と分泌を抑制することが判明した。この現象は同細胞内のミトコンドリアにおける呼吸鎖関連酵素の一つである**complex V**の阻害と相関していることもわかった（左図）。

本研究の開始以前に我々はロイシノスタチンAのアミノ酸残基の中で、共培養下でのDU-145細胞に対する増殖阻害活性発現に重要であるものを同定している（アラニンスキャン）。その結果、驚いたことに最も複雑な側鎖構造をもつAHMODをアラニンに変更しても、上記生物活性にほとんど影響しないことが見いだされた。そこで、アラニンスキャンに利用した各種ペプチドの中でマウスにたいする急性毒性が緩和された化合物があるか調べたところ、このAHMODをアラニンとしたLCS-7の毒性が減弱していることがわかった。

このLCS-7はロイシノスタチンAと同様に、**complex V**に対し阻害活性を示す。また、やはりロイシノスタチンAと同様にPrSC細胞のIGF-1の発現と分泌を抑制することもわかった（次頁グラフ）。ロイシノスタチンAとLCS-7について、上記の二つの生物活性強度に関し明確な相関がみられており、PrSC細胞の**complex V**が正常細胞由来の抗がん剤として有望な分子標的となりうることを示している。

ここで、将来的な合理的分子設計に活用することを念頭に、ロイシノスタチン関連化合物と**complex V**との相互作用様式を考察することとした。既に報告されている**complex V**とオリゴマイシンとの複合体の結晶構造に基づきロイシノスタチンAおよび



各種類縁体との結合様式を原子レベルで考察した. LCS-7) も活性を保持しているが, 側鎖構造の大きな変更に伴い complex V のサブユニット c との結合時のペプチド鎖全体の配向がロイシノスタチン A のそれと異なるとの計算結果が得られた. 但し, オリゴマイシン結合部位に対する親和性は双方とも良好であることも示唆される

(中段の図). 活性強度の低い類縁体 (LCS-6, 構造は割愛) は当該サブユニットの結合領域と相互作用は構築しうるものの, 他の類縁体やオリゴマイシンと比較し不十分であることも示唆されている.

また, ロイシノスタチン A (LCS-A と表記) と LCS-7 については共培養時と同じ細胞の組み合わせで間質細胞を含めた前立腺がんモデルマウスを作製し, in vivo 抗がん活性を調べている. 移植後 21 日目より下段ヒストグラムに示された用量の化合物を 4 日投与, 1 日休薬, 5 日投与, 1 日休薬, 5 日投与, 1 日投与しがんの体積変化を無投与群と比較・観察した. 但し, 高用量 LCS-7 は 2 日投与, 1 日休薬, 1 日投与, 1 日休薬, 2 日投与としたところで治療実験を中止した.

その結果, いずれのロイシノスタチン関連化合物も有意ながん退縮効果を示した. 但し, LCS-7 はロイシノスタチン A の約 10 倍の投与量を必要とする. LCS-7 を 50 倍量投与した際には顕著な治療効果を示す一方で, 毒性から休薬・中止を余儀なくされたことから投与量のコントロールが課題となる. 理想的には毒性との分離が望ましく, complex V 阻害活性を維持しながらこれが可能であるかが今後の課題となる.

なお, 「4. 研究成果」の各図は下記参考文献4からの引用である.

る.

※参考文献

1. Kawada, M.; Inoue, H.; Ohba, S. *et al. Int. J. Cancer*, **2010**, *126*, 810.
2. Abe, H.; Ouchi, H.; Sakashita, C. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11792.
3. Abe, H.; Kawada, M.; Sakashita, C. *et al. Tetrahedron* **2018**, *74*, 5129.
4. Ohishi, T.; Abe, H.; Sakashita, C. *et al. Int. J. Cancer*, **2020**, *146*, 3474.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida, J.; Ohishi, T.; Abe, H.; Ohba, S.; Inoue, H.; Usami, I.; Amemiya, M.; Oriez, R.; Sakashita, C.; Dan, S.; Sugawara, M.; Kawaguchi, T.; Ueno, J.; Asano, Y.; Ikeda, A.; Takamatsu, M.; Amori, G.; Kondoh, Y.; Honda, K.; Osada, H.; Noda, T.; Watanabe, T.; Shimizu, T.; Shibasaki M.; Kawada, M.	4. 巻 24
2. 論文標題 Mitochondrial complex I inhibitors suppress tumor growth through concomitant acidification of the intra- and extracellular environment.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103497	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. Ohishi, H. Abe, C. Sakashita, U. Saqib, MS. Baig, SI. Ohba, H. Inoue, T. Watanabe, M. Shibasaki, M. Kawada.	4. 巻 146
2. 論文標題 Inhibition of mitochondria ATP synthase suppresses prostate cancer growth through reduced insulin-like growth factor-1 secretion by prostate stromal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 3474-3484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32959	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 該当する

1. 著者名 T. Watanabe, H. Abe, M. Shibasaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Catalytic asymmetric total synthesis of leucinostatin A.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chem. Rec.	6. 最初と最後の頁 175-187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.202000108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Abe H.; Kawada, M.; Ohishi, T.; Sakashita, C.; Saqib, U.; Baig, M. S.; Ohba, S.; Inoue, H.; Watanabe, T.; Shibasaki, M.
2. 発表標題 Chemical biology of leucinostatin A and its analogs, modulators of tumor-stroma interaction.
3. 学会等名 AIMECS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺 匠
2. 発表標題 生物活性天然物の触媒的不斉合成研究
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田潤次郎, 雨宮昌秀, 立田大輔, 大石智一, 大庭俊一, 井上裕幸, 阿部 光, Raphael Oriez, 渡辺 匠, 柴崎正勝, 川田 学
2. 発表標題 ミトコンドリアcomplex I 阻害剤による細胞内外の酸性化を介した新規抗がん活性
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

IMC 微生物化学研究所 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	川田 学 (Kawada Manabu) (20300808)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長 (72801)	

6. 研究組織（つづき）

	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	阿部 光 (Abe Hikaru) (10462269)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・上級研究員 (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