

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390033

研究課題名（和文）血管新生阻害療法のためのバイオプローブ分子設計とケミカルジェネティクス

研究課題名（英文）Molecular design and chemical genetic approach of bio-probe for anti-angiogenic therapy

研究代表者

永澤 秀子（NAGASAWA HIDEKO）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90207994

研究成果の概要（和文）：血管新生阻害剤を目指して、プロポリス由来化合物及び arylidene TZD 誘導体をリードとする構造活性相関解析を行い、細胞毒性の低い選択的血管新生阻害剤としてリードを上回る新規化合物の開発に成功した。作用機構としては、HIF-1-VEGF シグナル伝達系の阻害を介していると予想され、現在標的タンパク質の同定にむけてケミカルバイオロジープローブの合成をおこなっている。本化合物はがんの血管新生阻害療法に加えて、眼内血管新生性疾患に対して有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：Novel angiogenesis inhibitors were developed based on natural product chemistry-based approach using Brazilian green propolis and SAR study of arylidene thiazolidinedione (TZD) analogs library. They inhibited *in vitro* and *in vivo* angiogenesis significantly without cytotoxicity through reducing HIF-1-VEGF signaling pathway. They are promising candidates as nontoxic and selective anti-angiogenesis agents applicable to inhibit tumor and retinal angiogenesis. Now we are investigating their target protein for angiogenesis inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	8,900,000	2,670,000	11,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計, 血管新生阻害剤, がん, HIF-1, VEGF, 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

がんの血管新生阻害療法は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）などを中心とする分子標的の解明により、近年抗 VEGF 抗体薬であるアバスチンやサリドマイドなどが相次いで承認されるに至り、次世代のがん治療法として非常に注目されている。血管新生は固形がんの増殖や転移に必須であり、血管新生阻

害剤を既存の抗癌剤と併用することにより治療効果を格段に向上し得ることが臨床的にも証明されつつある。その結果、阻害剤の開発競争は熾烈を極めていている。申請者は、これまで固形がんにおける低酸素微小環境を標的とする治療薬の開発研究を行い、低酸素誘導因子 HIF-1 の阻害を介して、その転写制御下にある VEGF を抑制することで血管

新生を阻害すると予想される種々の化合物を開発した。一方、強い細胞毒性を有する methylene cyclopentenedione 類に非特異的チロシンキナーゼ阻害作用及び血管新生阻害作用があることを見いだした。そこでこれをリードとして構造展開し、鶏卵漿尿膜 (CAM)法による *in vivo* 血管新生阻害剤スクリーニングを実施したところ、cyclopentenedione 環をチアゾリジンジオン (TZD)に換えた場合に細胞毒性が消失し、血管新生阻害作用が増強することを見いだした (2008 年米国癌学会 AACR 報告)。腫瘍のみならず、様々な血管新生依存性疾患、特に眼内血管新生性疾患においては、細胞毒性のない選択的血管新生阻害剤の開発が必須であると考え、申請者らはこれを新たなリード化合物として構造展開を行うことを計画した。

2. 研究の目的

健常成人では血管新生の促進と抑制の恒常性バランスが保たれており、通常創傷治癒や月経以外では血管新生は見られない。しかし血管新生依存性疾患にかかると、異常な血管新生が誘導される。例えば固形がん、加齢性黄斑変性症や糖尿病網膜症等の眼内血管新生性疾患、リウマチ様関節炎などをはじめとして、現在 50 種類もの疾患で異常な血管新生が誘導されるために、症状が悪化することが明らかになっている。このため、上述の様々な疾患の治療薬として血管新生阻害剤の開発が強く求められている。そこで本研究において、細胞毒性を持たない新規血管新生阻害剤として我々が見いだした、環状イミド化合物をリード化合物として種々の誘導体の設計と合成を行い、血管新生過程やがん転移の機構を解明するためのバイオプローブライブラリーを構築する。また、天然物スクリーニングとしてブラジル産プロポリスについて活性探索を行う。各種血管新生阻害試験を実施して、血管新生阻害に関する構造活性相関を検討し、構造最適化を図る。選別された有望化合物について、マウス血管新生モデルや担がんモデルによる *in vivo* 活性試験を行う。一方で高活性候補化合物を基に分子修飾を行って、アフィニティプローブや高感度マスペクトル解析を志向した新規バイオプローブ等を構築し、それらを用いたフォワードケミカルジェネティクス解析による標的分子探索を行う。以上を総括して、血管新生の分子機構解明のためのバイオプローブの創製と新規分子標的の同定、及び臨床適用可能な血管新生阻害剤の開発をめざす。

3. 研究の方法

ブラジル産グリーンプロポリスの分離

精製

山田養蜂場よりご供与いただいたプロポリスのエタノール抽出液の溶媒を減圧留去し抽出エキス(59.0 g)を得た。得られた抽出エキスをクロロホルム-アセトン(クロロホルム→20:1→5:1→1:1→アセトン)を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CC)により分離し下記のスクリーニングシステムにより活性探索を行った。活性画分についてさらにシリカゲルCCを実施し、最終的に単離した活性化化合物について、各種スペクトルより同定した。

arylidene 環状イミド類及び桂皮酸誘導体の合成、構造活性相関解析

冒頭で述べたように methylene cyclopentenedione 類の構造展開に於いて、cyclopentenedione 基を TZD に変換を種々行ったところ毒性の軽減、活性の増強が達成されたことから、TZD 骨格のヘテロ原子を変換した環状イミド類を種々合成した。一方、桂皮酸誘導体にも活性が見られたことから、種々のカルボン酸のバイオイソスター変換を行った。ベンゼン環のアルキル側鎖の検討、共役系の有無、フェノール水酸基、カルボン酸(または等価体)の水素結合ドナー性の有無などの影響について構造活性相関を行った。

生物活性評価

A. ルシフェラーゼアッセイ

がんの低酸素微小環境では HIF-1 が活性化し、その結果、VEGF が誘導されて、血管新生が誘導されることが知られている。そこで、微小環境における低酸素、低栄養ストレス応答系に重要な転写因子である HIF-1 応答ルシフェラーゼベクター p2.1 (ジョンズ・ホプキンス大学 G. Semenza 博士より供与) および ER ストレス応答ルシフェラーゼベクター pGRP78 pro160 (財団法人癌研究会化学療法センター 富田 章弘博士より供与) を HEK293 細胞に導入したクローン株を構築し、セルベーススクリーニングシステムに供した。

B. 微小環境ストレス応答系への影響

HIF-1 α 及びその下流遺伝子、GRP78 の発現に対する影響についてウェスタンブロットティング、real-time RT-PCR により調べた。VEGF の分泌について ELISA により調べた。

C. 鶏卵漿尿膜(CAM)アッセイ

活性化化合物について鶏 0 日卵を 3 日間培養した後、殻に穴を開け、翌日漿尿膜上に検定化合物溶液を投与し、2 日間培養して血管新生を観察して評価した。コントロールおよび検定化合物のポイントの平均値を算出し以下に示すいずれかの式を用いて阻害率または阻害活性を求めた。

血管新生阻害率(%) = [1 - (control point / drug point)] × 100
 血管新生阻害活性 (point) = drug point / control point

D. 高酸素負荷網膜血管新生モデルにおける in vivo 血管新生阻害試験

C57BL/6 生後 7 日目マウスを 75%高酸素条件下で生後 12 日目 (P12) まで飼育し、その後通常大気条件下に戻して P17 まで飼育した。P12 に新生仔マウスを大気圧条件下に戻し、直後から P16 までの 5 日間、GPU-4 を 0.1–10 mg/kg/day 宛 24 時間ごとに皮下投与した。評価時期 (P17) のマウスに FITC-dextran を全身灌流後、網膜フラットマウント標本を作製し、網膜異常血管について評価した。

4. 研究成果

プロポリス由来血管新生阻害剤の探索 (ref. 4)

低酸素の適応応答を評価するために enolase 1 (ENO1)の低酸素応答性プロモーターを導入したルシフェラーゼ発現ベクターをトランスフェクションしたヒト胎児腎 (HEK) 293 細胞の安定株を構築した。以下、安定発現株として構築したクローン (HEK293 p2.1 #3 および#25)を用いて一次スクリーニングを行った。山田養蜂場のブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出エキス(#Y080527)を HEK293 p2.1 #3 を用いた低酸素応答性ルシフェラーゼアッセイにて評価した。その結果、20 μg/mL において約 1.4 倍の有意な HIF-1 転写活性加増強作用が認められた。そこで、このブラジ

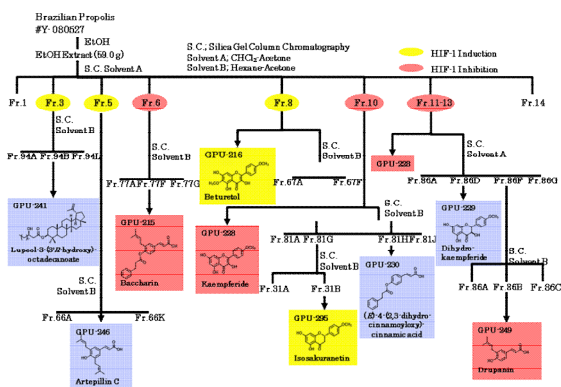
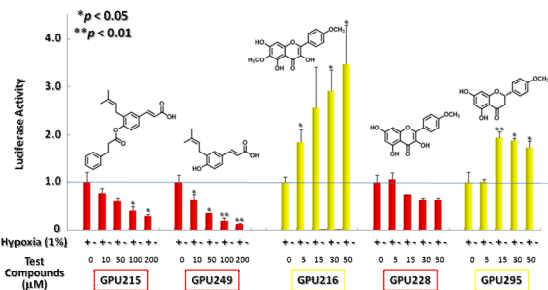


Fig. 1 ブラジル産プロポリスエタノールエキスの分離と低酸素応答プロモーターアッセイによる活性探索

ル産プロポリスのエタノール抽出エキス 59.0 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CC)にて分離した結果 14 本のフラクションが得られた。得られたフラクションを 20 μg/mL にてさらに HEK293 p2.1 #3 を用いた低酸素応答性ルシフェラーゼアッセイにて

評価した結果、フラクション 3、8、9 に有意な HIF-1 転写活性増強作用が認められ、さらに興味深いことにエキスでは認められなかった HIF-1 転写活性抑制作用がフラクション 6 および 10–13 にて認められた。活性が認められたフラクションをさらに HIF-1 転写活性を指標としてシリカゲル CC、再結晶を繰り返し Figure 1 エラー! 参照元が見つかりません。に示す化合物を単離した。

それらの化合物の低酸素応答プロモーターアッセイの結果、baccharin (GPU-215), drupanin (GPU-249), 及び kaempferide (GPU-228)は用量依存的に HIF-1 転写活性を阻害し、beturetol (GPU-216) 及び isosakuranetin (GPU-295) は増強する事が明らかになった (Fig. 2)。また、HCT116 細胞のクロノジェニックアッセイによる細胞毒性試験において桂皮酸類は 200 μM までフラボノイドは 50 μM までの範囲で毒性を



示さなかった。

Fig. 2 ブラジル産プロポリス由来成分の低酸素応答プロモーターアッセイ

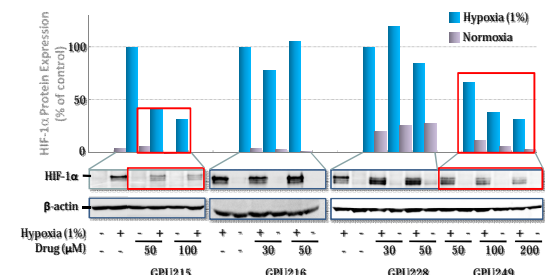


Fig. 3 ブラジル産プロポリス由来成分の HIF-1αタンパク発現に対する効果

GPU-215 及び 249 は HIF-1αタンパクの発現を用量依存的に抑制し (Fig. 3)、さらに GLUT1, HK2, VEGFA の mRNA 発現を抑制した。

次いで低栄養環境で誘導される ER ストレス応答として知られる unfolded protein response (UPR)に対する上記の活性化化合物の作用を調べるため、GRP78 プロモーターを導入したルシフェラーゼ発現クローンを導入した HEK293 細胞株を用いて、2-deoxyglucose (2-DG)処理によるプロモーターアッセイを行った。GPU-215 及び 228 は用量依存的にルシフェラーゼ活性を抑制

した。また、無グルコース培地と通常培地で培養した HCT116 に対する増殖抑制効果を調べたところ、GPU-215 及び 249 はグルコース無しの低栄養条件選択的に有意な細胞増殖抑制作用を示した。

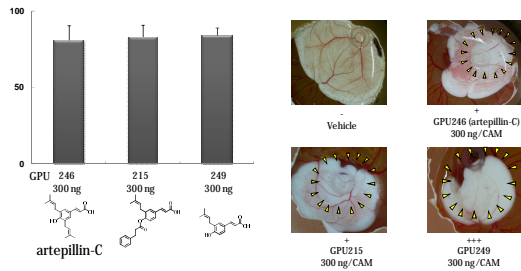
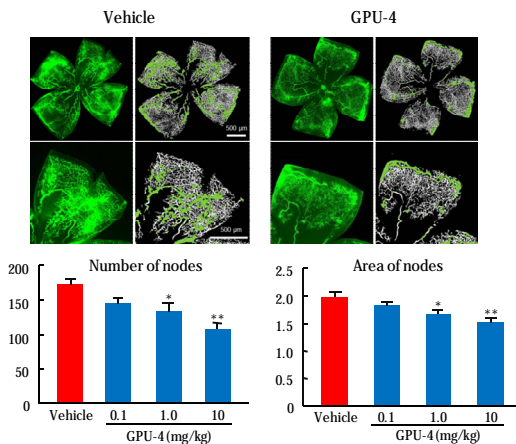


Fig. 4 GPU-215, 249 および 246(アルテピリン C)の血管新生阻害作用

CAM アッセイの結果、HIF-1 及び UPR 阻害作用を示した桂皮酸誘導体 GPU-215, 249 は血管新生阻害作用が報告されているアルテピリン C と同程度の阻害作用を示した (Fig. 4)。

以上の結果、低酸素及び低栄養ストレスに対する適応応答を抑制して、血管新生阻害作用及び低栄養選択的増殖抑制作用を示す桂皮酸誘導体 GPU-215 及び 249 をブラジル産グリーンプロポリスより見いだした。



GPU-4 の血管新生阻害作用機構 (ref. 5)

GPU-4 は HUVEC に VEGF で誘導される血管新生阻害を 30 μ M 以上の濃度で有意に抑制したが、細胞毒性は示さなかった。また、VEGF 分泌 (50 μ M) 及び mRNA 発現 (100 μ M) を有意に抑制した。さらにヒト網膜毛細管内皮細胞において、細胞遊走を 3 μ M で有意に抑制し、10 μ M で VEGF による ROS の Fig. 5 高酸素負荷網膜血管新生モデルにおける GPU-4 の血管新生阻害作用

発生を有意に抑制した。さらに高酸素負荷網膜血管新生モデルにおいて 1 mg/kg 以上の用量で、網膜血管新生を有意に抑制した (Fig. 5)。以上により、GPU-4 は低毒性血管新生阻害剤として有望と考えられる。その機構として、

抗酸化作用による、HIF-1-VEGF シグナル伝達の抑制を介することが示唆された。

新規血管新生阻害剤の構造活性相関

上記で見いだした、GPU-4 及び桂皮酸類をリード化合物として血管新生阻害および HIF-1 阻害作用を指標に構造展開を行った。

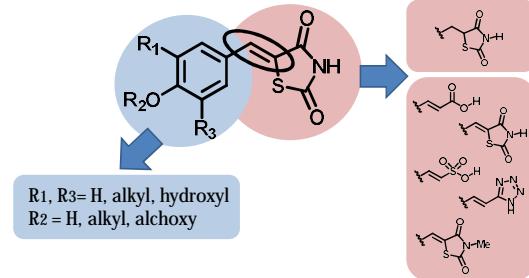


Fig. 6 新規血管新生阻害剤の構造展開

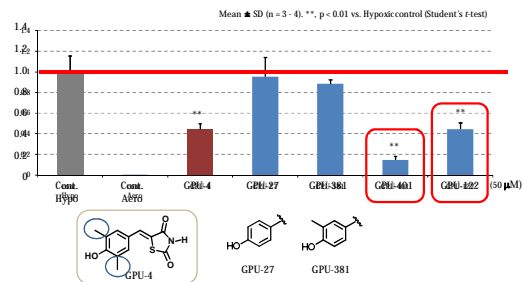


Fig. 7 低酸素応答プロモーターアッセイにおける構造活性相関

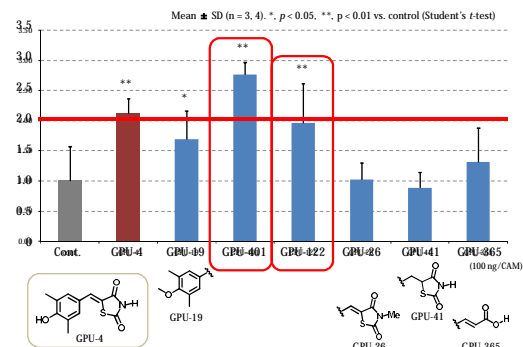
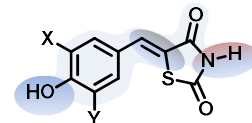


Fig. 8 CAM アッセイによる血管新生阻害作用における構造活性相関

構造活性相関の結果 (Fig. 7.8 に結果の一部を示す) カルボン酸イソスター変換より、TZD 基とスルホン酸基が有効であった。特に TZD 誘導体に於いて、フェノール性水酸基にかさ高い置換基をつけると活性が低下し、o 位のアルキル基を変換した化合物 GPU-401 がリードを上回る最も強い活性を示した。TZD 基の N-メチル体では活性が消失した。以上により、arylidene TZD 誘導体の HIF-1 阻害及び血管新生阻害活性において、共役系、o 位置換基、



水素結合ドナー性が重要なファーマコフォアと考えられた。

以上、本研究により、細胞毒性の低い、選択的血管新生阻害剤として新規な arylidene TZD 誘導体の開発に成功した。作用機構としては、HIF-1-VEGF シグナル伝達系の阻害を介していると予想され、現在標的タンパク質の同定にむけてケミカルバイオロジープローブの合成をおこなっている。本化合物はがんの血管新生阻害療法に加えて、眼内血管新生性疾患に対して有用であると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

Kotaro Miyake, Hideko Nagasawa /8, Mitsuo Shimada: The novel hypoxic cytotoxin, TX-2098 has antitumor effect in pancreatic cancer; possible mechanism through inhibiting VEGF and hypoxia inducible factor-1 α targeted gene expression, *Exp. Cell. Res.*, 査読有, *in press*, 10.1016/j.yexcr.2012.03.013

Bahaa Gamal Mohamed Youssif, Kensuke Okuda /8, Hideko Nagasawa /8: Development of a Hypoxia-Selective Near-Infrared Fluorescent Probe for Non-invasive Tumor Imaging., *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, **60**(3), 402–407 (2012), 10.1248/cpb.60.402

Kensuke Okuda /7, Hideko Nagasawa /7: 2-Nitroimidazole-tricarbocyanine conjugate as a near-infrared fluorescent probe for *in vivo* imaging of tumor hypoxia., *Bioconjug. Chem.*, 査読有, **23**(3), 324–329 (2012), 10.1021/bc2004704

Hisanori Hattori, Kensuke Okuda /7, Hideko Nagasawa /7: Isolation, identification, and biological evaluation of HIF-1-modulating compounds from Brazilian green propolis., *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, **19**(18), 5392–5401 (2011), 10.1016/j.bmc.2011.07.060

Shinsuke Nakamura, Hideko Nagasawa /9, Hideaki Hara: An Arylidene-Thiazolidinedione Derivative, GPU-4, without PPAR γ Activation, Reduces Retinal Neovascularization, *Curr. Neurovasc. Res.*, 査読有, **8**(1), 25–34 (2011), http://www.benthamdirect.org/pages/b_viewarticle.php?articleID=3165504

Hideko Nagasawa: Drug discovery for targeting tumor microenvironment., *J. Pharmacol. Sci.*, 査読有, **115**(4), 446–52 (2011), 10.1254/jphs.10R25FM

Douglas A. Kuntz, Hideko Nagasawa /7, David R. Rose: Structural Investigation of the Binding of 5-Substituted Swainsonine

Analogues to Golgi alpha-Mannosidase II., *ChemBioChem*, 査読有, **11**(5), 673–80 (2010), 10.1002/cbic.200900750

Hitomi Nakashima, Hideko Nagasawa /11, Hitoshi Hori: Design of novel hypoxia-targeting IDO hybrid inhibitors conjugated with an unsubstituted L-TRP as an IDO affinity moiety., *Adv Exp Med Biol*, 査読有, **662**, 415–21 (2010), 10.1007/978-1-4419-1241-1_60,

Satoshi Ueda, Hideko Nagasawa: Facile Synthesis of 1,2,4-Triazoles via a Copper-Catalyzed Tandem Addition-Oxidative Cyclization., *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, **131**(42), 15080–1 (2009), 10.1021/ja905056z

Satoshi Ueda, Hideko Nagasawa: Copper-Catalyzed Synthesis of Benzoxazoles via a Regioselective C–H Functionalization/C–O Bond Formation under an Air Atmosphere., *J. Org. Chem.*, 査読有, **74**(11), 4272–7 (2009), 10.1021/jo900513z

Yoshihiro Uto, Hideko Nagasawa /9, Hitoshi Hori: A chemical biosynthesis design for an antiatherosclerosis drug by acyclic tocopherol intermediate analogue based on "isoprenomics"., *Adv Exp Med Biol.*, 査読有, **645**, 109–14 (2009), 10.1007/978-0-387-85998-9_17

Kotaro Miyake, Hideko Nagasawa /8, Hitoshi Hori: Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer., *Cancer Chemother Pharmacol.*, 査読有, **64**(5), 885–92 (2009), 10.1007/s00280-009-0937-5

Mok-Ryeon Ahn, Hideko Nagasawa /9, Toshiro Ohta: Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis., *Mol. Nutr. Food Res.*, 査読有, **53**(5), 643–51 (2009), 10.1002/mnfr.200800021

[学会発表](計 16 件)

奥田 健介: がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素応答性光誘起電子移動 (PET) 機構を有する近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、日本薬学会第 132 回年会、2012/3/28–31、札幌
辻 美恵子: Pepducin 膜透過プロセスを可視化する FRET 蛍光プローブの開発、日本薬学会第 132 回年会、2012/3/28–31、札幌
村瀬 哲司: SAR Studies of Arylidene Thiazolidinediones as Potent

Angiogenesis Inhibitors、AIMECS11、
2011/11/29-12/2、東京

坂井 良輔:低酸素がんの *in vivo* イメージングを目指す近赤外蛍光プローブの開発、平成 23 年度日本薬学会東海支部例会、2011/11/23、名古屋

永澤 秀子:がん微小環境モジュレータの創製を目指す創薬研究、第 9 回がんとハイポキシア研究会、2011/11/26-27、東京

成瀬 康介:微小環境モジュレーター GPU-231 のグルコース飢餓選択的細胞毒性と血管新生阻害作用、第 9 回がんとハイポキシア研究会、2011/11/26-27、東京
中村 信介:チアゾリジンジオン誘導体 GPU-4 の網膜血管新生抑制作用、第 120 回日本薬理学会近畿部会、2011/11/11、京都

成瀬 康介:新規 UPR モジュレーター GPU-231 のグルコース飢餓選択的細胞毒性と血管新生阻害作用、第 70 回 日本癌学会学術総会、2011/10/3-5、名古屋

永澤 秀子:低酸素がん微小環境を標的とする創薬研究、第 15 回酸素ダイナミクス研究会、2011/9/10-11、佐賀

河野 樹:がんの *in vivo* イメージングを目指す低酸素応答性 PET 型近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第 20 回バイオイメージング学会、2011/9/1-2、千歳

奥田 健介:低酸素がんイメージングを目指す近赤外蛍光プローブの論理的分子設計と合成、第 17 回国際癌治療増感研究会、2011/6/24-25、仙台

服部 久範: Drug Discovery for Targeting The Tumor Microenvironment from Propolis、AACR 101st Annual Meeting 2010、2010/4/17-21、アメリカ ワシントン DC
服部 久範:がん微小環境を標的としたブラジル産プロポリス成分の創薬化学研究、第 14 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2010/7/6-8、東京

成瀬 康介: Development of anticancer drugs targeting the tumor microenvironment、第 69 回日本癌学会学術総会、2010/9/22-24、大阪

榎本 幸浩:低酸素・低栄養微小環境を標的とした新規がん治療薬の開発、第 130 回日本薬学会年会、2010/3/28-30、岡山

榎本 幸浩:がんの低酸素・低栄養微小環境を標的とした新規治療薬の開発、創薬懇話会、2009/12/10、岐阜

研究者番号: 90207994

(2)研究分担者

奥田 健介 (OKUDA KENSUKE)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 00311796

上田 聡 (UEDA SATOSHI)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 50453056

原 英彰 (HARA HIDEAKI)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 20381717

6. 研究組織

(1)研究代表者

永澤 秀子 (NAGASAWA HIDEKO)

岐阜薬科大学・薬学部・教授