

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2014

課題番号：22241053

研究課題名(和文) 腫瘍微小環境で作用する分子標的抗がん剤の探索とその標的分子の解析

研究課題名(英文) Search for molecular-targeted anti-cancer agents acting on the microenvironment in tumor and analysis of their target molecules

研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI, MOTOMASA)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40116033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんの病態の悪化に大きく寄与する腫瘍内の微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化に着目したスクリーニング系を構築して、海洋医薬資源を対象に活性天然物の探索を進め、抗がん剤シーズとして有用な数種の活性天然物を見出した。見出した活性天然物のアナログ化合物合成により構造と活性の相関を解析し、天然物と同等以上の活性を示す化合物の合成に成功した。さらに、汎用性の高い標的分子解析方法を確立するために考案した次世代型プローブ分子を用いて活性天然物の標的分子解析を行うことにより、抗がん剤開発のための新しい薬剤標的分子を見出した。

研究成果の概要(英文)：We explored bioactive natural products from the extract library of marine medicinal resources by the constructed screening systems focusing on the metabolic and phenotypic changes of the cells on the microenvironment in tumor, which largely contribute to the pathological progression of cancer. We succeeded in isolation of the bioactive natural products, which are expected to be a medicinal seed, and in synthesis of the analog compounds, which showed the activities better than those of natural products. In addition, several responsible molecules expected as new drug targets for cancer chemotherapy were figured out through the target identification of the isolated bioactive compounds. The designed new probe molecule and its synthetic strategy enhanced generality of the method for identifying target molecule of bioactive compound.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗がん剤 活性天然物 微小環境 標的分子 海洋生物 海洋微生物

1. 研究開始当初の背景

がんに関する生物学および生化学的研究から、腫瘍内の微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化が、腫瘍の増大や転移といったがんの病態の悪化に大きく寄与していることは知られていた。しかし、このような腫瘍内の細胞の代謝変化や表現型変化を阻害剤探索のための評価系へと応用展開し、活性天然物の探索を実施した例はほとんどなかった。また、見出した活性天然物を医薬シーズとして利用して行くためには、その標的分子(結合タンパク質)を明らかにする必要があるが、その汎用性の高い解析手法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍内の微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化のうち、「がん細胞の低酸素環境適応」、「血管新生」、「上皮間葉転換」、「がん細胞の遊走・接着」に着目して、これらの現象を阻害する活性天然物を、独自に保有する海綿などの底生海洋生物の抽出エキスや海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーから見出すことを目的の一つとした。また、見出した活性天然物のうち有望な活性を示すものについては、その全合成やアナログ化合物合成による構造活性相関研究、*in vivo*での薬効評価、作用メカニズムおよび標的分子解析を通して、医薬リードとして展開して行くことを目的とした。さらに、種々の活性天然物に適用できる、汎用性の高い標的分子解析法の確立を目指した。

3. 研究の方法

活性天然物の探索には、以下に示す5つのフェノタイプスクリーニングの方法を構築して用い、探索源を底生海洋生物の抽出エキスおよび海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーとして、活性試験の結果を指標にした分画精製により目的の活性を示す化合物を探索した。

がん細胞の低酸素環境適応(低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索)

腫瘍内の低酸素環境に適応したがん細胞は、血管新生促進因子や転移に関わる因子を活発に産生し、化学療法や放射線療法にも抵抗性を示す。また、低酸素環境は正常な生体内組織には存在しない、腫瘍特異的に観察される環境である。本スクリーニングでは、ヒト前立腺がん細胞DU145細胞を1%の低酸素環境で培養することにより、低酸素環境に適応させ、通常培養条件と比較して、低酸素培養条件選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

血管新生(正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞HUVEC選択的な増殖阻害物質の探索)

がん細胞は、自身の増殖や生存に必要な酸素や栄養を既存の血管から新生血管を構築させ確保している。本スクリーニングでは、新生血管構築過程の全ての過程に関与して

いる血管内皮細胞に着目して、がん細胞(ヒト咽頭上皮がん細胞KB3-1)の増殖には影響を与えず、HUVEC選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

上皮間葉転換(がん細胞の上皮間葉転換を阻害する化合物の探索)

上皮がんの転移の初期には、がん細胞の表現型が、運動性の低い上皮細胞の性質から運動性の高い間葉系細胞の性質に変化する(上皮間葉転換)。この過程を阻害する化合物は、がん転移の抑制が期待できる。実際のスクリーニングでは、ヒト膵臓がん細胞PANC1をサイトカインTGF- β で刺激することにより上皮間葉転換を惹起し、これを阻害する化合物を探索した。

がん細胞の遊走(がん細胞遊走阻害物質の探索)

上皮間葉転換を起こしたがん細胞は、血管またはリンパ管内を遊走する。本スクリーニングでは、多検体のがん細胞(ヒト子宮頸部がん細胞HeLa)遊走阻害活性を簡便に評価できるスクラッチアッセイを用いて、細胞毒性を示さない濃度で遊走を阻害する化合物を探索した。

がん細胞の接着(がん細胞の血管内皮細胞への接着阻害物質の探索)

がんの転移過程では、がん細胞が血管内皮細胞と接着し、さらに浸潤して行く過程が存在する。実際のスクリーニングでは、蛍光標識したHeLa細胞を利用して、各種接着因子を誘導するサイトカインTNF- α 刺激による、コラーゲンコートプレートおよび血管内皮細胞(HUVEC)への接着を阻害する化合物を探索した。

また、以前に見出した活性天然物のうち、*in vivo*抗腫瘍活性が確認されたfurospinosulin-1、および強力かつ高選択的な血管新生阻害作用を有するcortistatin Aについては、医薬リード化合物への展開を見据えて、化合物の供給を指向した全合成研究に加え、構造活性相関を解析するために種々のアナログ化合物の合成について検討した。

一方、様々な活性物質に簡便に適用できる系統的かつ一般的なプローブ分子の合成法の確立を目指して、種々の官能基の存在下で選択的な結合形成が期待できる、チオールとマレイミドなどの組み合わせによる合成法を検討した。

4. 研究成果

(1) 低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質に関する研究

探索研究

低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索の結果、インドネシア産海綿*Dactylospongia elegans*のメタノール抽出エキスから、セスキテルペンフェノールdictyoceratin-Cを見出した(図1)。Dictyoceratin-Cは、DU145細胞に対して、1.0~10 μ Mの濃度で低酸素培養条件選択的

な増殖阻害活性を示した。また、マウス肉腫 S180 細胞を移植したマウスモデルにおいて、経口投与で良好な抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。また、類縁化合物との構造活性相関研究から、dictyoceratin-C の活性発現には、その化学構造中のパラヒドロキシベンゾイルエステルが必須であり、同部分構造を有する smenospondiol (dictyoceratin-A) も低酸素培養条件選択的ながん細胞増殖阻害活性を有することを明らかにした。さらに、dictyoceratin-C の作用メカニズムを解析した結果、がん細胞の低酸素適応において重要な役割を担うことが知られている、転写因子 HIF-1 α タンパク質の発現量を減少させることを見出した。現在、dictyoceratin-C の結合タンパク質の解析を進めるとともに、その全合成およびアナログ化合物合成を開始している。

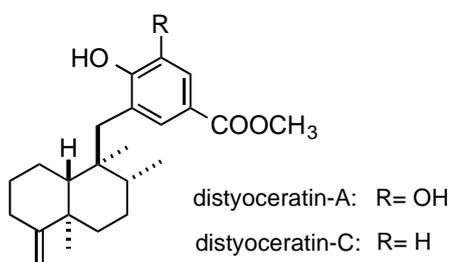


図1 Dictyoceratin-A および-C の化学構造

Furospinosulin-1 に関する検討

インドネシア産海綿由来のフラノセスタテルペン furospinosulin-1 (図2) は、以前に研究代表者が本スクリーニング系から見出した化合物であり、DU145 細胞に対して 1.0~300 μM の濃度で低酸素培養条件選択的な増殖阻害活性を示す。また、S180 細胞を移植したマウスモデルにおいて、10 mg/kg 以上の経口投与で良好な抗腫瘍活性を示した。さらに、その作用メカニズム解析の結果、furospinosulin-1 は、低酸素環境下で発現誘導される増殖因子 IGF-2 の発現を転写レベルで阻害することを明らかにしていた。本研究では、さらなる詳細な検討に向けた全合成およびアナログ化合物合成による構造活性相関研究を行った。また、その標的分子の解析を実施した。

全合成に関しては、3-プロモフランから導いたアリルプロミド体とプレニルフェニル sulfon とのカップリング反応を利用することにより、全7工程、総収率 37% で furospinosulin-1 の全合成を達成した。また、本法を応用して、芳香環部や側鎖の構造が異なる 30 種類以上のアナログ化合物を合成することに成功し、その構造活性相関を検討した。その結果、非常に興味深いことに、わずかな構造変化がその活性や低酸素培養条件選択性に影響することが確認された。これらのことから、furospinosulin-1 は非常に単純な化学構造であるが、標的分子との結合には分子全体の構造が重要であり、その構造認識

はかなり厳密であることが示唆された。その一方で、アナログ化合物による構造活性相関研究により、図2に示す3種のアナログ化合物が、天然物と同等以上の活性を *in vitro* および *in vivo* で示すことを見出した。

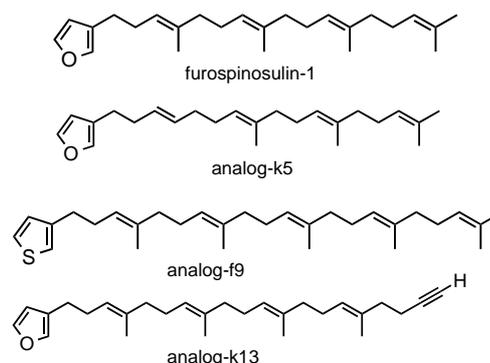


図2 Furospinosulin-1 および有望な活性を示すアナログ化合物の化学構造

Furospinosulin-1 の標的分子の解析については、furospinosulin-1 が低酸素環境下で発現誘導される増殖因子 IGF-2 の発現を転写レベルで阻害するという知見を基に、IGF-2 遺伝子プロモーターの部分配列をプローブ分子として、furospinosulin-1 結合タンパク質を探索した。その結果、結合タンパク質の候補として、これまでがん細胞の低酸素適応に関与することが全く報告されていない、p54^{nrb} および LEDGF と呼ばれる2つの転写制御因子を見出した。また、furospinosulin-1 のプローブ分子を合成し、これら2つのタンパク質と furospinosulin-1 が直接結合することを証明するとともに、両転写制御因子の発現を siRNA でそれぞれノックダウンした DU145 細胞は、furospinosulin-1 処理した細胞と同様に、低酸素培養条件選択的な増殖阻害を受けることを明らかにした。

(2) 血管新生阻害物質に関する研究

探索研究

がん血管新生阻害物質の探索研究では、インドネシア産海綿の抽出エキスから、サイトカニンとして知られているヌクレオシド誘導体 *N*-isopentenyladenosine を単離・同定した(図3)。本化合物は HUVEC に対して 0.4 μM の IC₅₀ 値を示し、がん細胞 KB3-1 に対する IC₅₀ 値と比較して、12.5 倍の HUVEC 選択性を示した。また、*N*-isopentenyladenosine は、細胞毒性を示さない濃度範囲で、血管新生促進因子 VEGF 刺激による HUVEC の遊走を阻害できることを明らかにした。

本研究開始時にかん血管新生を阻害する化合物として単離していた、生葉セネガ由来のセネガサポニン類については senegin III を用いた作用メカニズム解析を進め、かん血管新生を阻害する内因性の因子である

PEDF タンパク質の発現を上昇させることを見出した。

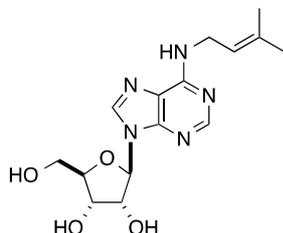


図3 N-isopentenyladenosine の化学構造

Cortistatin A に関する検討

同評価系を用いて以前に新規な血管新生阻害物質として見出していたインドネシア産海綿由来のステロイドアルカロイド cortistatin A については、天然から得られた量が極僅かであったため、その量的供給を目指した全合成研究を行った。その結果、7-endo 選択的分子内 Heck 反応と oxy-Michael 反応による B 環部構築を鍵とする、cortistatin A の母核構造の新規構築法を開拓することに成功した(図4)。

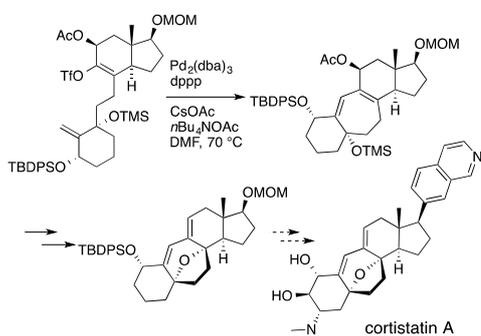
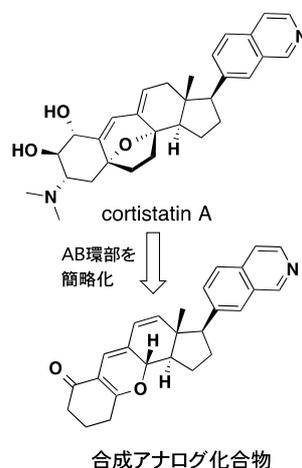


図4 Cortistatin A の合成研究

一方で、cortistatin A の複雑な化学構造を簡略化することで、より容易に供給可能な医薬リード化合物を創製できると考え、各種アナログ化合物の合成と活性評価を検討した。天然より得られた類縁体の構造活性相関の情報をもとに、活性発現に必須であると考えられるイソキノリン側鎖およびその周辺構造を残し、複雑かつ活性発現への影響が少ないと予想される AB 環部を簡略化した化合物が、HUVEC の増殖を強力かつ高選択的に阻害することを見出した。また本化合物が、*in vivo* においても良好な血管新生阻害活性および抗腫瘍活性を示すことを明らかにした(図5)。本化合物についてはJSTの支援のもと国際特許を出願するとともに、更なる構造最適化についても検討を進めている。

また、後述のプロープ分子の系統的合成法を利用して、本アナログ化合物由来のアフィニティープロープの合成にも成功した。プロープ化によって活性が消失していないことも確認しており、今後、これを用いることで cortistatin A の標的分子を同定できると考えている。



合成アナログ化合物

図5 Cortistatin A アナログの化学構造

(3) その他の探索研究

がん転移を抑制する化合物の発見が期待できる、「上皮間葉転換」および「がん細胞の遊走・接着」に着目したスクリーニングでは、がん細胞の遊走を阻害する化合物として、インドネシア産 *Stylissa* 属海綿の抽出物から stylissamide X と命名した新規環状ペプチドを見出した(図6)。また、Stylissamide X は、80%以上の細胞生存率を維持している 0.1~10 μM の濃度範囲で、増殖因子 EGF 刺激による HeLa 細胞の遊走をほぼ完全に阻害することを明らかにした。

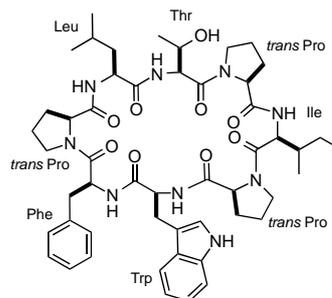


図6 Stylissamide X の化学構造

(4) 系統的なプロープ分子素子の合成法の確立とホウ酸基を利用した高機能性プロープ分子の創製について

様々な活性物質に簡便に適用できる系統的かつ一般的なプロープ分子の合成法として、システインを母核とするプロープ分子素子を開発した。すなわち、L-システインを母核としてタグや捕捉補助基を順次導入し、プロープ分子素子を合成する。一方、活性物質に対して、チオールと高選択的に反応するマレイミドやヨードアセトアミド基を有する素子を導入し、これをプロープ分子素子の還元処理により生ずるチオールと反応させることで、プロープ分子を合成するものであり、様々な活性物質に対する多様なプロープ分子を効率よく系統的に合成することが可能である(図7)。実際に上述の

furospinosulin-1 の標的特定においても、同合成法の適用によって、リガンド部分と光反応性基の距離を最適化し、活性を保持したフォトアフィニティープローブを合成することが出来た。

一方、最近我々は、プローブ分子の適当な位置にボロン酸を導入すると、そのルイス酸性により、標的タンパク質との結合が強固になり、ボロン酸を導入しない場合と比較して、結合タンパク質の捕捉能が顕著に上昇することを見いだした。さらなる捕捉補助機能の向上を目指し、上述の系統的合成法を用いて種々のプローブ分子を合成し、その機能評価を行った結果、アルキルボロン酸よりルイス酸性の高いボロキソール基などの導入によって、捕捉能が顕著に向上することを見出した。

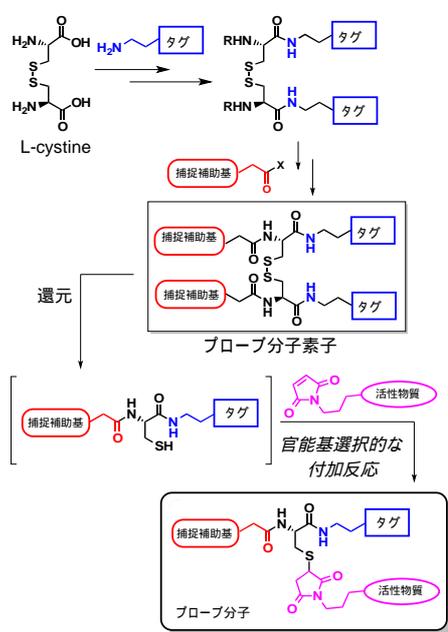


図7 プローブ分子の系統的合成法

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13件)

M. Arai, T. Kawachi, H. Sato, A. Setiawan, M. Kobayashi, Marine spongian sesquiterpene phenols, dictyoceratin-C and smenospondiol, display hypoxia-selective growth inhibition against cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 68, 3155-3157 (2014). 査読有

N. Kotoku, C. Nakata, T. Kawachi, T. Sato, X. Guo, A. Ito, Y. Sumii, M. Arai, M. Kobayashi, Synthesis and evaluation of effective photoaffinity probe molecule of furospinosulin-1, a hypoxia-selective growth inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2102-2112 (2014). 査読有

N. Kotoku, K. Mizushima, S. Tamura, M. Kobayashi, Synthetic studies of cortistatin A

analogue from the CD-ring fragment of vitamin D₂. *Chem. Pharm. Bull.* 61, 1024-1029 (2013). 査読有

N. Kotoku, Y. Sumii, T. Hayashi, S. Tamura, T. Kawachi, S. Shiomura, M. Arai, M. Kobayashi, Creation of readily accessible and orally active analogue of cortistatin A. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 673-677 (2012). 査読有

M. Arai, Y. Yamano, M. Fujita, A. Setiawan, M. Kobayashi, Stylissamide X, a new proline-rich cyclic octapeptide as an inhibitor of cell migration, from an Indonesian marine sponge of *Stylissa* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1818-1821 (2012). 査読有

N. Kotoku, S. Fujioka, C. Nakata, M. Yamada, Y. Sumii, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, Concise synthesis and structure-activity relationship of furospinosulin-1, a hypoxia-selective growth inhibitor from marine sponge. *Tetrahedron* 67, 6673-6678 (2011). 査読有

M. Arai, A. Hayashi, M. Sobou, S. Ishida, T. Kawachi, N. Kotoku, M. Kobayashi, Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. *J. Nat. Med.* 65, 149-156 (2011). 査読有

N. Kotoku, Y. Sumii, T. Hayashi, M. Kobayashi, Synthetic study of carbocyclic core of cortistatin A, an anti-angiogenic steroidal alkaloid from marine sponge. *Heterocycles* 83, 1535-1552 (2011). 査読有

[学会発表](計31件)

Masayoshi Arai, Naoyuki Kotoku, Motomasa Kobayashi "Creation of novel drug target for cancer chemotherapy by the study of furospinosulin-1, a hypoxia-selective growth inhibitor against cancer cells" The 7th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, 2/10/2014 Jeju Island (Korea)

伊藤 葵, 古徳直之, 住井裕司, 角居雄太, 小林資正 「Cortistatin A の標的分子特定のためのプローブ分子の合成」第 63 回日本薬学会近畿支部大会 10/12/2013, 同志社女子大学・京田辺キャンパス(京都)

荒井雅吉, 河内崇志, 中田千晶, 古徳直之, 小林資正 「低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 furospinosulin-1 の標的分子の解明」第 55 回天然有機化合物討論会 9/18/2013, 同志社大学・寒梅館(京都)

荒井雅吉, 河内崇志, 古徳直之, 遠藤洋子, 井上正宏, 小林資正 「低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 furospinosulin-1 の in vivo 評価」日本生薬学会第 60 回年会 9/8/2013, 北海道医療大学・当別キャンパス(北海道)

小林資正 「新しい医薬シーズの探索と標的分子探索」日本生薬学会第 60 回年会 9/7/2013, 北海道医療大学・当別キャンパス(北海道)

古徳直之, 住井裕司, 林 剛史, 田村理, 河内崇志, 塩村 昌, 竹島亜季, 荒井雅吉, 小林資正「海洋天然物 cortistatin A を基盤とする抗腫瘍活性リード化合物の創製」第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム 11/29/2012, タワーホール船堀(東京)

荒井雅吉, 河内崇志, 中田千晶, 佐藤陽紀, 古徳直之, 小林資正「低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 furospinosulin-1 のケミカルバイオロジー研究による新規薬剤標的分子の創出」第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム 11/29/2012, タワーホール船堀(東京)

荒井雅吉, 塩村 昌, 古徳直之, 小林資正「インドネシア産海綿由来 N-isopentenyladenosine の HUVEC 選択的増殖阻害作用」第 62 回日本薬学会近畿支部大会 10/20/2012, 武庫川女子大学・薬学部(兵庫)

古徳直之, 河内崇志, 荒井雅吉, 小林資正「血管新生阻害物質 cortistatin A 由来の抗がん剤リード化合物の創製研究」第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会 6/28/2012, 西日本総合展示場(福岡)

古徳直之, 中田千晶, 山田昌樹, 河内崇志, 佐藤陽紀, 荒井雅吉, 小林資正「Furospinosulin-1 由来の新規抗腫瘍活性リード化合物の合成と標的タンパク質解析」第 10 回次世代を担う有機化学シンポジウム 5/11/2012, 大阪大学銀杏会館(大阪)

古徳直之, 郭 修略, 伊藤 葵, 小林資正「システインを母核としたプローブ分子の合成法の開発」日本薬学会第 132 年会 3/30/2012, 北海道大学(北海道)

田村 理, 戸田和成, 荒井雅吉, 小林資正「がん転移抑制を指向した細胞接着阻害天然物の探索」第 61 回日本薬学会近畿支部大会 10/22/2011, 神戸学院大学・ポートアイランドキャンパス(兵庫)

小林資正「海綿由来の新しい医薬シーズの探索」日本化学会第 92 春季年会 中西シンポジウム 2012 3/26/2012, 慶応義塾大学・日吉キャンパス(神奈川)

Motomasa Kobayashi "Medicinal Seeds for Cancer Chemotherapy from Marine Organisms." 7th U.S.-Japan Seminar on Marine Natural Products 12/12/2011, 沖縄コンベンションセンター(沖縄)

住井裕司, 古徳直之, 林 剛史, 田村理, 河内崇志, 森本 薫, 荒井雅吉, 小林資正「海綿由来血管新生阻害物質 cortistatin A および analog 化合物の合成研究」第 53 回天然有機化合物討論会 9/28/2011, 大阪国際センター(大阪)

Motomasa Kobayashi "Search for New Medicinal Seeds for Cancer Chemotherapy from Marine Organisms" Tetrahedron Prize for Creativity in Organic Chemistry Symposium, 8/29/2011, Denver (USA)

〔図書〕(計 1 件)

M. Kobayashi, N. Kotoku, M. Arai "Search for New Medicinal Seeds from Marine Organisms" In; M. Shibasaki, M. Iino, H. Osada (Ed) *Chembiomolecular Science: at the Frontier of Chemistry and Biology* 93-101. (2013) Springer-Verlag GmbH, Deutschland

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 抗がん物質のスクリーニング方法
発明者: 小林資正, 荒井雅吉, 古徳直之, 河内崇志
権利者: 大阪大学
種類: 特許権
番号: 特願 2012-184400
出願年月日: 2012 年 8 月 23 日
国内外の別: 国内

名称: 新規コルチスタチン A 類似体およびその用途
発明者: 小林資正, 古徳直之, 荒井雅吉, 田村理
権利者: 大阪大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2011/71264
出願年月日: 2011 年 9 月 16 日
国内外の別: 国外

名称: 新規プレニルアレーン化合物およびその用途
発明者: 小林資正, 荒井雅吉, 古徳直之, 河内崇志
権利者: 大阪大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2011/60578
出願年月日: 2011 年 5 月 6 日
国内外の別: 国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/index.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI, Motomasa)
大阪大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号: 40116033

(2) 連携研究者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)
大阪大学大学院・薬学研究科・准教授
研究者番号: 80311231

古徳 直之 (KOTOKU, Naoyuki)
大阪大学大学院・薬学研究科・助教
研究者番号: 20362618