

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501321

研究課題名(和文) 癌-間質相互作用を標的とした抗癌剤の創薬基礎研究

研究課題名(英文) Discovery of a new antitumor drug targeting the tumor-stromal cell interactions

研究代表者

川田 学 (KAWADA, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・主席研究員

研究者番号：20300808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：固形癌組織における癌細胞と繊維芽様細胞の相互作用を標的とした抗癌剤の開発を目指し、両細胞の共培養スクリーニング系を構築し、活性物質の探索を行った。その結果、胃癌細胞と胃繊維芽様細胞の共培養系から、放線菌が産生する新規物質 intervenolin を見出した。Intervenolin は胃癌だけでなく大腸癌細胞の増殖を繊維芽様細胞の存在下で強く選択的に抑制した。また、intervenolin は胃癌および大腸癌を移植したマウス xenograft モデルに対しても有意に癌の増殖を抑制した。

研究成果の概要(英文)：For creation of a new antitumor drug targeting the interactions between tumor cells and the surrounding stromal cells in tumor tissues, we have developed coculture systems of both cells and searched for compounds that modulate the interactions. As a result, we have isolated a new compound, intervenolin, from the culture broth of actinomyces. Intervenolin inhibits the growth of human gastric and colorectal cancer cell lines when cocultured with the respective organ-derived stromal cells more strongly than that of the cancer cells cultured alone. Intervenolin shows antitumor effects against xenograft models of human gastric and colorectal cancer cells in vivo.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：癌 生理活性物質 間質

1. 研究開始当初の背景

固形癌の多くは、癌細胞だけでなく周囲の間質が混在する形で成り立っている。間質は、コラーゲンなどの細胞外基質、繊維芽様細胞、マクロファージ、血管内皮細胞など様々な成分・細胞で構成されており、癌の増殖に密接に関わっている。この中で繊維芽様細胞（間質細胞とも呼ぶ）は、癌の増殖を促進させることが明らかにされつつあり、前立腺癌、乳癌、膵癌などでその重要性が注目されている。繊維芽様細胞と癌細胞は分泌因子や接着を介してお互いの増殖や性質を調節しており、これを癌-間質相互作用と呼んでいる（図1）。この癌-間質相互作用は原発臓器ではもちろんのこと癌転移部位でも重要である。癌-間質相互作用について、これまでにいくつかの実験系によって検討されているが、各臓器によってその相互作用が異なるため、未だ不明な点が多い。しかしその一方で、癌に特徴的な性質であることから、癌-間質相互作用の本体解明とそれを標的とした癌治療法の開発が期待されている。我々はこの癌-間質相互作用を制御することで癌を抑制する新しいタイプの癌治療法および抗癌剤の開発を目指して研究を行っている（図1）。

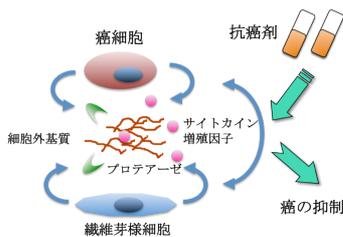


図1 癌-間質相互作用

我々はこれまで癌-間質相互作用が密接であると言われている癌の一つ、前立腺癌をモデルとして、実験系の構築、癌-間質相互作用の解析および相互作用を調節する低分子化合物の探索を行ってきた。具体的には、マウスに移植したヒト前立腺癌細胞の増殖がヒト前立腺繊維芽様細胞を混ぜると促進されることを *in vitro* で再現した共培養実験系を開発し、前立腺癌の増殖に繊維芽様細胞が分泌するインスリン様増殖因子（IGF-I）が重

要な役割を果たしていることを明らかにした（Anticancer Res 24: 1561, 2004; Cancer Res 66: 4419, 2006）。そしてこの共培養実験系を利用して放線菌やカビなどの微生物培養液をスクリーニング源として癌-間質相互作用を調節する低分子化合物の探索を行った。その結果、数種の既知化合物および新規化合物に活性を見出してきた。例えば、phthoxazolin A や leucinostatin A は前立腺繊維芽様細胞の IGF-I の産生を抑制することで共培養において前立腺癌の増殖を阻害することが分かった（Cancer Sci 100: 150, 2009; Int J Cancer 126: 810, 2010）。また、leucinostatin A や新規化合物 NBRI16716A などには実際にマウスのモデルで抗癌活性を示すことも分かってきた（Int J Cancer 126: 810, 2010; J Antibiot 63: 319, 2010）。これらの結果から、癌-間質相互作用を調節する低分子化合物が新たな抗癌剤と成り得る可能性が見えてきた。

2. 研究の目的

癌-間質相互作用は癌種によって異なるため、その相互作用を標的とした抗癌剤の開発のためには、種々の相互作用それぞれに選択的に作用する活性物質が必要である。我々はこれまでヒト前立腺癌、胃癌、肺癌と各ヒト臓器由来の繊維芽様細胞との共培養実験系を構築し、癌-間質相互作用を調節する活性物質を見出してきた。本研究では、新たにヒト膵癌、乳癌、大腸癌と各ヒト臓器由来の繊維芽様細胞との共培養実験系を構築するとともに、既に構築した3系のスクリーニング系を活用し、計6系のスクリーニングによって癌-間質相互作用を調節する活性物質を放線菌やカビなどの培養液および化合物ライブラリーから探索する。培養液については活性物質の精製・同定を行い、スクリーニングによって見出した活性物質の詳細な作用機構および抗癌活性を検討し、癌-間質相互作

用の本体解明の一助とするとともに、抗癌剤としての有望物質の候補を見出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膵癌、乳癌、大腸癌を用いた新しい共培養スクリーニング系の構築

ヒト癌細胞をその臓器由来の繊維芽様細胞と混ぜてマウス皮下に移植すると、その移植ヒト癌の増殖が変化することがある。例えば、ヒト前立腺癌をヒト前立腺繊維芽様細胞と混ぜてマウスに移植すると、前立腺癌の腫瘍が大きくなる (Cancer Res 66: 4419, 2006)。これまでに我々は蛍光タンパク GFP を安定的に発現するヒト前立腺癌、胃癌、肺癌細胞株を樹立し、それらに対応する臓器由来のヒト繊維芽様細胞と混ぜてマウス皮下に移植し、その癌の増殖の変化を調べ、さらにその現象を *in vitro* で再現する共培養実験系を開発してきた。例えば、ヒト前立腺癌は前立腺繊維芽様細胞と共培養すると *in vitro* でもある条件下でその増殖が促進された (Anticancer Res 24: 1561, 2004)。そこでこの知見をもとに、先ず新たな共培養実験系の構築を行った。蛍光タンパク GFP の発現遺伝子を安定的に導入した膵癌、乳癌、大腸癌の各ヒト由来の数株と各臓器のヒト繊維芽様細胞を混ぜてヌードマウスの皮下に移植し、各癌細胞株の造腫瘍能の変化を調べた。一方、それぞれの組み合わせで *in vitro* 共培養実験を様々な培養条件 (細胞数、血清濃度、添加物) で行った。その結果、マウスと *in vitro* で同じ様に繊維芽様細胞で癌細胞の増殖が増大された組み合わせを選択し、共培養系の候補とした。

#### (2) 前立腺癌、胃癌、肺癌、膵癌、乳癌、大腸癌の共培養スクリーニング系による活性物質の探索

我々は、ヒト前立腺癌、胃癌、肺癌の増殖がその臓器由来の繊維芽様細胞によって促

進される *in vitro* 共培養実験系を既に構築した。各臓器数種類の癌細胞株と繊維芽様細胞の組み合わせの中から、それぞれの癌-間質相互作用が異なると考えられる組み合わせを1つずつ選び、合計3つの共培養スクリーニング系とした。この選別には、数百の阻害剤 (がん研究支援班標準阻害剤キットを使用 <https://scads.jfcr.or.jp/>) を共培養系に作用させ、その結果が重複しないものを選んだ。(1) で構築した膵癌、乳癌、大腸癌の共培養系についても同様に検討し、新たな3つの共培養スクリーニング系とした。ヒット化合物は、繊維芽様細胞に毒性を示さず、癌細胞のみの培養では増殖を阻害しないが、繊維芽様細胞と共培養した時に癌細胞の増殖を強く阻害する活性を指標に選んだ (図2)。このような活性を示す物質は、癌-間質

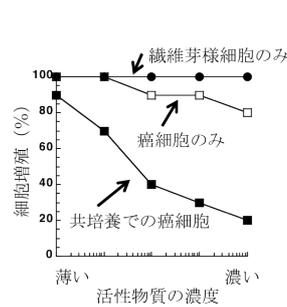


図2 ヒット化合物の例

相互作用を調節している可能性が極めて高い。共培養系では GFP の蛍光強度を測定することで間質細胞が共存する中でも癌細胞の増殖を選

択的にトレースすることができる。我々はこれまでに、放線菌やカビなどの培養液をスクリーニング源として数多くの天然物質に目的の活性を見出し、実際にマウスのモデルでそれらの化合物が抗癌活性を示す事を確かめた (Int J Cancer 126: 810, 2009; J Antibiot 63: 319, 2010)。そこで、更に新しい活性物質を見出す事を目的として、これら6系のスクリーニング系を活用して活性物質の探索を行った。スクリーニング源はこれまでと同様に放線菌やカビなどの培養液を利用するだけでなく、既に精製されている化合物ライブラリーも利用し、活性物質発見の高率化を図った。化合物ライブラリーは我々のインハウスライブラリーに加えてが

ん研究支援班ライブラリーも利用した。

### (3) 活性物質の精製・同定と作用機構の解析

(2) のスクリーニングで活性を見出した培養液について、活性物質の精製・同定を行った。また、見出した活性物質について作用機構の解析を行った。これまでに申請者は phthoxazolin A や leucinostatin A が繊維芽様細胞に作用して前立腺癌と間質の相互作用を調節し癌の増殖を抑制することを見出した (Cancer Sci 100: 150, 2009; Int J Cancer 126: 810, 2010)。そこで、作用機構の解析ではそれらの実験方法を応用し、繊維芽様細胞および癌細胞への作用を細胞内のシグナル伝達系や分泌因子、接着因子などに焦点をあてて解析した。これまでの知見から、活性物質が繊維芽様細胞からの分泌因子の産生を阻害する可能性が最も高いので、特に注目した。

### (4) 活性物質の抗癌活性の評価

(3) の検討から活性が強力または興味ある作用機構を持っている化合物を中心にマウスのモデルを利用して抗癌活性を評価した。マウスのモデル実験では、(1) の検討も含め既に実施済の癌細胞と繊維芽様細胞を混ぜた移植モデルを使用する。このモデルの利点は、癌細胞に GFP が導入されていることである。癌細胞の蛍光イメージングによって小さな腫瘍でも癌の増殖を可視化できるため、動物実験の期間が従来法よりも短縮でき、それによって投与期間が短くなるので化合物の必要量も少なく済む。従来よりも短期間で多検体を評価できるこの迅速な動物実験を最大限利用して、活性物質の抗癌活性の評価を行い、大量調整などさらにステージアップすべき抗癌剤として有望な化合物の見極めをした。

## 4. 研究成果

### (1) Intervenolin の発見および精製

6 系の共培養スクリーニング系を用いた活性物質のスクリーニングの結果、胃癌細胞 MKN-74 の共培養系に目的の活性を見出した。活性物質の生産菌 ML96-86F2 株は性状および 16S rRNA の遺伝子配列から放線菌 *Nocardia* 属と推定され、独立行政法人 製品評価技術基盤機構に NITE P-1464 として寄託した。

ML96-86F2 株の培養液 10L をろ過し、菌体をメタノールで抽出した。メタノール抽出物のメタノールを減圧下で除き、水で 1L とした後、酢酸エチルで抽出した。この酢酸エチル抽出物 (1 g) をヘキサン-酢酸エチル (1 : 1) にて準備したシリカゲルカラムにかけ、ヘキサン-酢酸エチル (1 : 1)、ヘキサン-酢酸エチル (1 : 3)、メタノールの順に溶出した。ヘキサン-酢酸エチル (1 : 1) で溶出した画分を濃縮した後、粗精製サンプル (58.3mg) を HPLC カラムにて 80%メタノールで分離し、目的の活性物質 (3.9mg) を得た。活性物質の物理化学的性質と、<sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR の解析から活性物質は新規化合物であることが判明し、その構造を図 3 のように決定

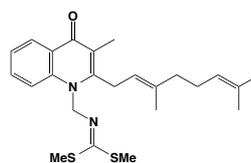


図 3 Intervenolin の構造

した。癌-間質相互作用に干渉する (intervene) キノリン系化合物ということから活性物質を

intervenolin と名付けた。

### (2) Intervenolin の共培養系での作用

Intervenolin は胃癌細胞 MKN-74 単独での培養ではその増殖を IC<sub>50</sub> 3.0μg/ml で阻害したが、胃由来繊維芽様細胞 Hs738 との共培養下で MKN-74 細胞の増殖を IC<sub>50</sub> 0.17μg/ml とより低濃度で阻害した (図 4)。Intervenolin の癌細胞株への選択性および *in vivo* 抗癌活性を検討するために適した癌細胞株を選ぶため、胃癌 5 株、膵癌 4 株、前立腺癌 3 株、

乳癌 5 株、大腸癌 6 株、肺癌 6 株の共培養系

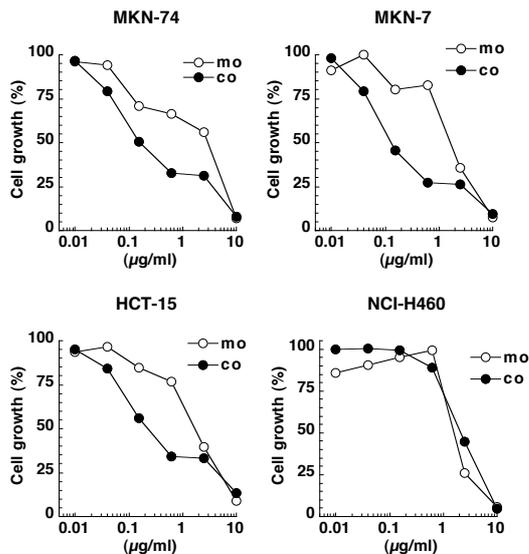


図 4 Intervenolin の癌細胞単独培養 (○) および共培養 (●) での作用

に対する作用を調べた。その結果、胃癌 2 株、大腸癌 5 株、肺癌 2 株で、目的とする活性、即ち癌細胞単独培養に比べてそれぞれの臓器由来の繊維芽様細胞と共培養した時の癌細胞の増殖を強く阻害することが分かった。例えば、intervenolin は胃癌細胞 MKN-7 や多剤耐性の大腸癌細胞 HCT-15 の単独培養での増殖を IC<sub>50</sub> 1.6µg/ml で阻害するが、共培養下ではそれぞれ IC<sub>50</sub> 0.13 および 0.21µg/ml で阻害した (図 4)。一方、目的の活性を示さなかった例としては、肺癌細胞 NCI-H460 の増殖を単独および共培養どちらにおいても intervenolin は IC<sub>50</sub> 2µg/ml で同様に阻害した (図 4)。これらの結果から、intervenolin は選択性を有しており、この作用の差は作用機構に起因するものと考えられた。

### (3) Intervenolin の *in vivo* 抗癌活性

Intervenolin の急性毒性試験をマウスを用いて検討した結果、intervenolin は iv 投与にて 50mg/kg でも何ら毒性を示さないことが分かった。しかしながら、intervenolin 生産菌 10L の培養から約 4mg しか得られないこ

とから、動物実験で使用するサンプルの確保が問題となった。そこで、有機合成研究者の協力を仰ぎ、intervenolin を化学的に全合成することに成功した。また、合成を行う過程で、様々な intervenolin 類縁化合物の合成も行った。これらのことから、動物実験で使用する十分な intervenolin のサンプル量を確保することができ、さらには構造活性相関などの研究にも利用できる様々な intervenolin の類縁体も得ることができた。

合成して得られた intervenolin を用いて、*in vitro* の検討から感受性が良好であった胃癌細胞 MKN-74 および多剤耐性大腸癌細胞 HCT-15 に対する *in vivo* xenograft 抗癌活性を評価した。癌細胞を繊維芽様細胞の有無でヌードマウスの皮下に移植し、intervenolin を iv にて投与した。その結果、intervenolin は繊維芽様細胞の有無に関わらず 12.5 mg/kg で有意に癌の増殖を抑制することが分かった (図 5)。多剤耐性大腸癌細胞 HCT-15 でも

### MKN-74 tumor MKN-74+Hs738 tumor

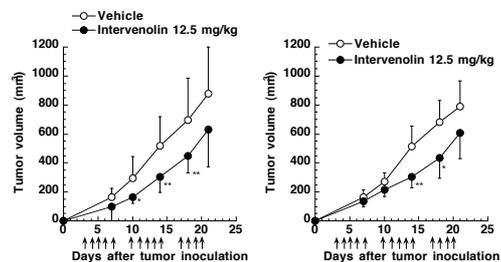


図 5 Intervenolin の *in vivo* 抗癌活性. \*P<0.05, \*\*P<0.01

同様に繊維芽様細胞の有無に関わらずヌードマウスに移植した癌の増殖を有意に抑制した。これら腫瘍の組織切片を作製し、解析した結果、繊維芽様細胞と一緒に移植しなくともホストのマウスの繊維芽様細胞が腫瘍内に侵入していることが分かった。また予備的実験から、腫瘍から分離したマウスの繊維芽様細胞との共培養下でも intervenolin は癌細胞の増殖を強く抑制することが分かった。

#### (4) Intervenolin の作用機構の解析

Intervenolin の作用機構について、繊維芽様細胞から分泌される因子に特に着目して解析を行った。その結果、予備的結果ではあるが、intervenolin を繊維芽様細胞に作用させると癌細胞の増殖を抑制する因子が分泌されてくることが分かった。従って、intervenolin は癌-間質相互作用を調節することで癌細胞の増殖を抑制すると考えられた。今後、この因子の同定と intervenolin の詳細な作用機構を解明し、癌-間質相互作用の解明に役立てるとともに、抗癌剤としての可能性を追求する予定である。

このように癌-間質相互作用を調節する活性物質を抗癌剤として開発する発想はこれまでほとんど例はなく、我々のように構造がユニークである天然物質にその活性物質を求めるアプローチは類がないと考えられる。本研究で得られる活性物質は当該分野において低分子化合物を用いたケミカルバイオロジーの手法を応用するためのプローブとして利用価値があるだけでなく、中には抗癌剤として有望な候補物質の発見へとつながる可能性もある。

#### 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 10 件)

- ① Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S., Hatano, M., Amemiya, M., Hayashi, C., Usami, I., Abe, H., Watanabe, T., Kinoshita, N., Igarashi, M., Masuda, T., Ikeda, D., and Nomoto, A. Intervenolin, a new antitumor compound with anti-*Helicobacter pylori* activity, from *Nocardia* sp. ML96-86F2. **J. Antibiot.** 66, 543-548 (2013). 査読有 DOI: 10.1038/ja.2013.42.
- ② Abe, H., Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S., Nomoto, A., Watanabe, T., and

Shibasaki M. Synthesis of intervenolin, an antitumor natural quinolone with unusual substituents. **Org. Lett.** 15, 2124-2127 (2013). 査読有

DOI: 10.1021/ol400587a

[学会発表] (計 14 件)

- ① 川田学、坂本修一、雨宮昌秀、増田徹、野本明男 「がんと間質の共培養スクリーニングから発見した抗ピロリ菌活性を有する新規抗がん物質 Intervenolin」 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 新規化合物、その製造方法、及びその用途、並びに、新規微生物

発明者: 川田学、井上裕幸、大庭俊一、波多野和樹、阿部光、林千草、渡辺匠、五十嵐雅之

権利者: 公益財団法人微生物化学研究会

種類: 特許

番号: 特願 2013-035731

出願年月日: 平成 25 年 2 月 26 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川田 学 (KAWADA, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・主席研究員

研究者番号: 20300808

##### (2) 連携研究者

井上 裕幸 (INOUE, Hiroyuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号: 50601548

雨宮 昌秀 (AMEMIYA, Masahide)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号: 10232000