

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590008

研究課題名(和文) チューブリンを分子標的とする海洋無脊椎動物由来の新規抗がん剤素材の探索研究

研究課題名(英文) Search of the new anticancer drug material which makes tubulin a molecular target from the marine invertebrate as

研究代表者

山田 耕史 (Yamada, Koji)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：00253469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、海洋無脊椎動物由来のチューブリン重合・脱重合阻害物質を新規抗がん剤のリード化合物として開発するために、海洋無脊椎動物の採集を行い、各動物を処理して粗抽出物を得た。更に、得られた試料について、神経成長因子存在下で、PC12細胞に対する作用を調べ、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する粗抽出物を見出した。次に活性を示すことが認められた、海綿動物並びにマナモコ、更に、フサコケムシから分離した細菌の培養エキスについて活性成分の検索を行い、セラミド、セレブロシド、ジケトピペラジン類を単離することができた。更に、構造活性相関の評価を行うために必要な数種のアナログ体の合成に着手した。

研究成果の概要(英文)：In this application research, in order to develop the tubulin polymerization and the depolymerization inhibitory substance of the marine invertebrate as a seed compound of a new antineoplastic drug and to separate an active ingredient, the sea invertebrate animal was collected, each animal was processed, and the rough extract was obtained. Furthermore, the extract which has a possibility of having investigated the action on PC12 cell and having affected the tubulin function under nerve growth factor existence about the obtained sample as the first activity testing was found out. The active ingredient was searched about the sponges, sea cucumbers, and the cultivation extract of the bacteria further separated from Bugula neritina, that was accepted to be that activity will be shown. A ceramide, cerebrosides, and diketopiperazine derivatives have been separated. Synthesis of several sorts of analog objects, required in order to evaluate structure activity relationship, was also started.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：チューブリン 抗がん剤 海洋無脊椎動物 棘皮動物 ナマコ 海綿動物 海洋性細菌 海洋性真菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経突起伸展作用物質の探索研究に関しては、申請者らの研究 [K. Yamada, et al., Chem. Pharm. Bull., 57 (3), 315-317 (2009), K. Yamada, et al., Chem. Pharm. Bull., 56(5), 734 (2008), M. Kaneko, K. Yamada, et al., Chem. Pharm. Bull., 55(3), 462 (2007)] をはじめ、分化誘導物質に関する研究例が多く報告されている。一方、チューブリン重合阻害活性物質に関する報告例としては、微生物の産生物質としては、rhizoxin [S. Iwasaki, et al., J. Antibiot., 37, 354, (1984)], phomopsin [M. F. Mackey, et al., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1219 (1986)], ustiloxin [Y. Koiso, et al., Tetrahedron Lett., 33, 4157 (1992)] 等が、更に、植物成分としては、colchicine [J. W. Cooke, et al. "The Alkaloids II" Academic Press (1952)], や steganacin [S. M. Kupchan, et al., J. Am. Chem. Soc., 95, 1335 (1973)] に端を発し、taxol [P. Schiff, et al., Nature, 277, 665 (1979), J. Manfredi, et al., J. Cell. Biol., 42, 126 (1986)] 等をはじめ多くの成分が知られている。一方、海洋生物由来のチューブリン重合阻害活性物質としては、dolastatin 10 [G. R. Pettit, et al., J. Am. Chem. Soc., 109, 6883 (1987)], halichondrin B [D. Uemura, et al., J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)], laulimalide [S. L. Mooberry, et al. Cancer Rev., 58, 653 (1998)], eleutherobine [T. Lindel, et al. J. Am. Chem. Soc., 119, 8744 (1997)], diazomamide [N. Lindquist, et al. J. Am. Chem. Soc., 113, 2303 (1991)] 等の報告がなされているが、抽出・分離の段階からチューブリンを分子標的として抗がん剤のリード化合物を海洋動物から極微量成分に至るまで探索する試みは、世界的にも稀である。(2) これまで申請者は、棘皮動物より多種多様な構造を有するスフィンゴ糖脂質成分を多数分離し、その構造の解明を行ってきた。また、それら多くの成分は、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞に対して顕著な神経突起伸展作用を示すことを見出してきた。更に、それら活性成分の構造と活性の相関について検討を行い、スフィンゴ糖脂質成分の活性発現に必須な構造単位を明らかにすることに成功してきた。一方、神経細胞における神経突起の伸展現象は、主に、チューブリン分子の重合に基づく微小管の形成に依存していることが知られている。微小管は、細胞分裂等の様々な細胞機能に関与している。その構成単位であるチューブリンは、重合・脱重合を繰り返し、微小管の機能発現のための動的な構造形成を司っている。従って、がん細胞のチューブリン分子の重合・脱重合阻害剤を開発することは、微小管の機能を制御することでがん細胞の分裂を抑制する薬剤の開発につながると

考えられる。

2. 研究の目的

がん克服の実現のためには、より有効な新規抗がん剤を創出することが不可欠である。本申請研究は、がん克服の実現を可能にする新規抗がん剤開発のためのリード化合物の創製を目指して、海洋無脊椎動物からチューブリン分子の重合・脱重合阻害物質を探索し、活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として行った。本申請研究では、新規抗がん剤開発のためのリード化合物の創製を目指した基礎研究として、(1) がん細胞の分裂等の細胞機能に大きく関与しているチューブリンの重合・脱重合を阻害する化学物質を九州西岸海域産海洋無脊椎動物から探索し、(2) その構造解明と構造活性相関の検討を行い、(3) 活性アナログ体開発のための基礎データとして、活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として行った。具体的には(1) 海洋無脊椎動物の抽出物について PC12 細胞に対する神経突起伸展作用を検討し、チューブリン機能に影響を与えている可能性を示す抽出物を選出し、突起伸展作用を指標にして活性成分を単離する。(2) 活性成分の作用点がチューブリン/微小管であることを確認するために、HT1080 細胞の細胞質微小管に対する影響を指標にした活性試験を行う。(3) 活性を示す成分の構造を解明する。(4) 構造活性相関の検討と活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として行った。

3. 研究の方法

天然有機化合物を医薬素材として開発するためには、化学構造の単純化と低分子量化が必要である。本申請研究では、九州西岸海域産海洋無脊椎動物由来のチューブリン重合・脱重合阻害物質を新規抗がん剤のリード化合物として開発するために、活性成分の分離、活性成分の構造解明、さらには、活性発現に必須な構造単位の解明を行った。本研究は、以下の手順で行った。

(1) 平成23年度：海洋無脊椎動物のスクリーニングと活性成分の抽出・単離を主に行った。

九州西岸海域に豊富に生息している海洋生物、特に、海洋無脊椎動物(棘皮動物、腔腸動物、軟体動物、海綿動物、原索動物等)の採集を行った。

採集した各試料動物を処理して、粗抽出物(n-hexane、酢酸エチル、n-BuOH等)を得た。

第一次活性試験として、得られた各粗抽出物について、神経成長因子(NGF)共存下で PC12 細胞に対する神経突起伸展作用を調べ、突起の伸展作用を示し、チューブ

リン機能に影響を与えている可能性を有する抽出物を選出した。

活性を示した抽出物について、活性を指標にしながら、微量成分に至るまで徹底的に活性成分の分離・精製を行う。活性成分の分離精製操作には、各種オープンカラムクロマトグラフ、中圧液体クロマトグラフ装置、高速液体クロマトグラフ装置等を用いて行った。

(2)平成24年度：活性成分のチューブリン重合・脱重合作用の検討と精密構造解析を行った。

単離した活性成分の作用点がチューブリン/微小管であることを確認するために、第二次活性試験として、ヒト線維肉腫細胞HT1080の細胞質微小管に対する作用を、抗チューブリン抗体を用いた免疫染色法で解析し、高感度かつ高い特異性をもってチューブリン重合・脱重合への作用を確認した。

チューブリン重合・脱重合作用を示すことが認められた成分について、各種機器スペクトル(NMR、MS、IR、UVスペクトル)データならびに化学的手法を用いて、化学構造の解明を行った。

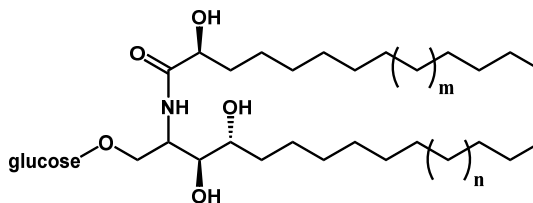
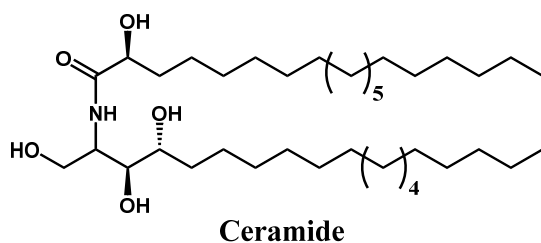
(3)平成25年度：活性成分の構造活性相関の検討と活性発現構造単位の解明を行った。

得られた活性成分のうち、Control物質より顕著な活性を示す化合物を出発物質として、その誘導体を調製した。

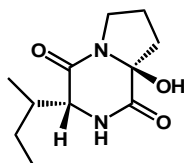
4. 研究成果

(1)平成23年度には活性成分の分離を行うために、海洋無脊椎動物の採集を行い、各動物を処理して粗抽出物を得た。更に、第一次活性試験として、得られた試料について、神経成長因子(NGF)存在下で、PC12細胞に対する作用を調べ、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する粗抽出物を見出した。

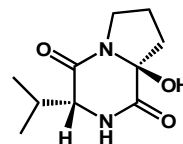
(2)平成24年度は、23年度活性を示すことが認められた、海綿動物並びにマナマコ、さらに、フサコケムシから分離した細菌の培養エキスについて活性成分の検索を行った。海綿動物からセラミド類を、マナマコからはセレブロシドを分離することができた。海洋性細菌のうち、Staphylococcus sp.からは、2種の新規化合物、staphyloamide A, Bを含む合計11種のジケトピペラジン誘導体を単離することができた。



(3)平成25年度は、活性アナログ体の開発のための基礎データとして、活性発現に必要な構造単位の解明することを目的として、



staphyloamide A



staphyloamide B

構造活性相関の評価を行うために必要な数種のアナログ体の合成に着手した。また、同時に、環状デブシペプチド類並びに、マクロラクトン類も単離し構造を明らかにすることができたので、その活性について評価を行う計画を立てた。

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 6件)

Amgad I. M. Khedr, Isao Kouno, Takashi Tanaka, Koji Yamada, New diketopiperazine derivatives from culture broth of Staphylococcus sp. isolated from Corallina officinalis Lineaus, *Heterocycles*, 87(5)1029-1037 (2013). 査読有

DOI. 10.3987/COM-13-12691

千々松武司, 山田耕史, 小田裕昭, 望月聡, 二枚貝、特にシジミの機能性因子に関する研究, *New Food Industry*, 55, 23-31 (2013). 査読無

DOI. <http://www.newfoodindustry.com/> Chijimatsu Takwshi, Umeki Miki, Kataoka Yutaro, Kobayashi Satoru, Yamada Koji, Oda Hiroaki, Mochizuki, Satoshi, Lipid components prepared from a freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract ameliorate hypercholesterolemia in rats fed high-cholesterol diet. *Food Chem.* 136(2), 328-334 (2013). 査読有
DOI. <http://dx.doi.org/10.1016/j-foodchem.2012.08.070>

Miho Asano, Koji Yamada, Takashi Tanaka, Yousuke Matsuo, Isao Kouno, New bisabolane sesquiterpene from the mycelia of *Amanita virgineoides*,

Chem. Pharm. Bull., 61(3), 366-369 (2013). 査読有
DOI. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c12-01070>
Yakabe Yukino, Terato Masahiro, Higa Ataru, Yamada Koji, Kitamura Yoshie, Iron availability alters ascorbate-induced stress metabolism in *Glehnia littoralis* root cultures, *Phytochemistry*, 74, 100-104 (2012). 査読有
DOI. 10.1016/j.phytochem.2011.10.015
Takeshi Chijimatsu¹, Miki Umeki, Yuji Okuda, Koji Yamada, Hiroaki Oda, Satoshi Mochizuki, The fat and protein fractions of freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract reduce serum cholesterol and enhance bile acid biosynthesis and sterol excretion in hypercholesterolaemic rats fed a high-cholesterol diet, *British Journal of Nutrition*, 105(4), 526-534 (2011). 査読有
DOI. 10.1017/S0007114510004058

[学会発表](計 10件)

Amgad Ibrahim Mansour Khedr, Reda F. A. Abdelhameed, 山田耕史、海洋細菌由来の生物活性成分に関する化学的研究 (第9報) 第30回日本薬学会九州支部大、2013年12月7日~12月8日、佐世保市
佐藤愛、山田耕史、松尾洋介、齋藤義紀、田中隆、シソ科ハーブ乾燥時におけるコーヒー酸エステル酸化反応、日本生薬学会第60回年会、2013年9月7日~9月8日、北海道当別町
水野幸代、八田満寿美、増田 充、片山拓弥、山田耕史、シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pall.) 地上部の生物活性成分に関する化学的研究 (第2報) 日本生薬学会第60回年会、2013年9月7日~9月8日、北海道当別町
八田満寿美、増田 充、片山拓弥、河野功、田中 隆、山田耕史、シャクヤク (*Paeonia lactiflora* Pall.) 地上部の生物活性成分に関する化学的研究 (第1報) 日本薬学会第133年会、2013年3月28日~3月30日、横浜市
Amgad Ibrahim Mansour Khedr, 山田耕史、海洋細菌由来の生物活性成分に関する化学的研究 (第8報) 第29回日本薬学会九州支部大、2012年12月8日~12月9日、熊本市
麻野美帆、田中隆、松尾洋介、山田耕史、河野功、テングタケ科キノコの培地化学成分、日本生薬学会第59回年会、2012年9月17日~9月18日、木更津市
Amgad I. M. Khedr, Masumi Yamaguchi,

Koji Yamada, Chemical Study on the Bioactive Constituents from Marine Bacteria, The 9 Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012年7月13日~16日、高知市
平川一郎、木村正成、濱本真稔、山田耕史、孟宗竹 (*Phyllostachys heterocycla* f. *pubescens*) 由来の生物活性成分に関する化学的研究 (第1報) 日本薬学会第132年会、2012年3月30日、札幌市
山田耕史、海洋細菌由来の生物活性成分、日本化学会西日本大会(招待講演) 2011年10月13日、徳島市
麻野美帆、松尾洋介、山田耕史、河野功、チャオニテングタケ培地のジテルペノイド成分、日本生薬学会第58回年会、2011年9月24日、東京

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/plan6/index-j.html>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
山田 耕史 (YAMADA, Koji)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 00253469

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：