

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659427

研究課題名（和文） 海洋由来天然化合物 exiguolide の新規抗腫瘍メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanisms of an anti-cancer effect of a novel marine natural compound, exiguolide.

研究代表者

久保 裕司 (KUBO HIROSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：20332504

研究成果の概要（和文）：

海綿由来天然化合物 exiguolide の抗腫瘍メカニズムの解明と、exiguolide 骨格をもとにした構造類縁体を人工合成し新たな抗癌剤を開発することが本研究の目的である。exiguolide は極めて低濃度で、培養肺癌細胞の H460（大細胞肺癌）と A549（肺腺癌）の増殖抑制効果を示した。この効果は動物モデルでも確認した。exiguolide の抗腫瘍メカニズムの一つは、癌細胞の細胞周期への作用であることが明らかとなった。これらの結果をもとに、exiguolide 構造類縁体を数種類作成した。そこから、より効果が高く、生体毒性の少ない新規抗癌剤が開発されると考える。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this experiment is to elucidate the mechanisms of an anti-cancer effect of a novel marine natural compound, exiguolide. The cell cycle of cultured cancer cells was arrested with apoptotic cells death under incubation with exiguolide. Tumor growth was also attenuated by the treatment with exiguolide in the *in vivo* xenograft model in mice. Several kinases were involved in this anti-cancer effect. Then, we synthesized exiguolide analogues with modified structures. Some of the analogues had a similar anti-cancer effect in both *in vitro* and *in vivo*. These results will bring the basis for developing a new anti-cancer drug, which can be clinically applicable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：創薬，癌，海洋生物，薬剤反応性，シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

古来自然に存在する天然化合物から様々な医薬品が発見されてきた。陸上植物や微生物由来の化合物から数多く医薬品が開発されたが、海洋生物由来化合物の応用は未だ進んでいない。地球表面の70%以上占め、陸上とは比較にならないほど多種多様な生物が

物由来の化合物から数多く医薬品が開発されたが、海洋生物由来化合物の応用は未だ進んでいない。地球表面の70%以上占め、陸上とは比較にならないほど多種多様な生物が

住む海洋は、未知の有用な化合物が多数存在すると考えられる。また、陸上生物と大きく異なる生態系や代謝系を海洋生物は持つため、これまで発見されていない新たな作用機序を持つ医薬品が生まれる可能性を秘めている。

近年、海綿 *Geodia exigua* より新規天然化合物として *exiguolide* が抽出された。*exiguolide* は大環状ラク톤を有し、バフノウニ配偶子の受精阻害作用を持つ。予備実験として行った培養癌細胞増殖抑制効果は、肺癌細胞とくに大細胞癌細胞腫で強く認められた。この癌腫選択性から、*exiguolide* は既存の抗癌剤とは異なった作用機序により抗腫瘍効果を発揮することが示唆される。また、*exiguolide* の腫瘍増殖抑制効果は 10^{-8} M と極めて低濃度で発揮され、抗癌剤として極めて有望な天然化合物である。

この *exiguolide* の人工合成法を研究分担者の不破が世界に先駆けて開発した。合成が可能になったことにより、より安全で効率的な *exiguolide* 構造類縁体が作成可能となった。しかし、この *exiguolide* の抗腫瘍メカニズムはまだ明らかではなく、そのため *exiguolide* 構造のどの部分を修飾すればより有効な構造類縁体が作成できるかの手がかりはない。

2. 研究の目的

この日本で発見された海綿由来天然化合物 *exiguolide* をもとに、東北大学で開発した人工合成法を用いて、肺癌特異的な抗癌剤を開発することが目的である。

Exiguolide の抗腫瘍効果メカニズム解明のため、培養癌細胞の細胞周期に及ぼす影響、*in vivo* での効果発現の有無、網羅的遺伝子発現解析による細胞内シグナル伝達経路の解析を行う。また、*exiguolide* の骨格を基礎として、その側鎖を修飾した様々な構造類縁体を作成し、*exiguolide* と抗腫瘍効果の比較を行う。

本研究において *exiguolide* の抗腫瘍メカニズムを解明し、より効果的な *exiguolide* 構造類縁体を人工合成法を用いて開発。新規抗癌剤の創薬を目指す。

3. 研究の方法

(1) *exiguolide* 抗腫瘍効果を培養癌細胞および動物実験で確認する。

具体的には、肺癌細胞 H460 (大細胞肺癌由来) および A549 (肺腺癌由来) を培養し、 $1\mu\text{M}$ の *exiguolide* を 6 時間作用させ、細胞死の

変化を Annexin-V/PI 染色で確認した。また、細胞周期への影響を FACS で定量した。

動物実験では、ヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) 皮下に、 5×10^6 個の H460 細胞または A549 細胞を移植した。腫瘍が形成された段階で、*exiguolide* (0.2 mg/kg/day) を腹腔内に投与し、腫瘍体積の変化を計測した。

(2) 抗腫瘍メカニズム解明のため、細胞周期調節・DNA 合成阻害作用および転写経路への影響をマイクロアレイを用いて検討する。

具体的には、肺癌細胞 H460 および A549 を培養し、 $1\mu\text{M}$ の *exiguolide* を 6 時間作用させたのち、細胞を回収し、RNA を抽出した。mRNA 発現解析は、Affymetrix human genome gene chip HG U133 Plus 2.0 を用いて行った。結果は、GeneSpring GX 11 を使い、1.8 倍以上の発現変化を示す遺伝子を有意な変化と考え、解析を行った。さらに、Connectivity Map (www.broadinstitute.com/cmap/) と Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてネットワーク解析を行った。

(3) 上記研究により解明した *exiguolide* 作用点情報より構造類縁体を作成し、その効果を培養細胞および動物実験でスクリーニングする。

4. 研究成果

(1) 培養肺癌細胞 H4

60 および A549 で *exiguolide* の抗癌活性を検討した。*exiguolide* の添加により、癌細胞の増殖が停止し、細胞の形態変化が認められた (図 1)。

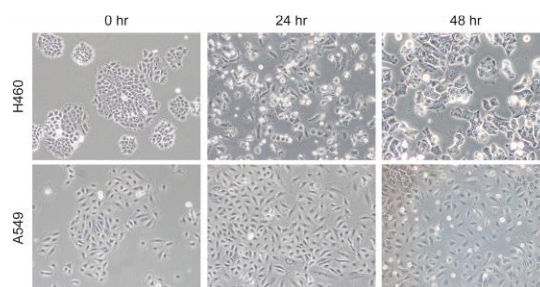


図 1

次に、癌細胞をヌードマウス皮下に接種し、*in vivo* においても *exiguolide* が腫瘍増殖を抑制するか検討した。その結果、 0.2 mg/kg という極めて低濃度で腫瘍の増殖抑制効果を示すことが明らかとなった (図 2, 3)。



Vehicle Exiguolide

図 2

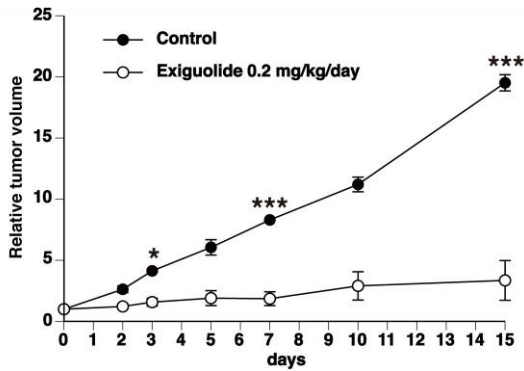


図 3

(2) exiguolide 抗腫瘍メカニズム解明のため exiguolide で処理した培養癌細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。また、GEAによって、関連する細胞内情報ネットワークと類似薬剤の推測を行った。

まず GEA の結果, exiguolide と反する作用を示す薬剤として H-7 が提示された (表 1)。H-7 は PKC 阻害剤であるため, exiguolide の主たる作用は PKC の活性化にあると考えられた。

rank	cmap name	mean	n	enrichment	p	specificity	% non-null
1	H-7	-0.719	4	-0.951	0.00000	0.0833	100
2	miloxantrone	-0.737	3	-0.954	0.00022	0.0213	100
3	CP-690334-01	-0.295	8	-0.690	0.00024	0.0068	50
4	lasalocid	0.526	4	0.873	0.00036	0.0098	100
5	geldanamycin	-0.340	15	-0.506	0.00042	0.0859	53

表 1

さらにネットワーク解析を行ったところ、

ERK 等を含む様々な kinase の活性化を調節することが明らかとなった (図 4)。

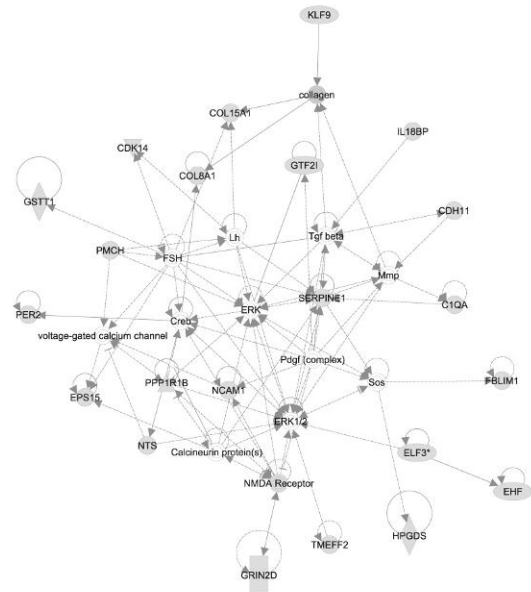


図 4

(3) 以上の結果をもとに、図 5 のように exiguolide の側鎖に修飾を加えた 17 種類の構造類縁体を作成した。

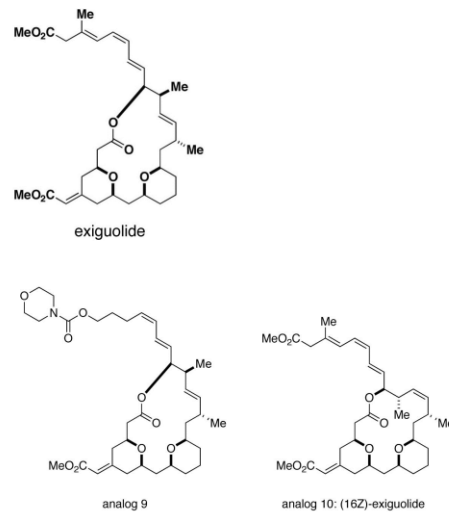


図 5

それぞれの類縁体は、異なる抗腫瘍活性を持つことを培養細胞を用いた増殖能の解析で明らかとなった (図 6)。

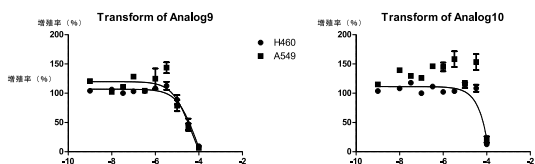


図 6

Exiguolide 骨格をもとに修飾を加えた構造類縁体は、その多くが抗腫瘍効果を持つ。このことは、exiguolide が将来的な新規抗癌剤開発の基盤として有用であることを示している。ただ、現段階での exiguolide および類縁体では、高濃度における細胞毒性を認めるため、抗腫瘍効果の至適発現のために、側鎖修飾をさらに検討する必要があると考えられた。

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 1 件)

- ①. Fuwa H, Mizunuma K, Sasaki M, Suzuki T, Kubo H. Total Synthesis and Biological Evaluation of (-)-Exiguolide Analogues: Importance of the Macrocyclic Backbone. *Org Biomol Chem* 11: 3442-3450, 2013. doi: 10.1039/c3ob40131f (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ①. Suzuki T, Kubo H, Yamada M, Fuwa H, Fujino N, Takahashi T, Ota C, Yamaya M, and Kondo T. An Anti-Cancer Effect Of Newly Synthesized Marine Macrolide, (-)-Exiguolide. American Thoracic Society International Conference (米国) 2012 年 5 月 22 日
- ②. Suzuki T, Kubo H, Fuwa H, Kondo T. An anti-cancer effect of newly synthesized macrolide compounds. American Thoracic Society International Conference (米国) 2011 年 5 月 18 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 裕司 (KUBO HIROSHI)
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：20332504

(2) 研究分担者

不破 春彦 (FUWA HARUHIKO)
 東北大学・大学院生命科学研究科・准教授
 研究者番号：90359638

(3) 連携研究者

()

研究者番号：