

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592417

研究課題名(和文)天然物リガンドDNTによる特異的な前立腺癌増殖阻害の作用機序解明

研究課題名(英文) Action mechanism elucidation of DNT, anti-prostatecancer agent from natural products

研究代表者

山崎 洋子 (YAMAZAKI, Yohko)

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：80342690

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺がんにおいて内分泌療法の初期奏効率は非常に高い。しかし、数年後にはその半数以上が去勢抵抗性癌へと進行する。去勢抵抗性癌においてもアンドロゲンレセプター(AR)が前立腺がんの生存増殖に重要であるが、AR阻害薬としてはアンタゴニストが存在するのみである。

申請者らは、新しい機序の抗前立腺癌物質の発見を目指して、微生物代謝産物から探索研究を行った。その結果、カビから精製した低分子化合物であるN-deoxynortryptoquivalineが、ARの核内移行を抑制することによって細胞毒性を示さずヒト前立腺癌細胞株LNCaPの増殖を特異的に抑制することを発見した。

研究成果の概要(英文)：Endocrine therapy (androgen ablation) is the main treatment for advanced prostate cancer. Despite an initial efficacy of androgen deprivation therapy, prostate cancer progress within a few years from androgen-dependent to castration-resistant (CRPC) disease in most of the patients. Although AR still plays an essential role in CRPC, AR inhibitor is only an antagonist.

We hypothesized that a new type AR inhibitor could serve as a unique therapeutic agent for prostate cancer. To identify a new type AR inhibitor, we screened cultured broths of microorganisms and found that small molecule compound N-deoxynortryptoquivaline (DNT), a novel inhibitor of AR function, showed potent inhibition against androgen-dependent proliferation of LNCaP prostate cancer cells. DNT showed significant inhibition of AR nuclear translocation and against androgen-dependent proliferation of LNCaP cells.

研究分野：去勢抵抗性前立腺がんにおけるアンドロゲンレセプター機能阻害剤の開発

キーワード：去勢抵抗性前立腺がん アンドロゲンレセプター

1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は高齢化や食事の欧米化、および診断技術の向上【腫瘍マーカーとしての PSA (前立腺特異抗原) の導入】に伴ってその頻度が急増している癌である。疫学からの統計による予測では 2020 年には肺癌に次いで男性癌の 2 位になるとされている【日本のがん罹患の将来推計. がん・統計白書—罹患/死亡/予後—2004 大島明、黒石哲生、田島和雄編】。

初期の前立腺癌はアンドロゲン依存性癌であり、1940 年代に Huggins と Hodges によりアンドロゲン除去が前立腺癌患者の症状を改善すること [Huggins et al., *Cancer Res.*, 1941, 1:293] が報告されて以来、内分泌療法は進行前立腺癌に対する標準的な治療になっている。前立腺癌は進行病期に癌が発見されても、その 80% 以上は外科的あるいは薬物的アンドロゲン除去に反応し症状は軽快する。しかし数年後にはその半数以上がアンドロゲン依存性を喪失して内分泌療法抵抗性増殖を示すようになり、その後 1~2 年で癌死に至る。アンドロゲン非依存性を獲得した前立腺癌の治療法は確立されておらず、近年ドセタキセルとステロイドの併用が生存期間をわずか 2.5 ヶ月延長したという成績にとどまっている [Petrylak DP et al., *N. Engl. J. Med.*, 2004, 351:1513]。このような状況を鑑み、アンドロゲン非依存性を獲得した進行前立腺癌に対する新たな治療法を開発することは極めて重要な課題である。

アンドロゲンは性分化、造精機能など男性機能に不可欠のホルモンであるが、その機能はアンドロゲンレセプター (AR) を介して発揮される。ヒトではアンドロゲンの 95% は精巣由来テストステロンである。血中のテストステロンは前立腺において 5 α 還元酵素の作用で、より活性の強いジヒドロテストステロンに代謝される。ジヒドロテストステロンは核内レセプターである AR と結合し、AR は 2 量体となり核内移行をしてアンドロゲン応答性遺伝子のの上流に存在するアンドロゲンレスポンスエレメントに結合する。さらに AR は転写共役因子と呼ばれる一連のタンパク質と巨大複合体を形成し、この複合体が RNA ポリメラーゼ II を中心とする基本転写因子群と結合することによって標的遺伝子の転写が行われる (図 1)。研究開始当初には、内分泌治療で用いられている非ステロイド性抗アンドロゲン剤はビカルタミドとフルタミドのみであり、両者とも図 1 の経路のうち上流である AR とアンドロゲンの結合を阻害するものであった。

これら抗アンドロゲン剤投与や LH-RH (黄体形成ホルモン放出ホルモン) アゴニストによる化学的去勢などの内分泌療法継続により、前立腺癌はアンドロゲン非依存性を獲得する。その機序については、AR の過剰発現、突然変異、メチル化、共役転写因子の異常、リガンド非依存性活性

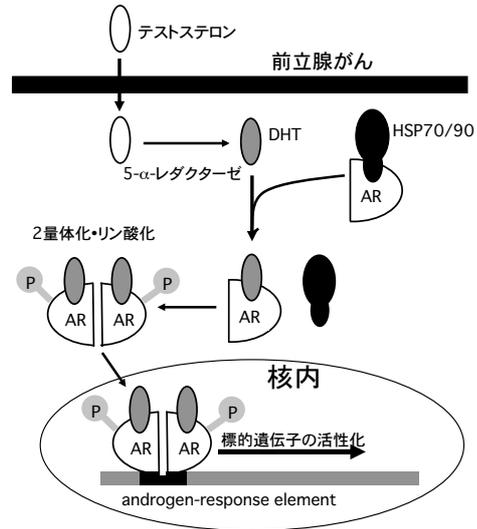


図1 前立腺癌におけるARの作用機序

化などが報告されており [Heinlein CA, Chang C., *Endocr. Rev.*, 2004, 25(2):276]、临床上ではこれらの因子が重複し、解析が困難な状況にある。しかしながら、アンドロゲン非依存性前立腺癌においても依然として AR が前立腺癌の生存増殖に重要であり、AR の機能を阻害することによってアンドロゲン非依存性の増殖を阻害できることが明らかになっている [Chen CD et al., *Nature Med.* 2004, 10: 33]。

2. 研究の目的

申請者らはヒト前立腺癌細胞株 LNCaP のアンドロゲン依存性増殖を特異的に抑制する化合物を微生物代謝産物約 4 万種類から探索した。その結果、カビの培養液から精製した低分子化合物である *N*-deoxynortryptoquivaline (DNT) が細胞毒性を示さず、LNCaP のアンドロゲン依存性増殖を阻害することを発見した (図 2)。本研究では DNT のアンドロゲン依存性増殖阻害の作用機序を明らかにすることを目的とする。

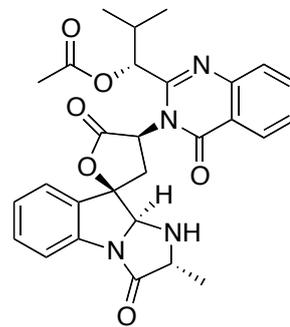


図2 DNTの構造

3. 研究の方法

(1) DNT は申請者らがヒト前立腺癌細胞株 LNCaP の増殖阻害を指標に微生物代謝産物からスクリーニングを行い、得たものである。以後の実験に継続して用いるため

に生産菌であるカビを大量培養し、精製を行った。また、NMR および MS 解析から DNT と一緒に精製される類縁体の構造を決定し、構造活性相関を求めた。

(2) DNT が AR のアンタゴニストとして機能しているかどうかを調べるため、AR 競合結合アッセイを行った。蛍光リガンドとリコンビナント AR を用いて蛍光偏光を測定することにより、AR と DNT の親和性を測定し、DNT が AR のアンタゴニストであるか評価を行った。

(3) DNT の AR 転写活性における影響はこれまで AR 転写活性を測定するためのレポーター遺伝子を発現する安定細胞株 (Stable AR-Luc) を用いたレポーターアッセイで解析してきたが、より正確な解析を行うため内部標準を設けることができるデュアルルシフェラーゼアッセイで解析を行った。さらに、乳がん細胞株 MCF-7 を用いてエストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターの転写活性における DNT の効果を評価した。

(4) AR を核内へ輸送する核内輸送受容体は Importin- α であるとされている [Mark L. et al., J Cell Sci. 2008,121: 7]。ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP を用いて Importin- α や輸送担体である importin- β と AR の結合における DNT の影響を免疫沈降法で解析した。同様に、AR のシャペロン分子である HSP [Smith DF. et al., Mol Endocrinol. 2008,22: 10] と AR の結合における DNT の影響を免疫沈降法で解析した。

(5) DNT の作用機序を明らかにするため、文部科学省科学研究費補助金・がんの特性等を踏まえた総合支援活動・化学療法基盤支援活動 標準阻害剤キットを使用し、DNT のアンドロゲン依存性増殖阻害活性を抑制する化合物の探索を行った。96well に LNCaP を撒き、24 時間後に阻害剤キット 1-3(285 種類の阻害剤)を 3、0.3、0.03、0.003 nM 添加し、6 および 24 時間後に DNT 0.1 μ g/ml および合成アンドロゲン R1881 1 nM を添加し、MTT 法により DNT の LNCaP に対する影響を評価した。

4. 研究成果

(1) DNT の精製と類縁体の構造決定

DNT 生産カビを玄米 20kg に撒き、静置培養後、アセトン抽出を行った。アセトンを除去した後、酢酸エチルで溶媒抽出を行い、図 3 のように精製を行った。

最終の精製ステップである HPLC で UV 吸収の特徴から DNT 類縁体を 10 種類単離した。単離した 10 種類の DNT 類縁体の NMR およびマスマスペクトルを測定し、それぞれの構造式を決定した。また、それぞれの類縁体の LNCaP におけるアンドロゲン依存増殖阻害活性を測定した。

それぞれの構造とアンドロゲン依存増殖に対する阻害活性を図 4 に示す。

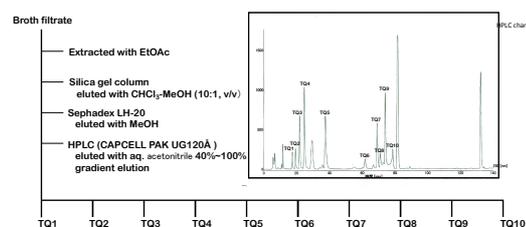


図3 DNTの精製

Compound	Chemical name	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μg/ml) Cytotoxicity	Anti-androgen*
TQ1	Tryptotoquivaline F	H	H	H	>33.3	>33.3
TQ2	(unknown)				>33.3	>33.3
TQ3		H	CH ₃	H	>33.3	>33.3
TQ4		H	CH ₃	H	>33.3	>33.3 (19-epimer)
TQ5	Tryptotoquivaline G	H	CH ₃	OH	8.3	8.5
TQ6	N-deoxytryptotoquivaline (DNT)		H	H	20	0.02
TQ7	N-deoxytryptotoquivaline		CH ₃	H	10	0.02
TQ8	De-O-acetyl-4-epitryptotoquivaline		CH ₃	OH	3.2	4.8
TQ9	Tryptotoquivaline F		H	OH	0.8	3.8
TQ10	19-Epitryptotoquivaline F		H	OH	0.8	4.0 (19-epimer)

* "Anti-androgen" is the IC₅₀ values for inhibition of androgen-dependent LNCaP cell growth (5 days treatment).

図4 DNT類縁体の構造とアンドロゲン依存増殖に対する阻害活性

(2) DNT の AR アンタゴニスト活性

蛍光リガンドを用いた AR 競合結合アッセイの結果、ジヒドロテストステロンは IC₅₀=1.1 nM、臨床で使用されている AR アンタゴニストであるビカルタミドは IC₅₀=490 nM で蛍光リガンドに対して競合的に作用したのに対して DNT は 1 mM 添加しても蛍光リガンドに対して競合作用を示さなかった。以上の結果から、DNT は AR のアンタゴニストではないことが示唆された。

(3) DNT の AR 転写活性における阻害活性

DNT が AR の転写活性に及ぼす影響をアンドロゲン依存性ヒト前立腺がん LNCaP および VCaP、アンドロゲン非依存性ヒト前立腺がん 22Rv1 で解析した。その結果、LNCaP では DNT は AR の転写を用量依存的に阻害したが、VCaP ではほとんど阻害効果がなかった。実際、DNT のアンドロゲン依存性増殖に対する阻害効果は VCaP では弱まることを確認した。VCaP では AR が過剰発現しており、同じアンドロゲン依存性前立腺がんにおいても DNT に対する感受性の差がみられた。さらに、DNT はアンドロゲン非依存性の前立腺がん 22Rv1 においても AR の転写を阻害していることが明らかになった。22Rv1 はリガンド非依存性の短鎖型 AR を発現しているが、アンドロゲン添加により 3 倍のルシフェラーゼ活性の増強がみとめられた(図 5)。LNCaP において DNT は AR の核内移行を阻害することが確認されており、VCaP、22Rv1 においても AR の核内移行に及ぼす DNT の作用を解析する予定である。

また、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 でエスト

ロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターに対する阻害活性をレポーターアッセイにより評価したが、DNT はエストロゲンレセプターおよびプロゲステロンレセプターの転写活性に対してはほとんど阻害効果を示さなかった。

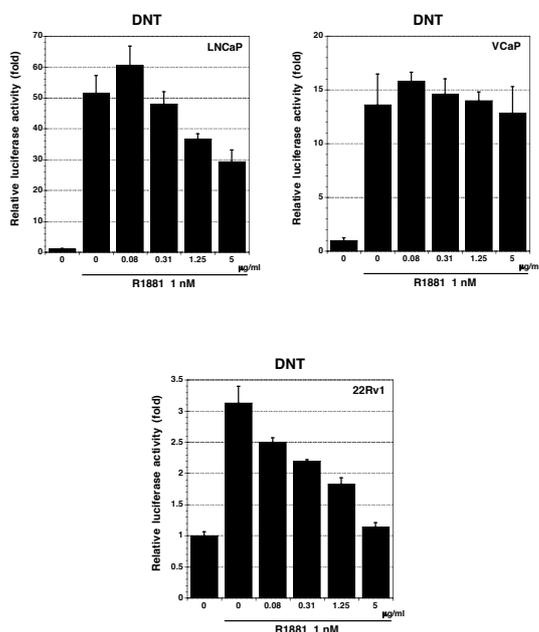


図5 DNTの増立量におけるAR転写活性に及ぼす影響

(4) Importin- α 、importin- β 、HSP における DNT の影響

LNCaP において免疫沈降法により Importin- α および β の解析を試みたが、検出が難しく解析ができなかった。免疫沈降に用いるタンパク量および抗体量を増やすなど実験条件を変えてみたが、同様の結果に終わった。HSP については DNT を添加することによって変化がみとめられなかった。

(5) 阻害剤キットを用いた作用機序の解析

LNCaP において DNT のアンドロゲン依存性増殖に対する阻害活性を抑制する化合物を阻害剤キットを用いてスクリーニングした。その結果、3-ATA と Staurosporine が 6 時間、24 時間両方の前処理で、DNT の阻害活性を抑制することが明らかになった。3-ATA は CDK4 の特異的阻害剤であり、Staurosporine はプロテインキナーゼ阻害剤である。両者とも 0.003 nM という低濃度で DNT の活性を抑制していることから CDK4 とプロテインキナーゼが DNT のアンドロゲン依存性増殖阻害のメカニズムに関わっている可能性があるため、今後検証を行う。

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 2 件)

- ① Y. Yamazaki, T. Someno, M. Igarashi, N. Kinoshita, M. Hatano, M. Kawada, I. Momose, A. Nomoto. Androprostamines A and B, the new anti-prostate cancer agents produced by *Streptomyces* sp. MK932-CF8. *J. Antibiot.*, 査読有, 68, 2014, 279-285, DOI: 10.1038/ja.2014.135.
- ② N. Oku, S. Matoba, Y. Yamazaki, R. Shimasaki, S. Miyanaga, Y. Igarashi. Complete stereochemistry and preliminary structure-activity relationship of rakicidin A, a hypoxia-selective cytotoxin from *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 査読有, 77, 2015, 2561-5, DOI: 10.1021/np500276c.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 山崎洋子、増田徹、川田学、百瀬功、野本明男. 新規抗癌剤 androprostamine の抗腫瘍効果. 第 73 回日本癌学会総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (横浜).
- ② 山崎洋子、増田徹、川田学、百瀬功、野本明男. 去勢抵抗性前立腺癌に対する新規抗癌剤 Androprostamine. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 4 日, パシフィコ横浜 (横浜).
- ③ 的場翔平、奥直也、山崎洋子、嶋崎良子、宮永賢、五十嵐康弘. Rakicidin の全立体構造および構造活性相関. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 27 日, 東北大学 (宮城).
- ④ 山崎洋子、増田徹、川田学、百瀬功、野本明男. Androprostamine: A new antitumor agent for androgen-dependent prostate Cancer. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association. 2013 年 2 月 22 日, Maui (USA).

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/achievements.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 洋子 (YAMAZAKI, Yohko)

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: 80342690