

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462603

研究課題名(和文) 内服可能な大豆タンパクペプチドによる卵巣がん分子標的抗腫瘍薬の開発

研究課題名(英文) Development of Molecular Targeted Anti-tumor Drugs for Ovarian Cancer Using Soy Protein Peptide Which Can Be Administered Orally

研究代表者

春田 祥治 (Haruta, Shoji)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30448766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はすでにビクニンと命名された副作用のないがん転移抑制薬を開発し、進行卵巣癌患者に対して経静脈投与を行う臨床試験の結果、5年生存率の改善をみた。本研究では、担癌マウスにおいて大豆蛋白を精製する際の廃棄物中に多く含まれる大豆ビクニンの内服投与によるがん転移抑制効果が明らかとなった。また、大豆ビクニン作用を模倣する低分子化合物開発のための分子シミュレーションを行い、ビクニン受容体に最も親和性の高いビクニン低分子物質を選択し、リード物質の設計および試作を行った。本研究の成果により内服可能なビクニン低分子化合物の開発が実現されれば、卵巣癌患者の予後改善だけでなく患者QOLの向上に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：We already developed a cancer metastasis inhibitor named bikunin which has no side effects. In a clinical study which intravenously administered the inhibitor for patients with advanced ovarian cancer, improvement was found in 5-year survival rate. The present study revealed that oral administration of soybean bikunin, which is contained in the waste produced by purifying soy protein, suppressed cancer metastasis in tumor-bearing mice. We also performed molecular simulation to develop low molecular compounds simulating the action of soybean bikunin. Subsequently, we selected a low molecular weight substance of bikunin which had the highest affinity to bikunin receptors, and designed and made samples of a lead compound. We believe that if we can develop low molecular compounds of bikunin which can be administered orally by the present study, it would contribute to not only to improve prognosis of patients with ovarian cancer, but also to improve QOL of patients.

研究分野：医学(産科婦人科学)

キーワード：大豆ビクニン がん転移抑制薬 分子標的薬 低分子薬 卵巣癌

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬の登場が、がんに対する治療の変革をもたらした。モノクローナル抗体の開発や、メシル酸イマチニブやゲフィチニブなどの小分子化合物が臨床応用され始め、ポストゲノム時代を実感する時代に突入した。従来の抗がん剤（殺細胞性抗がん剤）が細胞傷害を狙うのに対し、分子標的治療薬の多くが細胞増殖に関わる分子を阻害し毒性のプロファイルが異なることが期待された。しかし、当初想定していなかった間質性肺炎などの致死性毒性が出現する可能性があり、毒性が少なく安全性が高いとは一概には言えないことも判明した。

我々は、ヒト羊水から副作用のない分子標的抗腫瘍薬（国際的にビクニンと命名されたがん転移抑制薬：図中央アンプル）を開発した¹⁾。ビクニンは細胞増殖を抑制するが、がん転移抑制効果に優れているという特徴がある。本邦ではヒト尿から精製したビクニンはすでに商品（ウリナスタチン：図右側バイアル）として販売されている。

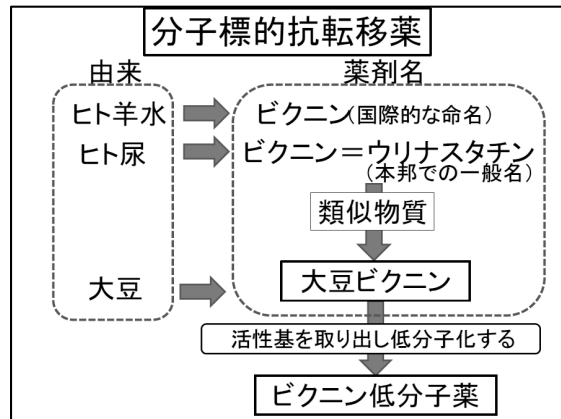


次に我々は、臨床研究で進行卵巣がん患者にウリナスタチンを注射することにより、有意に優れた5年生存率を得ることができた。しかも抗がん剤や従来の分子標的治療薬にみられる副作用は全く認めなかった。この成果は2007年に日本産科婦人科学会総会で報告した¹⁾。続いて我々は、ビクニン作用を模倣する天然成分の探索を行い、大豆蛋白を精製するときに廃棄されていた分画に大豆ビクニン（活性基分子量8000）が存在することを発見した（図左側袋入り）¹⁾。

そしてマウスを用いた研究で、大豆ビクニンは内服可能であることを確認した。さらに薬剤の分子シミュレーションを行っている豊橋技術科学大学、バイオIT関連企業であるネットフォース(株)との共同研究によりビクニン作用を模倣する低分子薬および内服できる分子標的抗腫瘍薬の

作成に着手している²⁾。

ビクニンは、がん細胞のシグナル伝達に重要な Src リン酸化を抑制し、MAP キナーゼの活性化を制御することにより、がん転移に重要な酵素であるウロキナーゼや炎症性サイトカイン（インターロイキン1やTNF）産生を抑制し、抗腫瘍・抗転移効果を発揮する分子標的治療薬である。一方、ビクニンは、本来羊水中において上記シグナル伝達の阻害を介して抗炎症活



性を発揮し感染に起因する早産を制御する生理的物質として認識されており¹⁾²⁾³⁾、早産予防の治療薬として、広く活用されている。我々はビクニンの抗炎症活性についても研究を続行しているが、臨床上、ビクニンの最大の欠点は、分子量4万の糖蛋白であるため静脈内投与しなければならないことである。将来、内服可能なビクニン低分子薬を開発し臨床の場で使用できるようになれば、予後不良な進行卵巣がん患者の予後改善のみならず、服薬コンプライアンスや患者QOLの向上に大いに寄与すると考えられた。

2. 研究の目的

分子標的治療薬の登場が、がんに対する治療の変革をもたらした。我々はすでにヒト羊水から副作用のない分子標的抗腫瘍薬（国際的にビクニンと命名されたがん転移抑制薬）を開発し、進行卵巣がん患者による臨床治験の結果、5年生存率の改善をみた。今回、患者のQOL向上をめざして、長期間の経静脈投与を回避するための、内服治療が可能なビクニン作用を模倣する低分子薬の開発を実現するために、抗腫瘍効果をもたらす大豆ビクニンの作用を基礎的、前臨床的に評価し、コンピュータ分子シミュレーションを駆使し、ビクニン作用を模倣する低分子物質の開発を行う。

3. 研究の方法

抗転移活性を有する分子標的抗腫瘍薬であるビクニンの活性基を修飾し、内服可能な低分子薬開発に向けて、以下の2つの実験を行った。大豆成分から精製したビク

ニンの生理活性を解明する。大豆ピクニンを模倣する低分子物質を探索し、設計・試作する。

(1)ピクニン作用を模倣しシグナル伝達を阻止する内服可能な天然物質の探索・開発

大豆灰抽出物成分(大豆ホエー)から大豆ピクニンの精製

大豆蛋白を精製するときに廃棄されていた分画(大豆ホエー)にピクニンが含まれ、内服可能であることを過去に報告した³⁾。不二製油株式会社から提供された粗抽出物から大豆ピクニンの大量精製を行う。大豆ピクニンは生化学的手法(イオン交換および分子ふるい)で精製可能であるため、大量に安価に精製することが可能である。今回の基礎実験及び動物実験の目的のために100gの精製大豆ピクニンを作成した。

大豆ピクニンによる細胞内シグナル伝達制御

ヒト卵巣癌培養細胞HRAに精製大豆ピクニン(2 μ M)を添加したときの細胞内シグナル蛋白(Src, MEK, ERK, JNK, p38, PI3K, Akt)のリン酸化をウエスタンブロットで測定し、どのシグナル経路が大豆ピクニンによって遮断されるか確認する。同時に蛋白質アレイ・マイクロアレイ実験を行い、大豆ピクニン刺激による促進・制御遺伝子を同定する。この実験結果を以前実施したピクニンの結果⁴⁾と比較検討する。さらに、細胞内シグナル伝達におけるSrcリン酸化を蛍光顕微鏡で可視化し、大豆ピクニンによる制御効果を定量した。

大豆ピクニン遺伝子導入培養癌細胞の作成

大豆ピクニン遺伝子をHRAに導入し癌細胞の表現系および細胞内シグナル伝達系を上記2)と同様の手法で評価する。大豆ピクニンによる制御効果を蛍光顕微鏡で可視化し定量した。

大豆ピクニン皮下注射による癌転移抑制の実証実験

ヌードマウスに移植したヒト卵巣癌細胞HRAを用いて大豆ピクニンを皮下注射(一匹あたり0.5mg腹腔内投与)したときの癌性腹膜炎抑制効果を検討する。腫瘍重量と生存期間の比較を行った。

大豆ピクニンと抗癌剤の組み合わせによる癌転移抑制評価

大豆ピクニンの癌転移抑制効果のみな

らず、抗癌作用を検討する。各群7匹の担癌マウス(ヒト卵巣癌を用いた癌性腹膜炎モデル)に対して、大豆ピクニン投与群(一匹あたり0.5mg腹腔内投与)、シスプラチン抗癌剤投与群、両者同時併用によりその効果が増強されるかどうか検討した。

大豆ピクニン内服による癌転移抑制効果の確認

ヒト卵巣癌、大腸癌、肺癌、乳癌細胞を移植した担癌ヌードマウスに大豆ピクニンを内服させ(標準餌に乾燥重量1%, 2%, 5% w/wとなるように大豆ピクニンを添加する)、癌転移抑制効果を発揮する必要投与量を算出した。

大豆ピクニン内服と抗癌剤併用による癌転移抑制効果の確認

ヒト卵巣癌、大腸癌、肺癌、乳癌細胞を移植した担癌ヌードマウスに上記6)で決定した濃度の大豆ピクニンを内服させ、同時に抗癌剤としてタキソールあるいはプラチナを投与することにより、癌転移抑制増強効果および副作用を検討した。

(2)大豆ピクニン作用を模倣する低分子化合物開発のためのインシリコ(in silico)スクリーニング

蛋白質の立体構造に基づく医薬分子設計では、コンピュータ上で標的蛋白質のモデリングや様々な化合物のドッキング(結合)をすることが多く、分子シミュレーションが重要な技術の一つとなっている。ピクニンの受容体結合反応性の基本原理解明のために、分子軌道法による電子状態解析を実施する。多数の化合物の構造情報が登録されたデータベースに対して、これを繰り返し適用ののち、ピクニン受容体に結合する化合物間での順位付けを行い、過去の科研費(平成19年度科研費 基盤研究C)で決定した活性の見込まれる20個のヒット化合物をさらにスクリーニングし、ピクニン受容体に最も親和性の高いピクニン低分子物質を選択し、数種類のリード物質を設計・試作した。

4. 研究成果

本研究において担癌マウスに対して大豆ピクニンの内服投与によるがん転移抑制効果が明らかとなった。また、大豆ピクニン作用を模倣する低分子化合物開発のための分子シミュレーション(インシリコスクリーニング)によって、ピクニン受容体に最も親和性の高いピクニン低分子物質を選択し、数種類のリード物質の設計および試作を行った。現在、活性の見込まれる20個のヒット化合

物の中から、低分子化合物を再合成し、in vitro 及び in vivo 実験を行っているところである。本研究の成果により、長期間の経静脈投与を回避することができる内服可能なビクニン低分子化合物の開発が実現されれば、進行卵巣がん患者の予後の改善だけでなく、服用コンプライアンスや患者 QOL の向上を可能にするために、多いに寄与できると考える。

引用文献

- 1) Shigetomi H, Kobayashi H, et al. Anti-inflammatory actions of serine protease inhibitors containing the Kunitz domain. *Inflamm Res*. 2010 Sep;59 (9):679-87.
- 2) Kanayama S, Kobayashi H, et al. Molecular structure and function analysis of bikunin on down-regulation of tumor necrosis factor-alpha expression in activated neutrophils. *Cytokine*. 2008; 42(2): 191-7
- 3) Kanayama S, Kobayashi H, et al. Bikunin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines induced by lipopoly-saccharide in neutrophils. *J Endotoxin Res*. 2007; 13(6): 369-76.
- 4) Kajihara H, Kobayashi H, et al. Clear cell carcinoma of the ovary: potential pathogenic mechanisms. *Oncol Rep*. 2010 May;23(5):1193-203

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)

Sequential screening to predict symptomatic pulmonary thromboembolism after gynecologic surgery in Nara, Japan. Haruta S, Kawaguchi R, Hirai T, Kobayashi H. 査読有 *Int J Gynaecol Obstet*. 2016 Jan;132(1):42-5. DOI: 10.1016/j.ijgo.2015.06.048.

Addition of aprepitant to standard therapy for prevention of nausea and vomiting among patients with cervical cancer undergoing concurrent chemoradiotherapy. Kawaguchi R, Tanase Y, Haruta S, Yoshida S, Furukawa N, Kobayashi H. 査読有 *Int J Gynaecol Obstet*. 2015 Dec;131(3):312-3. DOI: 10.1016/j.ijgo.2015.05.030.

〔学会発表〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春田 祥治 (HARUTA Shoji)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：30448766

(2) 研究分担者

小林 浩 (KOBAYASHI Hiroshi)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40178330

大井 豪一 (OI Hidekazu)
近畿大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：10283368

川口 龍二 (KAWAGUCHI Ryuji)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：50382289

伊東 史学 (ITO Fuminori)
奈良県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20553241