

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26242074

研究課題名(和文)腫瘍内細胞の特異的表現型変化に着目した新規分子標的抗がん剤の創製

研究課題名(英文)Creation of novel molecular-targeted anticancer drugs focused on specific phenotypic changes of cells in tumor

研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI, Motomasa)

大阪大学・薬学研究科・招へい教授

研究者番号：40116033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍内微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化に着目して、これらを制御可能な海洋天然物を探索した。そして、7個の新規化合物を含む10個の活性天然物を見出した。また、見出した活性天然物の全合成、アナログ化合物合成による構造活性相関、in vivoでの薬効評価を実施した。さらに、新規創薬標的の開拓を目的に、活性天然物の作用機序や標的分子解析を行い、5個の化合物の作用機序または標的分子を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on metabolic or phenotypic changes of cells in tumor microenvironments and searched for marine natural products capable of regulating them. Then, 10 bioactive natural products including 7 novel compounds were discovered. In addition, total synthesis of isolated bioactive natural products, study of structure-activity relationship by synthesized analog compounds, and evaluation of in vivo efficacy were carried out. Furthermore, for the purpose of exploring new drug targets, we analyzed the action-mechanisms and target molecule of bioactive natural products. As a result, the action-mechanism or target molecule of 5 compounds were clarified.

研究分野：天然物化学

キーワード：抗がん剤 がん微小環境 標的分子 海洋生物 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

がんに関する生物学および生化学的研究から、腫瘍内の微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化が、腫瘍の増大や転移といったがんの病態の悪化に大きく寄与していることは知られていた。しかし、このような腫瘍内の細胞の代謝や表現型変化を制御可能な天然物はほとんど知られておらず、さらに、活性天然物の作用機序解析や標的分子解析を通して、がんに対する新たな創薬標的を開拓する試みはほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍内の微小環境における細胞の代謝変化や表現型変化のうち、「がん細胞の低酸素環境適応」、「がん細胞の低栄養環境適応」、「がん血管新生」、「上皮間葉転換」に着目して、これらの現象を制御可能な海洋天然物を独自に保有する底生海洋生物の抽出物および海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーから探索する。またこのような生物活性を有する海洋天然物を医薬シーズとして展開して行くことを目的として、全合成・アナログ化合物合成による構造活性相関研究、*in vivo*での薬効評価を実施する。さらに見出した活性天然物の作用機序や標的分子解析を通して、がんに対する新規創薬標的を開拓する。

3. 研究の方法

活性天然物の探索には、以下の4つの評価系を用い、探索源を独自に保有する底生海洋生物の抽出物および海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーとして、活性試験の結果を指標にした分画精製により、目的とする活性を示す化合物を探索した。

低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

ヒト前立腺がん細胞 DU145 を1%の低酸素条件下で培養することにより低酸素環境に適応させ、通常培養条件と比較して、低酸素培養条件選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

炭素源であるグルコースを除去した培地での培養を低栄養環境のモデルとして、ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 を低栄養環境に適応させた後、被験サンプルの増殖阻害活性を測定した。また、通常培養条件と比較して、グルコース飢餓条件選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

がん血管新生（正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC 選択的な増殖阻害物質の探索）

本スクリーニングでは、がん血管新生の全ての過程に関与している血管内皮細胞に着目して、がん細胞（ヒト咽頭上皮がん細胞

KB3-1）の増殖には影響を与えず、HUVEC 選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

がん細胞の上皮間葉転換を阻害する化合物の探索

本スクリーニングでは、PANC-1 細胞をサイトカイン TGF- β で刺激することにより上皮間葉転換を惹起し、顕鏡下での細胞の形態変化を指標に、これを阻害する化合物を探索した。

一方、これらの探索研究から見出した活性天然物の標的分子解析は、構造活性相関研究の結果を基に化合物のプロープ分子化を行い、細胞破砕物またはペプチド提示型ファージライブラリーを使用して、結合タンパク質を解析・同定した。

4. 研究成果

(1) 低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質に関する研究

Furospinosulin-1 に関する研究

これまでの研究から furospinosulin-1 の標的分子は、転写制御因子である p54^{nrB} および LEDGF/p75 であることを明らかにしていた。本研究では、p54^{nrB} と LEDGF/p75 の創薬標的としての有用性を検証することを目的として、各分子または両分子の発現を安定に抑制した DU145 細胞を作成し、その *in vitro* および *in vivo* での増殖を調べた。その結果、作成したいずれの細胞株も、*in vitro* において低酸素培養条件選択的な増殖阻害を受けた。また、各細胞株をマウスに移植し、腫瘍の増大を経時的に観察したところ、野生型の DU145 と比較して、p54^{nrB} の発現抑制株および LEDGF/p75 の発現抑制株の腫瘍増大は抑制傾向が観察され、両分子の発現抑制株は有意な腫瘍増大の抑制が確認された。

さらに、p54^{nrB} および LEDGF/p75 を標的とする新たな化合物創出を目的として、新規評価系の構築を行った。すなわち、各分子を高発現する安定形質転換細胞（DU145）を作成し、野生型 DU145 細胞には細胞死が誘導され、形質転換細胞では耐性を示すことを指標とする評価系を構築した。

Dictyoceratin-C に関する研究

これまでの研究から dictyoceratin-C は、がん細胞の低酸素適応に関わる転写因子 HIF-1 α の発現量を低下させることを明らかにしていた。本研究では、HIF-1 α の発現量低下をもたらす dictyoceratin-C の結合タンパク質同定を試みた。まず、合成アナログ化合物を用いた構造活性相関の知見を基に dictyoceratin-C のプロープ分子を作成し、低酸素培養条件選択的な活性を保持するプロープ分子の創出に成功した（図 1）。

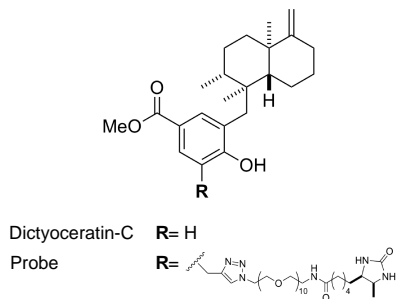


図1 Dictyoceratin-Cおよびプローブ分子の化学構造

そこで次に、本プローブ分子を利用して、ペプチド提示型ファージライブラリーから dictyoceratin-C の結合タンパク質同定を行った。そして、種々検討した結果、dictyoceratin-C の結合タンパク質が RNA polymerase II associated protein 3 (RPAP3) であることを強く示唆する知見が得られ、さらに、siRNA で RPAP3 の発現を抑制した DU145 細胞の表現型変化を調べたところ、低酸素培養条件選択的な増殖阻害を受けること、ならびに HIF-1 α の発現量の減少が確認された。以上の結果から、dictyoceratin-C の結合タンパク質は RPAP3 であると結論づけた。

(2) グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質に関する研究。

探索研究

保有する底生海洋生物の抽出物および海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に探索研究を実施した。その結果、新規化合物として、アルキルピリジンアルカロイド *N*-methylniaphatyne A、ポリケチド biakamides A-D、セスキテルペンアルカロイド fasciospyrinadinone および fasciospyrinadinol を見出した。また、20-hydroxyhaterumadienone および polybrominated diphenyl ether 類が本活性を有することを新たに見出した(図2)。

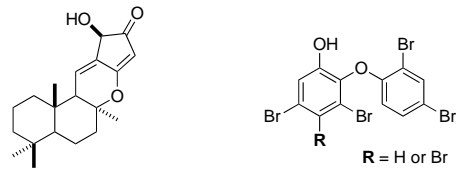
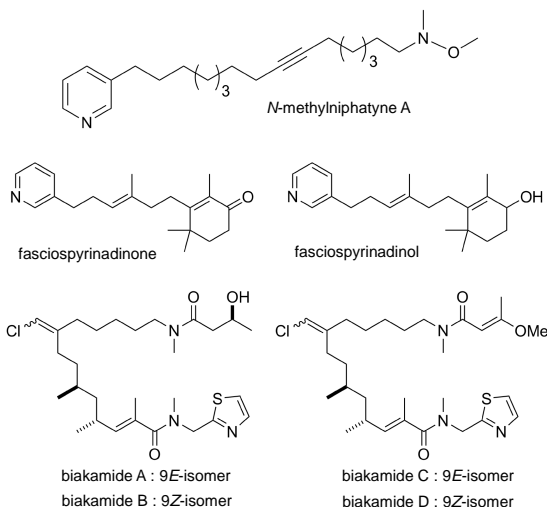


図2 グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質として見出した化合物の構造

さらに *N*-methylniaphatyne A, polybrominated diphenyl ether 類、biakamide 類については、以下の成果を得た。

N-Methylniaphatyne A に関する研究

N-Methylniaphatyne A については、全合成を達成するとともに、13 位または 17 位にアルキンを有するアナログ化合物を合成し、その活性評価を行った。その結果、天然物のグルコース飢餓条件における PANC-1 に対する IC₅₀ 値は 16 μ M であり、両アナログ化合物のそれも 8.8~18 μ M と顕著な差は認められなかった。またこれらの化合物はいずれも通常培養条件では、100 μ M まで細胞増殖阻害活性を示さなかった。以上のことから、*N*-methylniaphatyne A の活性発現には、アルキル鎖中のアルキンの位置は影響を与えないことが強く示唆された。現在、本化合物の標的分子解析を進めている。

Polybrominated diphenyl ether 類に関する研究

Polybrominated diphenyl ether 類については、その作用機序および標的分子解析を行った。まず、がん細胞の低栄養環境適応の際に上昇するリン酸化 Akt と GRP78 に対する影響を調べた。その結果、polybrominated diphenyl ether は、リン酸化 Akt 量、GRP78 の発現量ともに阻害することを明らかにした。また、この効果は、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害活性を示すことが報告されており、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害剤として知られている antimycin A でも見られる現象であることから、次に本化合物のミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する影響を調べた。その結果、polybrominated diphenyl ether は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II の活性を IC₅₀ 値 6.4 nM で阻害することを明らかにした。以上の結果から、polybrominated diphenyl ether 類は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II を標的として、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害活性を示すことが強く示唆された。

Biakamide 類に関する研究

1) Biakamide 類の構造決定と全合成
 各種 NMR スペクトルの詳細な解析の結果、biakamide 類はチアゾール環やピニルクロリ

ド基、2ヶ所の3級アミドなどからなる特異な化学構造を有することが明らかになった。しかし、各種スペクトル解析からは4位および6位のメチル基の立体化学の決定が困難であったため、Corey-Seebach 反応を鍵とする全合成によって両メチル基の全立体異性体を合成し、各種スペクトルを天然物と比較解析した(図3)。その結果、biakamide 類の4位および6位の立体化学をそれぞれ(4*R*,6*S*)配置であると決定することに成功した(図2)。

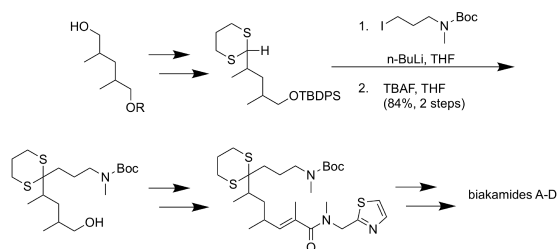


図3 Biakamide 類の全合成の概略

2) Biakamide 類の作用機序

Biakamide 類の作用機序についても、前述の polybrominated diphenyl ether 類と同様、まずリン酸化 Akt および GRP78 への影響を検討した。その結果、biakamide 類 (biakamide C) もリン酸化 Akt 量、GRP78 の発現量ともに阻害することが明らかとなった。また、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する影響を調べたところ、IC₅₀ 値 0.45 μM でミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I を阻害することが明らかとなった。現在、biakamide プローブを利用した化合物の細胞内局在、ならびにミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I 中の結合部位の解析を進めている。

(3) がん血管新生阻害物質に関する研究。

Cortistatin A に関する研究

Cortistatin A については、継続して、標的分子解析を目的としたプローブ分子合成と結合タンパク質の解析を実施した。すなわち、LC-MS での結合タンパク質同定において問題となる、ピーズに結合する非特異結合タンパク質を排除するため、光照射で切断可能なオルトニトロベンゼンユニットを導入した光開裂ピオチンタグを設計・合成した。また、標的分子を捕捉するジアジリン基を持つ cortistatin A analog を合成して、これらを利用して細胞破碎物から結合タンパク質を探索した(図4)。その結果、非特異タンパク質の排除に成功するとともに、3つの結合タンパク質候補を得ることに成功した。

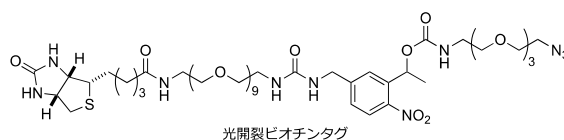
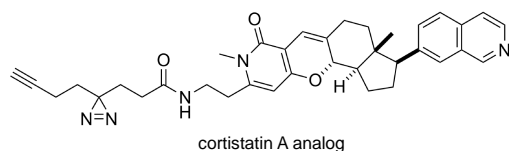


図4 Cortistatin A analog および光開裂ピオチンタグの構造

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 9 件)

N. Kotoku, A. Ito, S. Shibuya, K. Mizuno, A. Takeshima, M. Nogata, M. Kobayashi, Short-step synthesis and structure-activity relationship of cortistatin A analogs. *Tetrahedron* (2017) 73, 1342-1349. DOI: doi.org/10.1016/j.tet.2017.01.042. 査読有

N. Kotoku, R. Ishida, H. Matsumoto, M. Arai, K. Toda, A. Setiawan, O. Muraoka, M. Kobayashi, Biakamides A–D, unique polyketides from a marine sponge, act as selective growth inhibitors of tumor cells adapted to nutrient starvation. *J. Org. Chem.* (2017) 82, 1705-1718. DOI:10.1021/acs.joc.6b02948 査読有

M. Arai, D. Shin, K. Kamiya, R. Ishida, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, Marine spongean polybrominated diphenyl ethers, selective growth inhibitors against the cancer cells adapted to glucose starvation, inhibits mitochondrial complex II. *J. Nat. Med.* (2017) 71, 44-49. DOI: 10.1007/s11418-016-1025-x 査読有

M. Arai, K. Kamiya, D. Shin, H. Matsumoto, T. Hisa, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, N-Methylniphytyne A, a new 3-alkylpyridine alkaloid as an inhibitor of the cancer cells adapted to nutrient starvation, from an Indonesian marine sponge of *Xestospongia* sp. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 766-771. DOI: 10.1248/cpb.c16-00118 査読有

M. Arai, T. Kawachi, N. Kotoku, C. Nakata, H. Kamada, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, H. Endo, M. Inoue, H. Sato, M. Kobayashi, Furospinosulin-1, marine spongean furanosesterterpene, suppresses the growth of hypoxia-adapted cancer cells by binding to transcriptional regulators p54^{nrb} and LEDGF/p75. *ChemBioChem* (2016) 17, 181-189. DOI: 10.1002/cbic.201500519 査読有

M. Arai, Exploring New Drug Targets through the Identification of Target Molecules of Bioactive Natural Products. *Yakugaku Zasshi* (2016) 136, 669-676. DOI: 10.1248/yakushi.15-00281 査読有

N. Kotoku, M. Arai, M. Kobayashi, Search for anti-angiogenic substances from natural

sources. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 128-134. DOI: 10.1248/cpb.c15-00744 査読有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, Structure-activity relationship and in vivo anti-tumor evaluations of dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Mar Drugs* (2015) 13, 7419-7432. DOI: 10.3390/md13127074 査読有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, Y. Sumii, M. Arai, M. Kobayashi, Enantioselective synthesis of dictyoceratin-A (smenospondiol) and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Bioorg. Med. Chem.* (2015) 23, 966-975. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.021 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

石田良典, 新規海洋天然物 biakamide 類の栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性とその作用メカニズム, 第 21 回日本がん分子治療学会学術集会, 2017 年

荒井雅吉, 海洋天然物の魅力と創薬研究への応用, 第 40 回新適塾「未来創薬への誘い」, 2017 年

松本紘和, 低栄養選択的がん細胞増殖阻害物質 *N*-methyliniphatyne A の全合成, 第 66 回日本薬学会近畿支部大会, 2016 年

古徳直之, 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 dictyoceratin 類の標的分子解析, 第 58 回天然有機化合物討論会, 2016 年

古徳直之, 海綿由来プロモフェノール類のグルコース飢餓環境選択的増殖阻害活性と作用メカニズム解析, 日本薬学会第 137 年会, 2016 年

荒井雅吉, 活性天然物で切拓く新規薬剤標的分子, 第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2016 年

Masayoshi Arai, Exploring new drug target based on chemical biology of marine natural products, The 8th US-Japan Symposium on Marine Natural Products, 2016 年

河内崇志, 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 dictyoceratin-C の標的分子解析, 第 19 回日本がん分子治療学会学術集会, 2015 年

申多英, 栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害物質の探索, 日本生薬学会第 62 年会, 2015 年

Naoyuki Kotoku, Synthetic study and target analysis of dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge, PACIFICEM2015, 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

荒井雅吉, 小林資正. 化学同人, アルカロイドの科学, 2017 年, 534 頁 (81-97 頁)

〔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.phs.osaka-u.ac.jp/index.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 資正 (KOBAYASHI, Motomasa)
大阪大学大学院・薬学研究科・招へい教授
研究者番号 : 40116033

(2) 研究分担者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)
大阪大学大学院・薬学研究科・特任教授(常勤)
研究者番号 : 80311231

古徳 直之 (KOTOKU, Naoyuki)
立命館大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 20362618

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()