

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463006

研究課題名(和文) 海洋生物由来新規生理活性物質の探索とヒトiPS細胞を用いた創薬応用への基礎的研究

研究課題名(英文) Purification, structure characterization of bioactive substances from marine organisms and application them to novel anti-oral cancer drugs with iPS cell research technique

研究代表者

吉岡 幸男 (Yukio, YOSHIOKA)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：20335665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現行の抗癌剤の中には自然界の生理活性物質由来の薬剤も少なくない。地球上の大半を占める海洋をすみかとする海洋生物は、地上の生物とは異なった代謝システムや生理機能を有しているため、新規の生理活性物質を産生している可能性が高い。我々は日本近海に生息する海洋生物より生理活性物質を精製・同定し、新規医薬品開発を目指した基礎的研究を行っている。日本近海やインドネシア近海で採取した海洋生物由来生理活性物質を、無血清培養系での扁平上皮癌細胞の増殖抑制活性を指標に精製を進めた。ヒトiPS細胞を無血清培養下で重要臓器細胞に分化させ、新規生理活性物質の薬剤としての毒性を検討することを予定した。

研究成果の概要(英文)：Marine organisms have some different systems of metabolism and physiological functions from the living thing on the ground. We extract the bioactive substances from them and isolate the substances with the strong antitumor activity for the index of the cytotoxicity against cancer cells. We aim not only to analyze the antitumor effect for oral squamous cell carcinoma cells but also apply them to the novel antitumor agents against oral cancer. Marine organisms from both adjacent Japanese sea and adjacent Indonesian sea are collected and freeze-dried. The extracted compounds are investigated their activity by cytotoxic assay for cancer cells and are purified. The novel bioactive substances are investigated with the toxicity for the human iPS cells which are differentiated into some important organic cells under the serum free culture.

研究分野：口腔外科学

キーワード：海洋生物 細胞毒性 抗腫瘍効果 扁平上皮癌細胞 無血清培養 ヒトiPS細胞 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

現在も固形癌の根治的治療の中心をなすのは外科療法であり、切除可能ながんに対しては積極的に外科療法がおこなわれている。しかし術前術後の補助療法に加え、原発巣の伸展症例や遠隔転移を有する症例に対しては、放射線および化学療法により症状緩和や延命を期待した治療がおこなわれているのが現状である。特に口腔癌は術後の機能障害や審美障害などが顕著なため、過度な外科療法は患者のQuality Of Life(QOL)を大きく損ねる結果となることから、代替治療としての放射線や化学療法、および免疫療法のもつ意義は大きい。

従来の抗がん剤の中には自然界に生息する天然物由来の薬剤も多い。例えばピンカアルカロイド系抗がん剤は、植物より抽出した強力な毒性成分を応用し抗がん剤として利用した薬剤で、肺がんや乳がんなどの固形癌をはじめ、血液がんにも多く用いられている。その作用機序からトポイソメラーゼ阻害剤と微小管阻害剤に分類されるが、特にタキサン系の抗がん剤は口腔がんをはじめとする頭頸部がんの術前化学療法の標準治療薬である。またシタラピンは1959年に海綿類より抽出、精製された抗がん剤で急性骨髄性白血病などの血液がんや多くの固形癌の治療に用いられてきた。このように毒性を十分に備えた(活性の高い)、殺細胞性抗がん剤の中には自然界由来、特に海洋生物由来のものも多い。海洋生物由来生理活性物質を探索し、新規の抗腫瘍薬の開発を行うことを背景とした基礎的研究を行う。

## 2. 研究の目的

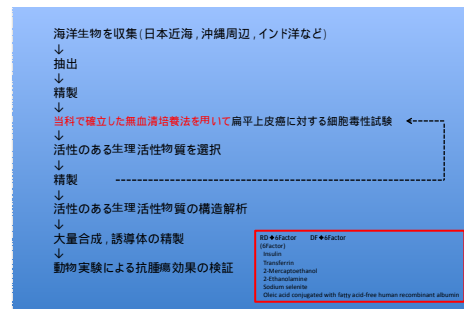
地球上の大半を占める海洋をすみかとする海洋生物は地上の生物と異なった代謝システムや生理機能を有する。これまで我々は海洋生物由来生理活性物質のがん細胞に対する増殖抑制効果を指標に活性の高い物質を精製し、口腔がんに対する新規抗がん剤への応用を目指してきた。(名古屋大学 小鹿研究室との共同研究)しかし、この生理活性物質を新規抗がん剤の候補として創薬へ応用するには抗腫瘍効果の検討だけでなくヒトに対する薬効試験や安全性薬理試験などの創薬スクリーニングを必要とする。海洋生物由来の生理活性物質の探索、より活性の高い物質の同定、口腔扁平上皮癌に対する抗腫瘍効果の検討および動物実験を継続するとともに、ヒト iPS 細胞(人工多能性幹細胞)を用いた創薬スクリーニングを行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

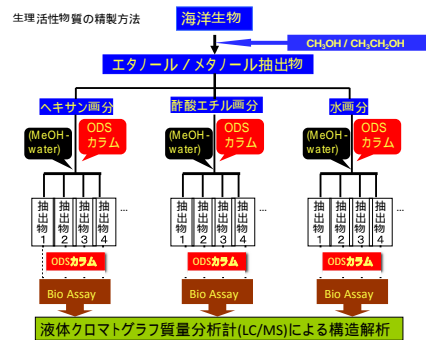
日本近海の海洋生物から生理活性物質

を抽出し扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性を指標に活性のある物質の精製を進める。活性のある物質は LC/MS を用いて構造解析をおこない既知の物質か新規の物質であるかを同定する。新規物質であれば無血清培養下にて抗腫瘍効果のメカニズムを解析すると共に大量合成を行い、ヌードマウスを用いた動物実験にて抗腫瘍効果を検証する。

### 研究方法



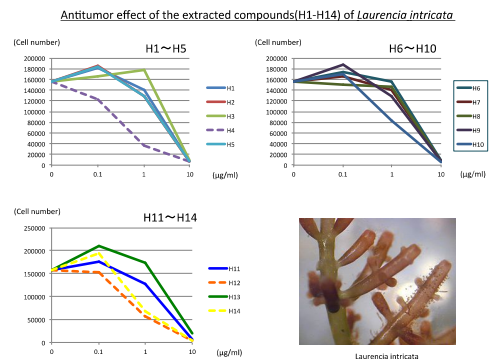
### 生理活性物質の精製方法



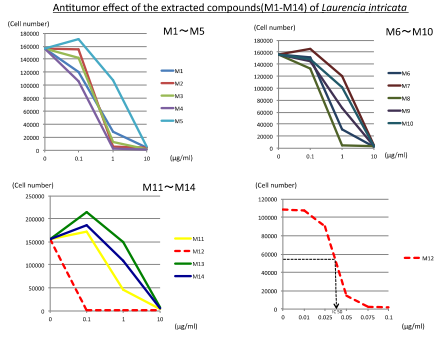
iPS 細胞を用いて新規生理活性物質の薬剤としての重要臓器細胞に対する毒性を検討する。

## 4. 研究成果

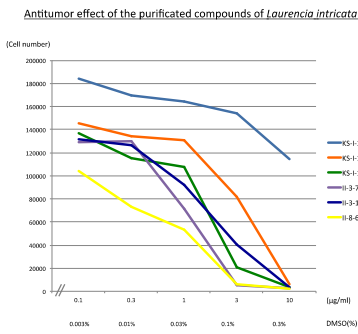
①



2

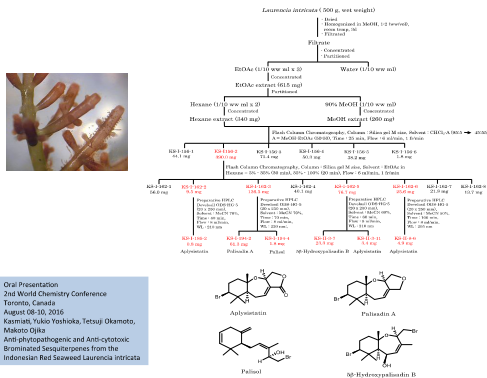


3

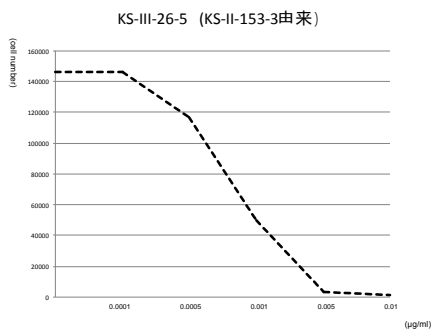


4

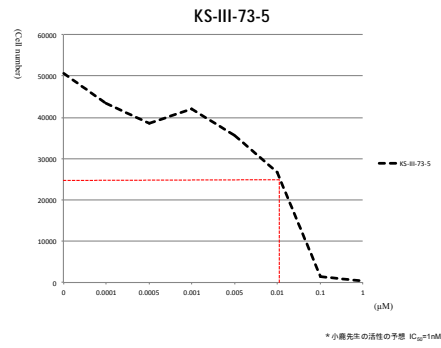
Purification structure characterization process of bioactive substances from *Laurencia intricata*



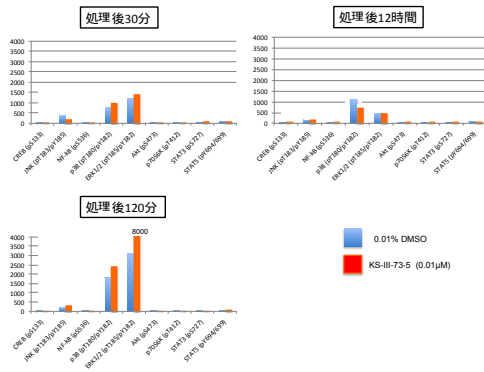
5



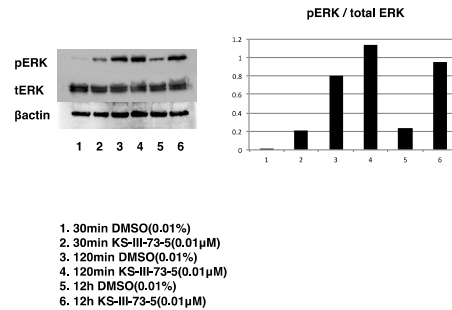
6



8



9



インドネシア近海で採取した海洋生物で紅藻ソゾ属の一種 *Laurencia Intricata* をエタノール・メタノール溶液にて抽出し、水画分、酢酸エチル画分、ヘキサン画分に分配し、それぞれの画分を再度、逆相カラムで抽出し、28種類の粗雑なサンプルを得た。これら抽出物(H1~H14, M1~M14)の扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性試験を当教室で確立した無血清培養法を用いて行った (図①, ②)。DMSOに溶解したサンプルを最終濃度が 10, 1, 0.1 µg/ml となるように培地に添加しアッセイを行った。その結果, H4, H12, H14, M12の活性が高く、特に M12は低濃度で殺細胞効果が高く、その  $IC_{50}$  は 0.03 µg/ml であった (図②)。この抽出物をさらに精製し KS-I-185-2, KS-I-194-2,

KS-I-194-4, KS-II-3-7, KS-II-3-11, KS-II-8-6 を得た (図③) . LC/MSにてその構造解析を行った結果, Aplystatin, Palisadin A, Palisol, 5-beta-Hydroxypalisadin B が同定されたが, すべて既知の化合物であった (図④) . これらは比較的良く知られた brominated sesquiterpens (臭化セスキテルペン群) であり, 扁平上皮癌細胞に対する細胞毒性試験の結果, その IC<sub>50</sub> は 0.15, 1, 0.59, 0.45 μg/ml であった . 同様に分離した KS-III-26-5 は IC<sub>50</sub> が 0.8ng/ml と今までの抽出物の中で最も強力な細胞毒性を示した (図⑤) . 構造解析の結果, crambescidin 657 という既知化合物ではあったが, 精製を進め純粋化合物を得た (KS-III-73-5) . KS-III-73-5 の扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行った結果, その IC<sub>50</sub> は 0.001 μg/ml であった (図⑥) . この濃度で処理を行ったところ, 細胞の形状は spindle に変化し, 空胞変性が観察された (図⑦容量オーバーのため省略) . Bio-Plexにてシグナル解析を行ったところ, 処理 120 分で ERK1/2 および p38MAPK のシグナル伝達が関与することが明らかとなった (図⑧) . ウェスタンブロット法にてリン酸化タンパクの解析を行ったところ, 処理 120 分で基剤である DMSO に比較して ERK1/2 のリン酸化が亢進していることが明らかとなった (図⑨) . この化合物の扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果のメカニズムを引き続き検討している .

## 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 4 件 )

- 1 . Toratani S, Tani R, Kanda T, Koizumi K, Yoshioka Y, Okamoto T. : Photodynamic therapy using Photofrin and excimer dye laser treatment for superficial oral squamous cell carcinomas with long-term follow up. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016 Jun;4:104-10. ( 査読あり )
- 2 . Y. Yoshioka, S. Toratani, H. Nakatao, K. Koizumi, Y. Hayashido, T. Okamoto. : Weekly paclitaxel plus cetuximab reduces the lung metastasis of adenoid cystic carcinoma arising from the salivary gland. Oral Science International. 12(2) 67-71, 2015. ( 査読あり )

- 3 . 虎谷茂昭, 鍋島 巧, 角 健作, 神田拓, 小泉浩一, 吉岡幸男, 谷 亮治, 笹原妃佐子, 岡本哲治. : 早期舌癌における FDG-PET(18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography) の原発 SUVmax(maximum standardized uptake value) を用いた頸部リンパ節転移予測. 広島大学歯学雑誌 46 巻 1 号 P36-41 (2014.6) ( 査読なし )

- 4 . Kuo, Ting-Fang; Mao, Di; Hirata, Nao; Khambu, Bilon; Kimura, Yasuhisa; Kawase, Eihachiro; Shimogawa, Hiroki; Ojika, Makoto; Nakatsuji, Norio; Ueda, Kazumitsu; Uesugi, Motonari, Selective Elimination of Human Pluripotent Stem Cells by a Marine Natural Product Derivative, *J. Am. Chem. Soc.* 136(28), 9798-9801 (2014). ( 査読あり )

- 5 . S. Yamasaki, Y. Taguchi, A. Shimamoto, H. Mukasa, H. Tahara, T. Okamoto. Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- $\beta$ 1 regulation of pluripotency. PlosONE, Published.: January 29, DOI: 10.1371/journal.pone.0087151, 2014. ( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )  
( 口演 )

- 1 . 海洋生物由来生理活性物質の探索研究 吉岡幸男<sup>1)</sup>, 小鹿一<sup>2)</sup>, 岡本哲治<sup>1)</sup>
  - 1) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 分子口腔医学 顎・顔面外科学
  - 2) 名古屋大学大学院生命農学研究科 第70回NPO法人 日本口腔科学会学術集会 平成28年4月15日~18日 福岡市 福岡国際会議場 (ポスター発表)
- 2 . Purification, structure characterization of bioactive substances from marine organisms and application them to novel anti-oral cancer

drugs

Yukio YOSHIOKA\*, Makoto OJIKA\*\*, Tetsuji OKAMOTO\*

\*Department of Molecular Oral Medicine and Maxillofacial Surgery, Applied Life Sciences, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

\*\* Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

14<sup>th</sup> International Meeting for Cellular Endocrinology

2016.11.13 Hiroshima City

3 . Anti-phytopathogenic and Anti-cytotoxic Brominated Sesquiterpenes from the Indonesian Red Seaweed *Laurencia intricata*

Kasmiati,<sup>1</sup> Yukio Yoshioka,<sup>2</sup> Tetsuji Okamoto,<sup>2</sup> Makoto Ojika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University,

<sup>2</sup>Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Minami-ku,

2nd World Chemistry Conference

Toronto, Canada

August 08-10, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉岡 幸男 (Yoshioka yukio)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号 : 20335665

### (2)研究分担者

岡本 哲治 (Okamoto tetsuji)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号 : 00169153

小鹿 一 (Ojika makoto)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号 : 50152492

山崎 佐知子(Yamasaki Sachiko)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 00632001