

令和元年6月17日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01811

研究課題名(和文) がん特異的代謝機構に基づいた抗腫瘍薬の開発と応用

研究課題名(英文) Development of drugs targeting cancer metabolism

研究代表者

百瀬 功 (MOMOSE, Isao)

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・主席研究員

研究者番号：10270547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は固形腫瘍の内部に見られるがんの特異的な低栄養環境において、がん治療の標的となる代謝機構の阻害剤を開発し、それを抗腫瘍薬として応用することを目的とする。申請者らはカビの生産するPenicillic acidおよびPapyracillic acidがヒト膀胱がん細胞に対して低栄養選択的な細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。本化合物は細胞内のグルタチオンを低下させ、活性酸素種の上昇を介して細胞増殖を抑制した。また低栄養環境ではグルタチオンが低いことから、Penicillic acidおよびPapyracillic acidは強い細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、申請者らは固形腫瘍内部のような低栄養環境でカビの二次代謝産物がグルタチオンを減少させることにより細胞増殖を抑制することを発見した。レドックス制御システムの1つであるグルタチオンを低分子化合物でコントロールして抗がん剤として応用しようという研究は、大変にユニークな新たな試みとして学術的意義がある。

新しい抗がん剤としてがん免疫治療薬やキナーゼ阻害剤が盛んに開発されているが、既存薬剤とは作用機序の異なる薬剤の開発が望まれており、本研究はそのようなニーズを満たすことができる研究であり、社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Certain cancer cells can survive for prolonged periods of time in nutrient-deprived conditions such as the interior of a tumor. We found that penicillic acid and papyracillic acid produced by fungi display preferential cytotoxicity to human cancer cells in nutrient-deprived conditions compared with those in nutrient-sufficient conditions. Penicillic acid and papyracillic acid significantly reduced glutathione, a major cellular antioxidant, and increased reactive oxygen species, which may be the cause of cell death. Nutrient deprivation causes low basal glutathione levels in cancer cells, leading to increased susceptibility to penicillic acid and papyracillic acid. Our results suggest that targeting the redox system, such as glutathione, is an attractive therapeutic strategy in the tumor microenvironments, including nutrient deprivation.

研究分野：天然物化学

キーワード：がん 代謝 微生物 二次代謝産物 グルタチオン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

細胞が生存するための三大栄養源はグルコース、アミノ酸、脂肪である。がん細胞が正常細胞と比べてグルコースの消費が高いことは「Warburg 効果」として知られていて、がん細胞は酸素が十分に存在しても解糖系を使って ATP を生産する好氣的解糖を盛んに行う。近年がん細胞が示す特徴的な代謝が次々と発見され、がん細胞は正常細胞と異なる代謝を利用していることが明らかとなってきた (Nat Rev Cancer, 13, 572, 2013)。また腫瘍内の血管の構造異常や機能異常は腫瘍内血流分布の不均衡性をもたらし、断続的あるいは持続的な酸素・栄養供給の低下を招く。実際に腫瘍内組織のグルコース濃度は非がん組織の数分の 1 から数十分の 1 に低下しており (Cancer Res. 69, 4918, 2009)、このような様々な原因により腫瘍内部は低グルコース状態にある。低グルコース環境においては小胞体ストレス応答の促進や AMPK の活性化など低グルコースに応答した適応反応も惹起される。したがってグルコースが欠乏した固形腫瘍内部環境下ではがん特異的な代謝反応や応答反応が進行しており、それらはがん治療薬開発のための新しい標的となり得る。

そこで申請者らは、供給するグルコースを制限することにより固形腫瘍内部を模倣したアッセイ系を構築し、微生物二次代謝産物や化合物ライブラリーより低グルコース環境に特異的な細胞増殖抑制物質を探索した。その結果、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の特異的阻害剤や IGF-1 受容体キナーゼ阻害剤、イオノフォアなどが低グルコース環境に選択的な細胞毒性を示すことを明らかにした (I. Momose, et al. JNP, 82, 1120-1127, 2019)。酸化的リン酸化阻害剤の解析から、好氣的解糖が盛んながん細胞においても低グルコース環境下では酸化的リン酸化による ATP 生産に依存しており、また IGF-1 受容体キナーゼ阻害剤の解析から低グルコース耐性に Akt のリン酸化が重要なことを明らかにした。

2. 研究の目的

申請者らは、上記に示すように固形腫瘍内部に見られる低グルコース環境においてがん細胞の増殖を抑制する化合物を探索することにより、がんの特異的な代謝機構に作用する化合物の探索研究を行ってきた。これまでは低グルコース環境に着目して研究を進めてきたが、一部の腫瘍においてはアミノ酸の減少も認められることから、グルコースおよびアミノ酸欠乏環境において特異的な増殖抑制作用を示す化合物を探索することにより、今までとは作用機序の異なる化合物を得る可能性がある。そこで本研究はこれまでの研究を発展させる形で、がん特異的な代謝機構を標的にした新しい抗腫瘍薬を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 低栄養特異的な細胞増殖抑制物質の探索：96 穴プレートにヒト膵がん PANC-1 細胞を播き、24 時間後にグルコース・アミノ酸欠乏培地（低栄養培地）もしくは DMEM 培地（栄養培地）に置換した。ここに微生物培養液を加え 24 時間培養後の生存率を、MTT アッセイ法にて測定した。活性物質の単離は、溶剤抽出法、シリカゲルクロマトグラフィーおよびセファデックス LH-20 ゲルろ過カラムクロマトグラフィー法により行った。得られた化合物は NMR スペクトルおよび LC-MS スペクトルの解析により同定した。Caspase-3/7 の活性は Caspase-Glo 3/7 アッセイ（プロメガ）、アポトーシス細胞はアネキシン V-FITC とヨウ化プロピジウムで二重染色後にフローサイトメーターを用いて検出した。

(2) Penicillic acid および Papyracillic acid の作用機序の解析：メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に委託した。グルタチオンは発光グルタチオンアッセイ（プロメガ）、活性酸素種は過酸化水素を H₂O₂ アッセイ（プロメガ）にて測定した。Penicillic acid および Papyracillic acid とグルタチオンの結合体は LC-MS にて検出し、N-アセチルシステインモノメチルと Penicillic acid の結合体は逆相 HPLC カラムにて単離し、NMR スペクトルおよび LC-MS スペクトルを詳細に解析することにより化学構造を決定した。

(3) Penicillic acid および Papyracillic acid の抗がん活性：低栄養選択的な細胞増殖抑制活性は、12 種類のヒト膵がん細胞（PANC-1、PK-45H、KP-4、BxPC-3、Capan-1、KP-3、PK-8、PK-59、PSN-1、KP-2、KLM-1、MIA Paca-2）にて測定した。スフェロイドは低接着プレートにて形成させ、スフェロイド内部の低酸素状況はハイポキシアプローブ LOX-1（MBL ライフサイエンス）を用いて観察した。コロニーファーメーションは、10 日間の培養の後にメチレンブルーで染色しコロニー数を計測した。

4. 研究成果

(1) 低栄養特異的な細胞増殖抑制物質の探索：ヒト膵がん PANC-1 細胞を用いて低グルコース・低アミノ酸の培養条件において選択的に細胞増殖を抑制する微生物培養液を探索したところ、目的の活性を有する 2 種類のカビ培養液を得ることができた。そこで、これらのカビを玄米培地で固体培養し、培養物からアセトン抽出した抽出液を、酢酸エチルによる溶媒抽出法、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーを用いて、目的化合物を単離・精製した。これらの化合物は高分解能 MS スペクトルの解析により化学式を C₇H₈O₃ および C₁₁H₁₄O₅ と決定し、詳細な NMR スペクトルの解析により Penicillic acid および Papyracillic

acidと同定した(図1)。これらの化合物はPANC-1細胞において富栄養環境よりも低栄養環境において強い細胞増殖抑制活性を示した(図2)。さらにPenicillic acidおよびPapyracillic acidは低栄養環境においてcaspase-3/7を活性化し、アポトーシスを誘導した。また多種のがん細胞に対する細胞増殖抑制活性を調べたところ、既存の抗がん剤とは異なる感受性パターンを示しユニークな作用機序を有する可能性が示唆された。

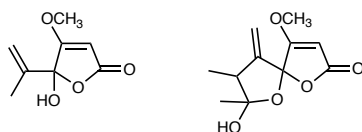


図1. Penicillic acid および papyracillic acid

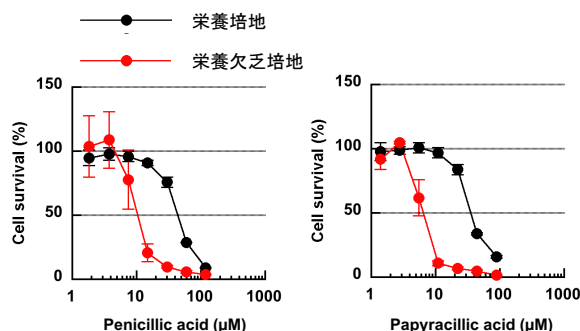


図2. Penicillic acid および papyracillic acid の栄養欠乏選択的細胞毒性

(2) Penicillic acid および Papyracillic acid の作用機序の解析: Penicillic acid および Papyracillic acid は異常有機酸に分類される低分子化合物であることから、細胞内の有機酸に関連した代謝経路に作用する可能性がある。そこで作用機序を明らかにするために、Penicillic acid が中心代謝経路に与える影響についてメタボローム解析を用いて調べた。Penicillic acid を PANC-1 細胞に作用させて、経時的に細胞内の代謝物を CE-TOFMS にて解析したところ、218 種の代謝物を同定することができた。それらの中から 110 種の主要代謝物について定量的に解析したところ、細胞内の主な抗酸化物質であるグルタチオンが顕著に減少することがわかった。そこで Penicillic acid および Papyracillic acid の薬剤濃度や処理時間の及ぼす影響について検討したところ、グルタチオンは Penicillic acid および Papyracillic acid により薬剤用量依存的かつ時間依存的に低下することがわかった。グルタチオンはグリシン、システイン、グルタミン酸より構成させるトリペプチドであり、システイン部分のチオール基を有している。一方で Penicillic acid や Papyracillic acid は α , β 不飽和カルボニル構造を持っていることから、グルタチオンのチオール基との間で結合体を形成する可能性がある。そこでリン酸バッファー中でグルタチオンと Penicillic acid および Papyracillic acid を混合させたところ、本化合物は非酵素的にグルタチオンと結合体を形成することが明らかとなった(図3)。さらに詳細な結合様式を調べるために、グルタチオンよりも単純なモデル化合物として *N*-アセチルシステインモノメチルを用いて、Penicillic acid と結合体を形成させた。この結合体は NMR および LC-MS スペクトルの解析により、*N*-アセチルシステインモノメチルのチオール基と Penicillic acid のエキソメチレン基の間で共有結合が形成されることを明らかとした。よって Penicillic acid および Papyracillic acid は、細胞内のグルタチオンと結合体を形成することにより、遊離の還元型グルタチオンを低下させることが明らかとなった。

次に低栄養環境とグルタチオンの関係について調べた。PANC-1 細胞を低栄養培地で培養すると、細胞内のグルタチオン濃度が急激に減少することが明らかとなった。ここに Penicillic acid または Papyracillic acid を作用させると、さらにグルタチオンの減少が促進されることがわかった。グルタチオンの減少は細胞内の抗酸化能の低下を導くことが知られている。そこで Penicillic acid および Papyracillic acid による活性酸素種 (ROS) の産生量に与える影響について調べたところ、Penicillic acid および Papyracillic acid は ROS の産生を亢進し、低栄養環境ではさらに大量の ROS を産生することを明らかとした。

したがって Penicillic acid および Papyracillic acid は、細胞内のグルタチオンを低下させることにより ROS の増加を導き、細胞死を誘導すると推定した。さらに低栄養状態では基底レベルのグルタチオン濃度が低下することから、ここに Penicillic acid および Papyracillic acid を作用させるとさらにグルタチオンが低下し ROS の産生が強く誘導されることが、低栄養選択的細胞増殖抑制の作用機序と推定した(図4)。

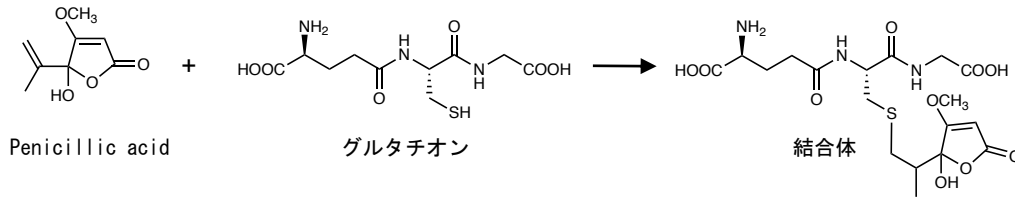


図3. Penicillic acid とグルタチオンの結合体

(3) Penicillic acid および Papyracillic acid の抗がん活性：これまでヒト膵がん PANC-1 細胞を用いて様々な検討を行ってきたが、さらに 11 種類のヒト膵がん細胞を用いて低栄養環境における細胞増殖抑制効果を調べた。Penicillic acid や Papyracillic acid は、いずれのヒト膵がん細胞においても低栄養環境において強い細胞増殖抑制活性を示した。次にスフェロイドコロニー内部は低酸素・低栄養状態に陥りやすいと報告されていることから、低栄養環境のモデルとしてスフェロイドを用いて Penicillic acid および Papyracillic acid による細胞増殖抑制効果について調べた。12 種類のヒト膵がん細胞を低接着プレートで培養することによりスフェロイドを形成させ、低酸素センシングプローブでスフェロイド内部が低酸素状態であることを確認した。スフェロイドは本化合物で 3 日間処理したところ、いずれの細胞のスフェロイドにおいても生存率の低下を示したが、二次元培養と比べて IC₅₀ 値は高くスフェロイド選択性は示さなかった。

Penicillic acid や Papyracillic acid はグルタチオンを低下させる作用があるので、その作用を利用してシスプラチンの抗がん活性の向上に応用した。すなわちプラチナ系抗がん剤であるシスプラチンはグルタチオンにより抗がん活性が低下することから、Penicillic acid や Papyracillic acid と併用することでグルタチオン濃度を低下させ、シスプラチンの抗がん活性を増強させようと考えた。そこでヒト膵がん PSN-1 細胞および PK-4 細胞を用いてシスプラチンとの併用効果をコロニーファーメーションアッセイにて調べたところ、Penicillic acid および Papyracillic acid はシスプラチンのコロニー形成抑制活性を顕著に増強できることを明らかにした。

以上により、本研究で見出されたカビの代謝物 Penicillic acid および Papyracillic acid は、がんの重要な代謝物であるグルタチオンを著しく低下させることにより、低栄養環境で選択的に細胞増殖を抑制するユニークな活性を有することを明らかとした。今後本研究をさらに発展させ、新しい抗がん剤の開発につなげていく予定である。

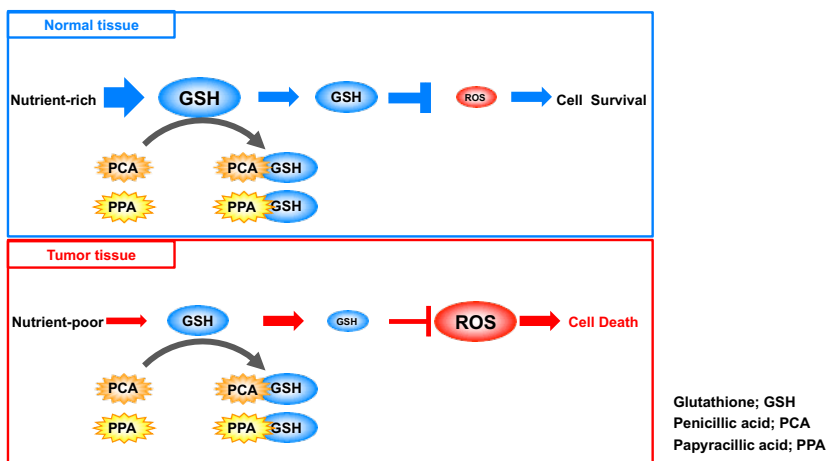


図4. Penicillic acid と Papyracillic acid の作用機序

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Leucinostatin Y: A Peptaibiotic Produced by the Entomoparasitic Fungus *Purpureocillium lilacinum* 40-H-28. I. Momose, T. Onodera, H. Doi, H. Adachi, M. Iijima, Y. Yamazaki, R. Sawa, Y. Kubota, M. Igarashi, M. Kawada. J. Nat. Prod., 査読有, 82, 1120-1127 (2019).
doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00839
2. Potential anticancer activity of auranofin. T. Onodera, I. Momose, M. Kawada. Chem. Pharm. Bull., 査読有, 67, 186-191 (2019).
doi: 10.1248/cpb.c18-00767

3. A guanine derivative as a new MEK inhibitor produced by *Streptomyces* sp. MK63-43F2. M. Iijima, Yuji Kubota, R. Sawa, Yumiko Kubota, M. Hatano, M. Igarashi, M. Kawada, I. Momose, M. Takekawa, M. Shibasaki. J Antibiot., 査読有, 71, 135-138 (2018). doi: 10.1038/ja.2017.100.
4. Tyropeptins, proteasome inhibitors produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Momose, T. Watanabe. J. Antibiot., 査読有, 70, 542-550 (2017). doi: 10.1038/ja.2017.9.
5. Acremopeptin, a new peptaibol from *Acremonium* sp. PF1450. M. Iijima, M. Amemiya, R. Sawa, Y. Kubota, T. Kunisada, I. Momose, M. Kawada, M. Shibasaki. J. Antibiot., 査読有, 70, 791-794 (2017). doi: 10.1038/ja.2017.15.
6. The therapeutic potential of microbial proteasome inhibitors. I. Momose, M. Kawada. Int. Immunopharmacol., 査読有, 37, 23-30 (2016). doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.013.
7. Biological activities of unique isoflavones prepared from *Apios americana* Medik. H. Kaneta, M. Koda, S. Saito, M. Imoto, M. Kawada, Y. Yamazaki, I. Momose, K. Shindo. Biosci. Biotechnol. Biochem., 査読有, 80, 774-8, (2016). doi: 10.1080/09168451.2015.1127132.
8. Coccoquinones A and B, new anthraquinone derivatives produced by *Staphylotrichum coccosporum* PF1460. D. Tatsuda, M. Amemiya, R. Sawa, K. Sumiyoshi, T. Watanabe, I. Momose, M. Kawada, A. Nomoto, M. Shibasaki. J. Antibiot., 査読有, 69, 176-178 (2016). doi: 10.1038/ja.2015.102.
9. Synthesis of Androprostamine A and Resormycin. H. Abe, Y. Yamazaki, C. Sakashita, I. Momose, T. Watanabe, M. Shibasaki. Chem. Pharm. Bull., 査読有, 64, 982-987 (2016). doi: 10.1248/cpb.c16-00207

[学会発表] (計 10 件)

1. I. Momose, T. Onodera, Y. Yamazaki, H. Adachi, M. Kawada. Inhibition of the redox system shows preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions. 第 11 回日米癌合同シンポジウム. 2019 年.
2. 小野寺威文、百瀬功、川田学. 栄養飢餓選択的細胞毒性を示す Auranofin の作用機序. 第 77 回日本癌学会. 2018 年.
3. 小野寺威文、百瀬功、川田学. 栄養飢餓選択的細胞毒性を示す Auranofin の作用機序. 第 22 回日本がん分子標的治療学会. 2018 年.
4. T. Onodera, I. Momose, M. Kawada. Auranofin, an Inhibitor of Thioredoxin Reductase, Exhibits Preferential Cytotoxicity Under Nutrient-deprived Conditions in Human Pancreatic Cancer Cells. 4th International Symposium for Medicinal Sciences. 2018 年.
5. T. Onodera, I. Momose, M. Kawada. Auranofin exhibits preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions. The 22nd Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy. 2017 年.
6. D. Tatsuda, I. Momose, T. Kunisada, T. Watanabe, M. Kawada, M. Shibasaki. Novel compounds suppressing p53-dependent growth of tumor cells. AACR-NCI-EORTC International Conference Molecular Targets and Cancer Therapeutics. 2017 年.
7. T. Onodera, I. Momose, S. Dan, M. Kawada. Auranofin exhibits preferential cytotoxicity under nutrient-deprived conditions in human pancreatic cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年.
8. I. Momose, H. Adachi, M. Kawada, M. Shibasaki. Papyracillic acid and penicillic acid show preferential cytotoxicity under nutrient-deprived conditions. 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年.
9. 百瀬功、安達勇光、川田学. Papyracillic acid および penicillic acid による栄養飢餓選択的細胞毒性. 第 20 回日本がん分子標的治療学会. 2016 年.
10. I. Momose, Y. Yamazaki, H. Adachi, K. Sumiyoshi, M. Kawada, M. Shibasaki. Papyracillic acid and penicillic acid show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions. 10th AACR-JCA Joint Conference. 2016.

[その他]

ホームページ

<https://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：増田徹

ローマ字氏名：MASUDA, Tohru

研究協力者氏名：飯島正富

ローマ字氏名：IIJIMA, Masatomi

研究協力者氏名：大庭俊一

ローマ字氏名：OHBA, Shun-ichi

研究協力者氏名：山崎洋子

ローマ字氏名：YAMAZAKI, Yohko

研究協力者氏名：立田大輔

ローマ字氏名：TATSUDA, Daisuke

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。