

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11838

研究課題名(和文) 口腔癌のドライバー候補遺伝子を標的とした海洋生物由来生理活性物質の探索と創薬研究

研究課題名(英文) Detection of bioactive substances from marine organisms targeting for candidates of driver mutation gene in oral cancer and applying them to drug design study

研究代表者

吉岡 幸男 (YOSHIOKA, Yukio)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：20335665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア近海で採取した紅藻とカイメンより精製した生理活性物質を解析した結果、紅藻から分離した物質は全て既知のbrominated sesquiterpeneでカイメンより精製した6種類の生理活性物質は全てグアニジンアルカロイドであった。Crambescidin 657のSCC細胞に対するIC50は32.85ng/ml (50nM)であった。50nM Crambescidin657で24時間処理した扁平上皮癌細胞A431のシグナルは胞周期に関する遺伝子群の発現が低下し、コレステロール合成酵素、炎症に関する遺伝子群の発現亢進がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドライバー遺伝子は、がんの発生・進展において直接、重要な役割を果たす癌遺伝子、癌抑制遺伝子であり、現在これらの変異を標的とした治療薬の開発がめざましい。口腔癌をはじめとした頭頸部癌においては、ドライバー遺伝子が同定されていないため、他がん種と比較して分子標的治療薬の開発とその臨床応用はかなり遅れている。口腔癌のドライバー遺伝子候補とその変異を同定し、それを標的とした分子標的治療薬を開発することは口腔癌治療戦略の上でかなり重要である。特に海洋生物由来の生理活性物質から新規抗癌剤創薬の過程でドライバー遺伝子候補を同定することは画期的である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed antitumor effect of bioactive substances purified from red seaweed (*Laurencia intricate*) and sponge (*Clathria bulbotoxa*) living at ocean near Indochina sea. We purified the bioactive substances on the basis of anti-proliferative activity at squamous cell carcinoma on serum free medium and identified the strongest bioactive substances by LC/MS. All of bioactive substances isolated from red seaweed were brominated sesquiterpene, which had been well known before. 6 kinds of bioactive substances from sponge were all Crambescidin. Crambescidin657 had the strongest antitumor effect for squamous cell carcinoma cells and its half maximal inhibitory concentration for A431 cell was 50nM. We extracted RNA from A431 cell treated with 50nM Crambescidin657 for 24hours on serum free medium. Exhaustive gene analysis using by DNA microarray indicated the downregulation of cell cycle related genes and upregulation of cholesterol synthesis enzyme, inflammation related genes.

研究分野：口腔外科学

キーワード：海洋生物 口腔癌 扁平上皮癌 ドライバー遺伝子 創薬 抗癌剤 毒性試験 Crambescidin

## 1. 研究開始当初の背景

現在も多くの固形癌の根治治療の中心をなすのは外科療法であり、切除可能な癌に対しては積極的に手術が行われている。一方、化学療法においては、分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤の開発、実用化がめざましい。大腸癌では切除不能症例に対して分子標的治療薬を投与することにより手術可能となる症例も多く、また術前に投与することで縮小手術をも可能にしている。しかし口腔癌をはじめとした頭頸部癌においては、このような他臓器の癌と比較して新規の抗腫瘍剤や分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害剤の開発とその臨床応用はかなり遅れている。

従来の抗腫瘍剤の中には自然界に生息する天然物由来の薬剤が多い。地球上の大半を占める海洋をすみかとする海洋生物は、敵に対する構造上の防御システムをもたない反面、化学的な防御システムが発達した生物である。そのため海洋生物の多くは地上の生物と異なった代謝システムや、生理機能（フェロモン、アロモン、シノモンなど）が備わっており、海洋生物由来生理活性物質の病原性微生物に対する増殖抑制効果や、がん細胞に対する抗腫瘍効果の報告が数多くなされている。海洋というリード化合物の無尽蔵の宝庫を利用して、海洋生物由来生理活性物質から口腔癌を標的とした薬剤を開発することを研究当初の目的とした。

## 2. 研究の目的

海洋生物から新たな抗癌作用を有する生理活性物質を見いだすために、日本近海やインドネシア近海で採取した種々の海洋生物由来精製抽出物の口腔扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍活性を無血清培養系で検討し、さらに、高い抗腫瘍活性物質の種々のキナーゼシグナルに及ぼす影響を明らかにするとともに、構造決定を行う。また、これら活性物質の他臓器の固形がんとなっている ドライバ遺伝子を標的とした網羅的な解析 を行う、さらに、これら活性物質の誘導体を合成し、口腔癌移植腫瘍に対する *in vivo* での効果を検証し、口腔癌に対する海洋生物由来の新規分子標的薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

I. 日本近海やインドネシア近海で採取した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新規生理活性物質の精製を進める。

II. 活性のある既知物質は新規生理活性メカニズムについて口腔癌ドライバ遺伝子を中心に機能解析する。

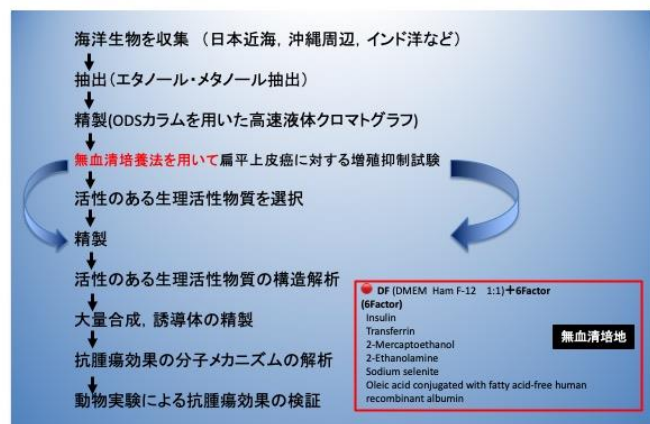
III. 既知および新規の生理活性物質とその誘導体を用いた動物実験で検証する。

(Iは申請期間を通じて計画する。対象となる物質が同定されるごとにII→IIIを繰り返す。)

口腔扁平上皮癌に対する細胞毒性を指標に海洋生物由来の生理活性物質の精製・分離を継続しおこなう。活性のある物質は構造解析装置を用いて構造決定する。また機能解析や動物実験のための大量合成や誘導体の合成を行う。

## 4. 研究成果

### 研究方法



結果

①カイメンからの生理活性物質の精製と同定

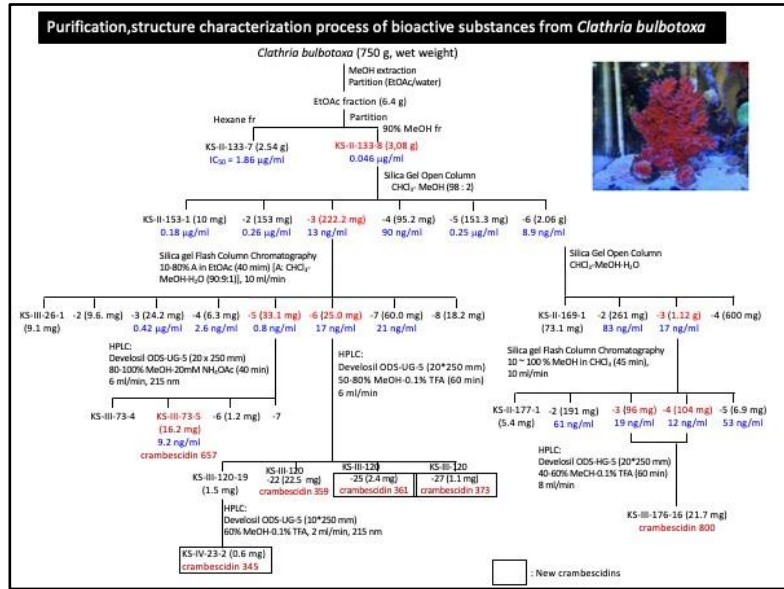
インドシナ海近海のカイメン由来の生理活性物質 6 種類のうち 3 種類が新規の生理活性 (四角で囲んでいる) 物質であった。

既知物質

- Crambescidin359
- Crambescidin657
- Crambescidin800

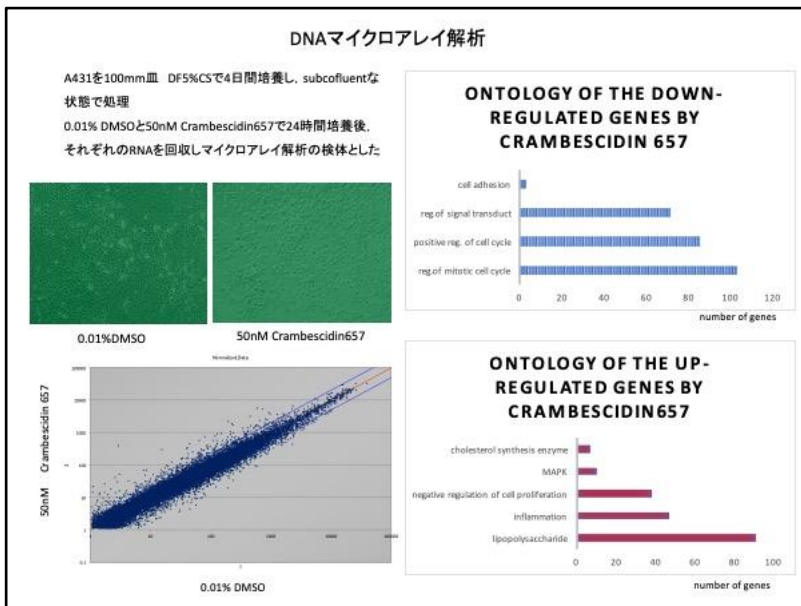
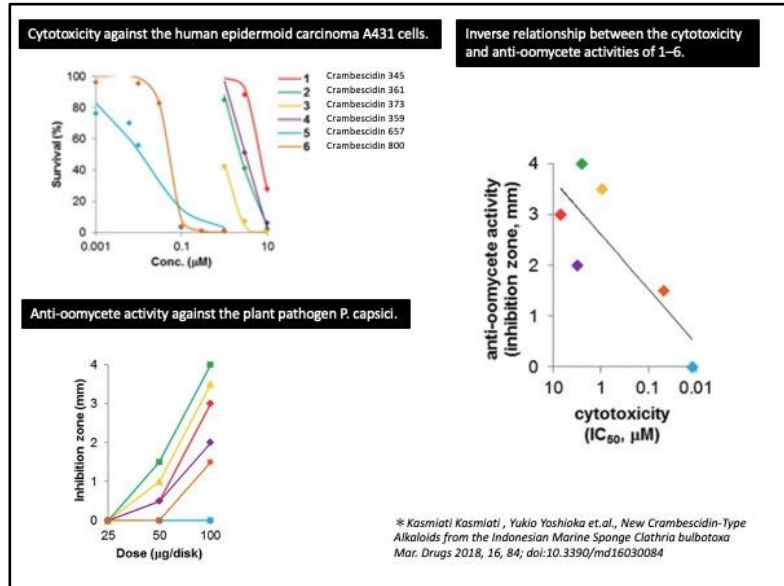
新規物質

- Crambescidin345
- Crambescidin361
- Crambescidin373



②Crambescidinの疫病菌阻害活性

細胞毒性の強力であった Crambescidin657 と Crambescidin 800 は阻害活性が低い



③最も細胞増殖抑制効果の高かった Crambescidin657 処理による扁平上皮癌細胞の遺伝子変化を DNA マイクロアレイにて網羅的に解析した結果. 全遺伝子中, 細胞周期, 細胞分裂に関わる遺伝子群の発現が低下し, MAPK, 炎症系, エンドトキシン系が上昇しており, これが細胞死に関連している可能性が示唆された. 興味深いことにコレステロール合成関連遺伝子も上昇していた.

## まとめ

1. インドネシア近海で採取した紅藻ソゾ属 *Laurencia intricata* から同定された 4 種類の生理活性物質はすべて既知の臭化化合物であった.
2. インドネシア近海で採取したカイメン *Clathria bulbotoxa* から精製された生理活性物質より新規物質 Crambescidin345, 361, 373 と既知物質 Crambescidin359, 657, 800 を同定した.
3. 6 種類の Crambescidin の疫病菌阻害活性と扁平上皮癌細胞に対する抗腫瘍効果は反比例していた.
4. Crambescidin657 処理により扁平上皮癌細胞の細胞分裂, 細胞周期に関連する遺伝子群の発現低下を認めた. コレステロール合成系関連遺伝子, MAPK, 炎症系, エンドトキシン系 関連遺伝子の上昇を認めた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kasmiati Kasmiati, Yukio Yoshioka, Tetsuji Okamoto and Makoto Ojika	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 New Crambescidin Type Alkaloids from the Indonesian Marine Sponge Clathria bulbotoxa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mar Drugs	6. 最初と最後の頁 e84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md/6030084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kasmiati Kasmiati, Yukio Yoshioka, Tetsuji Okamoto, Makoto Ojika	4. 巻 16, 84
2. 論文標題 New Crambescidin-Type Alkaloids from the Indonesian Marine Sponge Clathria bulbotoxa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 on line
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.3390/md16030084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡幸男, 濱田充子, 中峠洋隆, 小鹿一, 岡本哲治
2. 発表標題 海洋生物由来生体活性物質の探索研究
3. 学会等名 第72回NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岡本 哲治  (Tetsuji OKAMOTO)  (00169153)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授    (15401)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小鹿 一  (Makoto OJIKI)  (50152492)	名古屋大学・生命農学研究科・教授    (13901)	
研究分担者	山崎 佐知子  (Sachiko YAMASAKI)  (00632001)	広島大学・病院（歯）・病院助教    (15401)	