

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 25 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790217

研究課題名（和文）p53 依存的、非依存的細胞死を誘導する化合物の探索及び開発

研究課題名（英文）

Screening of compounds for p53 dependent or independent cell death

研究代表者

立田 大輔（TATUDA DAISUKE）

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・研究員

研究者番号：20442569

研究成果の概要（和文）：新たな抗がん剤の創製を目的としてがん抑制遺伝子である p53 をターゲットとしたスクリーニングを天然物ライブラリーから行った結果、植物からゲラニイン等のエラジタンニン類、微生物代謝産物から 5 種類の新規化合物を取得することに成功した。更にエラジタンニン類のゲラニインやオイゲニインは骨肉腫細胞を移植したマウスに対して抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To search for new anti-tumor compounds, we screened new compounds for p53 dependent cell death. As a result of screenings, we identified ellagitannins from the plant extracta and 5 new natural products from the microbial metabolite. Geraniin and eugenin, a member of ellagitannins, suppressed tumor growth of osteosarcoma cells in a xenograft model.

交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2010 年度 | 600,000   | 180,000 | 780,000   |
| 2011 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：がん、p53、細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

がんは遺伝子変化の多様性、臓器特異的腫瘍特性、転移の有無など治療が困難な疾病である。しかしながら近年、分子標的治療薬の登場によって著しくがんの治療成績は向上した。一方で副作用の多様化、分子標的治療薬への耐性化など新たな問題も出現してきた。

## 2. 研究の目的

新たな分子標的治療薬の創製を目的とし

て、p53 に注目をした。p53 はがん抑制遺伝子として知られており、がん細胞を強制的に死へと導くことが可能である。そこで我々は 2 つのスクリーニング系を構築して分子標的治療薬のリード化合物の探索を行う。

- (1) p53 と Mdm2 の結合を阻害する化合物の探索
- (2) p53 に依存、非依存した細胞死を誘導する化合物の探索

### 3. 研究の方法

(1) 構築した2つのスクリーニング系を用いて化合物の探索を行った。

① p53とMdm2の結合を阻害する化合物の探索は、セルフフリーのMdm2-p53蛋白質結合阻害をTR-FRET法(時間分解・蛍光共鳴エネルギー転移をプレートリーダー(EnVison)で測定)で行った。

Mdm2-p53の結合を阻害する微生物代謝産物がヒットした場合は、希釈系列を作って詳細に解析し、Mdm2-p53蛋白質結合阻害をTR-FRET法とは別法であるDELFI法(蛍光物質を用いたELISA法)によって再試験した。

② p53依存性、非依存性な細胞死を誘導する化合物はp53の発現量をテトラサイクリンで制御できるグリオーマのLNZTA3細胞を用いてスクリーニングした。まず一晩培養したLNZTA3細胞に微生物代謝産物を加えて3日間培養し、p53の発現の有無によって細胞死を起こす細胞をMTT法によって測定した。ヒットした微生物代謝産物は、希釈系列を作って詳細に解析し、これらの微生物代謝産物による細胞死がLNZTA3細胞特異的でない事を、p53が正常または変異を持つ他のがん細胞で再試験した。

(2) ヒットした化合物の単離、精製

スクリーニングでヒットした場合、まず予備試験にて高分子や不安定な物質を排除した。次に溶媒移行性を検討して化合物の抽出を行う。抽出した粗精製物をシリカゲルやゲルろ過、HPLCを駆使して精製した。精製した化合物はLC-MSやNMRを使って構造決定した。

(3) 化合物の活性評価

① p53-Mdm2の結合阻害化合物は細胞内のp53-Mdm2結合をmammalian two-hybridで解析、p53の転写活性をレポーターアッセイで解析した。また化合物を添加した細胞でp53の発現上昇や下流の遺伝子の発現をwestern-blottingで検出を行った。

② p53依存性、非依存性な細胞死を誘導する化合物はp53が正常または変異したがん細胞において特異的に細胞死を誘導することを検証した。

(4) in vivoでの抗腫瘍効果の解析

化合物のマウスへの毒性の有無を確認した後に、がん細胞を移植したマウスに化合物を投与して、コントロールに対して腫瘍の大きさや重さを比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① p53とMdm2の結合を阻害する化合物の探索

植物に含まれるエラジタンニン類のグラニインがp53-Mdm2の結合を阻害することを明らかとした。TR-FRET法やDELFI法でp53-Mdm2の結合を阻害するだけでなく細胞内のp53-Mdm2の結合も阻害していることがmammalian two-hybridの結果で分かった。またグラニインはp53の転写活性を上昇させる事がレポーターアッセイの結果から明らかとなった。グラニイン処理した細胞はp53の蓄積が見られ、下流の遺伝子の発現が上昇していることを見出した。

また、コロニーフォーメーションアッセイによってp53依存性な細胞死を誘導し、骨肉腫細胞を移植したマウスにグラニインを投与すると抗がん効果を示すことが明らかとなった。

グラニインは生薬であるゲンノショウコに含まれることが知られているが、グラニインを含んだゲンノショウコエキスも骨肉腫細胞を移植したマウスに対して抗腫瘍効果を持つことが明らかとなった。グラニインはエラジタンニン類の一種であるが、その他のエラジタンニンにもp53-Mdm2の結合阻害活性があることが明らかとなり、その中でオイゲニンはグラニインよりも高い抗腫瘍効果を持っていた。

② p53に依存、非依存した細胞死する化合物の探索

微生物培養産物からp53依存性に細胞死を誘導する化合物を5種類見出した。これらの化合物は膠芽腫細胞や胃がん細胞においてp53依存性な細胞死を誘導した。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

天然物から得られたp53-Mdm2の結合阻害化合物としてグラニインは、最も強い阻害活性を示す。またin vivoでの抗腫瘍効果は既知のp53-Mdm2結合阻害剤と同等である。p53依存性細胞死を誘導する化合物は新規化合物であり細胞死の誘導メカニズムの解析によって新たな知見が得られる可能性を秘めた魅力的な化合物である。

(3) 今後の展望

p53-Mdm2の結合阻害剤であるグラニインをはじめとしたエラジタンニン類は単剤、あるいは既存薬との併用によって抗がん剤として社会貢献出来る可能性を持つ。

p53依存性細胞死を誘導する化合物はin vitro、in vivoの研究を進める事で抗がん剤

の新たなターゲットを明らかとする可能性を秘めている。

#### 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 2 件)

① Isao Momose, Daisuke Tatsuda, Shun-ichi Ohba, Tohru Masuda, Daishiro Ikeda, Akio Nomoto

In vivo imaging of proteasome inhibition using a proteasome-sensitive fluorescent reporter. *Cancer Sci.* 103, 1730-1736 (2012) 査読有,

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02352.x

② Isao Momose, Shun-ichi Ohba, Daisuke Tatsuda, Manabu Kawada, Tohru Masuda, Go Tsujiuchi, Takao Yamori, Hiroyasu Esumi, Daishiro Ikeda

Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 392, 460-466 (2010) 査読有,

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.050.

[学会発表] (計 12 件)

① Daisuke Tatsuda, Shun-ichi Ohba, Yoji Umezawa, Masatomi Iijima, Isao Momose, Akio Nomoto

Inhibition of p53-Mdm2 interaction by ellagitannins

The 17th JFCR-ISCC

2012年12月06日

日本科学未来館(東京都)

② Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Masatomi Iijima, Akio Nomoto

Inhibition of p53-Mdm2 interaction by ellagitannins

24th EORTC-NCI-AACR SYMPOSIUM

2012年11月07日

Convention Centre Dublin (アイルランド)

③ Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Masatomi Iijima, Akio nomoto

Ellagitannins inhibit the p53-Mdm2 interaction

第71回日本癌学会学術総会

2012年09月21日

ロイトン札幌(北海道札幌市)

④ Masatomi Iijima, Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Akio nomoto

Inhibition of IAP expression by Barminomycin

第71回日本癌学会学術総会

2012年09月21日

ロイトン札幌(北海道札幌市)

⑤ 立田大輔、飯島正富、百瀬 功

p53-Mdm2 の結合を阻害するエラジタンニン類

第16回日本がん分子標的治療学会学術集会

2012年06月28日

西日本総合展示場(福岡県北九州市)

⑥ Daisuke Tatsuda, Masatomi Iijima, Takashi Kitayama, Isao Momose, Akio Nomoto

Inhibition of the Mdm2-p53 interaction by geraniin

23th EORTC-NCI-AACR SYMPOSIUM

2011年11月14日

Moscone Center West (サンフランシスコ アメリカ)

⑦ Daisuke Tatsuda, Masatomi Iijima, Isao Momose, Akio Nomoto

Inhibition of the Mdm2-p53 interaction by geraniin

第70回日本癌学会学術総会

2011年10月5日

名古屋国際会議場(愛知県)

⑧ 立田大輔、飯島正富、百瀬功

Geraniin は p53-Mdm2 の結合を阻害する

第15回日本がん分子標的治療学会学術集会

2011年6月23日

ホテル日航東京(東京都)

⑨ Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Toru Masuda, Daishiro Ikeda

*In vivo* imaging of proteasome inhibition by indicating ubiquitin -proteasome pathway

第69回日本癌学会学術総会

2010年9月24日

リーガロイヤルホテル大阪(大阪府)

⑩ 立田大輔、百瀬功、大庭俊一、増田徹、池田大四郎

ユビキチン融合蛍光蛋白質を用いたプロテアソーム阻害活性の *in vivo* イメージング

第14回日本がん分子標的治療学会学術集会

2010年7月8日

タワーホール船堀(東京都)

⑪ Isao Momose, Daisuke Tatsuda, Shun-ichi

Ohba, Toru Masuda, Daishiro Ikeda  
*In vivo* imaging of proteasome inhibitory  
activity in tumors of living mice  
第 68 回日本癌学会学術総会  
2009 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)  
⑫百瀬功、立田大輔、大庭俊一、増田徹、  
池田大四郎  
プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を用  
いた腫瘍内プロテアソーム阻害活性の *in*  
*vivo* イメージング  
第 13 回日本がん分子標的治療学会学術集会  
2009 年 6 月 26 日  
ホテルクレメント徳島 (徳島県)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗がん剤  
発明者：立田大輔  
権利者：公益財団法人 微生物化学研究会  
種類：特許  
番号：特願 2012-241685  
出願年月日：平成 24 年 11 月 1 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bikaken.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立田大輔 (TATSUDA DAISUKE)  
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・研究員  
研究者番号：20442569