

平成 30 年 5 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07417

研究課題名(和文) Dermcidin を標的とした全く新しい抗メラノーマ薬の開発

研究課題名(英文) Research for new anti-melanoma agents targeting dermcidin

研究代表者

福田 隆志 (FUKUDA, Takashi)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30348586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚がんの一種であるメラノーマ(悪性黒色腫)は、最も悪性度の高いがんと考えられている。申請者は、このメラノーマに対しより選択的に抗がん活性を示す天然化合物の発見を目的に研究を行った。

本研究期間中に約 10,000 の微生物培養液を評価し、計 3 種の新規抗がん活性物質を発見した。海洋放線菌 *Nocardiopsis alba* KM6-1 株培養液からは isomethoxyneihumicin を、また海洋放線菌 *Streptomyces* sp. MA2-12 株培養液からは chlokamycin を、さらに海洋由来真菌の培養液中からは強力な新規抗がん活性物質 A を発見した。

研究成果の概要(英文)：Melanoma cells are thought the worst cancer cells. We researched for finding the melanoma selective anti-cancer agents from the culture broth of marine-derived microorganisms. We screened more than 10,000 culture broths. As a result, we found three new anti-cancer agents. Isomethoxyneihumicin was isolated from the culture broth of marine actinomycete *Nocardiopsis alba* KM6-1 which had been collected at Chichizima. Chlokamycin was isolated from marine *Streptomyces* sp. MA2-12. Additionally, one new compound showing strong activity against some melanoma cells was isolated from marine-derived fungus collected at Okinawa.

研究分野：海洋天然物

キーワード：抗がん 海洋微生物 メラノーマ

## 1. 研究開始当初の背景

がんは我が国の死因の第一位を占め、いまや3人に1人はがんによりなくなっている。また、がん死亡者数も高齢化社会に伴い年々増加し続けている。がんの治療法の一つである化学療法は、外科的手術が困難な場合にその威力を発揮しており、これまでに多種多様な抗がん剤が開発されてきた。しかし、がんには多様性があるため、すべてのがんに効くといった抗がん剤は存在しない。

近年増加しているがんの一つに皮膚がんが挙げられる。日本国内での発生数はさほど高くはないが、欧米や特にオーストラリアやニュージーランドのような赤道に近い地域の白人にその発生の増加が見られており、その割合は10万人に40~50人とされている。この原因の一つとして挙げられるのが、オゾン層の破壊である。すなわちオゾン層の減少により地上に降り注ぐ紫外線量が増加したため、皮膚がんを発症する人が増加したと考えられている。さらに問題は、今なおオゾン層の破壊は続いている事であり、今後欧米のみならず地球規模で皮膚がんの発症数が増加する事が危惧されている。

## 2. 研究の目的

皮膚がんの一種であるメラノーマ(悪性黒色腫)は、薬が効きにくいことや容易にリンパにより転移する等の理由から最も悪性度の高いがんと考えられている。申請者らは、このメラノーマに対しより選択的に抗がん活性を示す天然化合物 seriniquinone A を海洋由来微生物の培養液中より発見し、その標的が、抗菌ペプチドの一種 dermcidin (DCD) であることを世界で初めて突き止めた。そこで本研究では、この全く新しい作用点 DCD を標的とした化合物を天然資源、特に海洋由来微生物から探索し、メラノーマに対し選択性の優れた抗がん剤の開発を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) DCD 高発現株の取得

可能な限りのがん細胞株を入手し、すべて Q-PCR を行い、DCD の発現を精査した。

### 2) 特殊環境微生物培養液の作成及び取得

源泉や海洋といった特殊環境下より微生物の分離を試みた。新たに分離された糸状菌、放線菌及びバクテリアを用いて培養を行い、それぞれの培養液を作成した。また共同研究先より菌株並びに培養液の提供を画策した。

### 3) スクリーニングの実施

一次スクリーニングでは細胞の増殖能力の高いヒト T リンパ腫由来細胞 (Jurkat) を用いた。活性評価は MTT アッセイならびに細胞周期を測定するフローサイトメトリー (FACS) を用いて殺細胞活性および細胞周期への影響を評価した。

### 4) 活性物質の単離精製

スクリーニングで有効と判断されたサンプルは、三角フラスコを用いた大量培養を行い、この培養液から抽出操作(溶媒、各種吸着剤)、各種クロマトグラフィー(順相・逆相および HPLC)等の精製手法を組み合わせることによって目的の活性物質を単離した。

### 5) 活性物質の構造解析

単離した化合物は各種機器分析(質量分析、赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル(NMR)等)の測定および解析を行ない、化学構造を明らかにした。

### 6) 活性物質の作用メカニズム解析

活性化合物の標的を明らかとするため、生化学的手法を用いて標的タンパクの特定を試みた。

## 4. 研究成果

### 1) DCD 発現株の取得

がん細胞(17種類)の入手を行った。それら細胞の DCD の発現について Q-PCR 法を用い評価したところ、2種の株(HM3KO細胞(ヒト皮膚由来メラノーマ細胞)および HCT116 細胞(ヒト結腸腺がん細胞))でその発現を確認した。しかしながらその発現量は予想していたものよりはるかに少ないことが判明し、このままではスクリーニングに用い得ないと判断した。そこで DCD の発現を誘導すると予想される seriniquinone A を有機化学的方法にて合成し、培地に少量加え細胞を継代することで、DCD 高発現株の樹立を試みた。確かに DCD の発現量の上昇を上記2株で確認したが、高発現株の樹立まではできなかった。

### 2) Jurkat 細胞を用いたスクリーニング

研究期間内で約 10,000 を超える微生物培養液の評価を行った。その中から活性を指標に活性物質の単離を試み、3株より3種類の新規抗がん活性物質を見出すことに成功した。また抗がん活性は示さなかったが、1種類の新規化合物を発見した。

### 3) 海洋由来放線菌 *Nocardiopsis alba* KM6-1 株が生産する新規抗がん活性物質 isomethoxyneihumicin

生産菌である KM6-1 株は東京海洋大学より分与され、東京都小笠原諸島父島の海砂より分離された。16S rRNA 遺伝子配列の結果から本菌株は、*Nocardiopsis alba* と同定された。本菌培養液(3L)のアセトン抽出物より活性物質の単離精製を行い、活性物質として isomethoxyneihumicin (1.7 mg) を単離した。各種機器分析より化合物 1 および 2 の構造を図 1 に示すように決定した。すなわち、化合物 1 は lactam タイプ、化合物 2 は lactim タイプと決定した。(図 1)

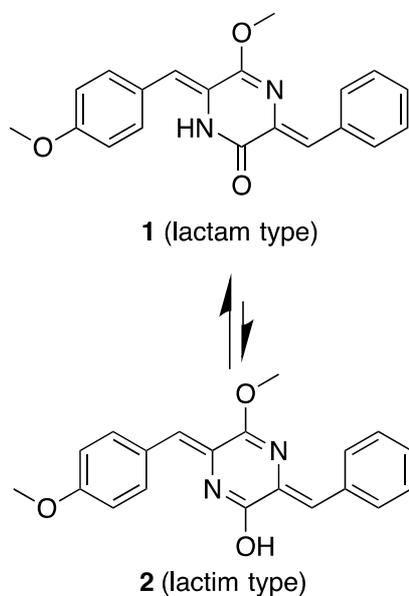


図 1 Isomethoxyneihumicin の構造

本化合物のがん細胞周期に対する影響を、FACS を用いて調べた。まず G2/M 期停止活性の強さを調べるため、isomethoxyneihumicin (0~15  $\mu\text{M}$ ) を 20 時間作用させ、がん細胞周期への影響を調べた。その結果、isomethoxyneihumicin は濃度依存的に Sub G1 期に存在する細胞を増加させ、15  $\mu\text{M}$  添加時にはその 61% を Sub G1 期に移行させた。また、この時、細胞の 23% が G2/M 期に存在していたことから、isomethoxyneihumicin が時間依存的に G2/M 期停止活性を引き起こしている可能性が示唆された。(図 2)

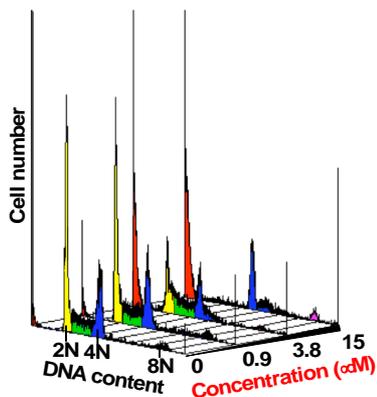


図 2 Isomethoxyneihumicin の細胞周期に対する影響 (その 1)

次に、isomethoxyneihumicin のがん細胞周期への影響を継時的に調べた。すなわち isomethoxyneihumicin の濃度を 15  $\mu\text{M}$  に固定し、作用時間を 0~20 時間に設定して FACS 測定を行った。その結果、isomethoxyneihumicin は作用後 3 時間目から G2/M 期停止活性を示し始め、12 時間後には測定した細胞の 66% が G2/M 期に停止していた。さらに 20 時間後には 61% の

細胞が Sub G1 期に存在し、細胞死を起こしていることが示された。(図 3)

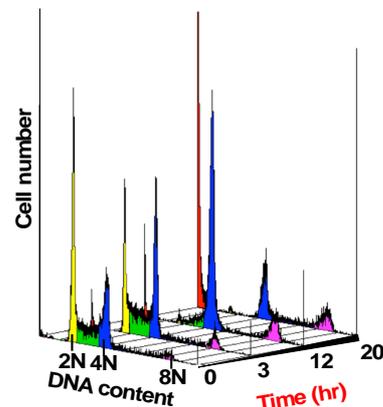


図 3 Isomethoxyneihumicin の細胞周期に対する影響 (その 2)

Isomethoxyneihumicin の作用 20 時間における各種がん細胞に対する影響を MTT 法を用いて評価した。Jurkat 細胞の他に、ヒト悪性黒色腫細胞である A101D 細胞、HM3KO 細胞、CoLo679 細胞および G361 細胞、ヒト結腸がん細胞である HCT116 細胞およびヒトメラノーマ細胞である MMAc 細胞を評価細胞として用いた。その結果、isomethoxyneihumicin は Jurkat 細胞に対して  $\text{IC}_{50}$  値 6.98  $\mu\text{M}$  で細胞増殖を阻害した。一方でその他の細胞種に対しては終濃度 100  $\mu\text{M}$  でも細胞増殖を 50% 以上阻害しなかった。

次に作用点を明らかにするため G2/M 期関連タンパク質の定量を行った。Isomethoxyneihumicin の G2/M 期停止活性について cyclin A、cyclin B1 およびリン酸化 Cdc2 (p-Cdc2 (Tyr 15)) タンパク質を指標として調べた。Isomethoxyneihumicin (15  $\mu\text{M}$ ) の処理により、薬剤無添加と比較して cyclin A の発現量は 89% 減少し、p-Cdc2 の発現量は 76% 減少した。ポジティブコントロールである colchicine の作用により、cyclin A の発現量は 94% 減少し、p-Cdc2 の発現量は 60% 減少した。また bleomycin の作用により、cyclin A の発現量は 90% 増加し、p-Cdc2 の発現量は 72% 増加した。また cyclin B1 の発現量は、isomethoxyneihumicin、colchicine および bleomycin の作用により 90%、270%、53% それぞれ増加した。本結果より isomethoxyneihumicin は colchicine と同様に cyclin A および p-Cdc2 の減少と cyclin B1 の増加を示したことから、細胞周期を M 期で停止させている可能性が示唆された。

#### 4) 海洋由来放線菌 *Streptomyces* sp. MA2-12 株が生産する新規抗がん活性物質 chlokamycin

生産菌 MA1-12 株は、北里大学海洋バイオテクノロジー釜石研究所より分与された海洋放線菌である。16S rRNA 遺伝子配列の結

果から本菌株は、*Streptomyces* sp. と同定された。

生産菌の培養及び活性物質の精製は、*N. alba* KM6-1 株とほぼ同様の手順で行った。本菌培養液(6L)のアセトン抽出物より活性物質の単離精製を行い、活性物質として chlokamycin (3) (7.8 mg) を取得した。各種機器分析より化合物 3 の構造を図 4 に示すように決定した。

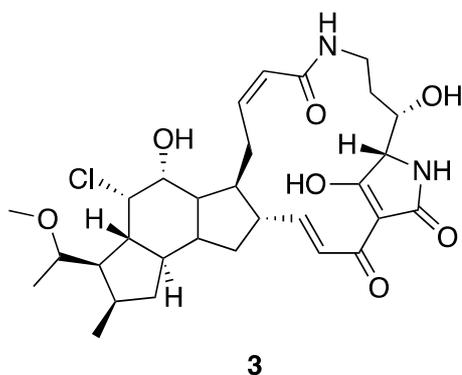


図 4 Chlokamycin の構造

Chlokamycin の作用 20 時間における各種がん細胞に対する影響を MTT 法を用いて評価した。評価には Jurkat 細胞および HCT116 細胞を用いた。その結果、chlokamycin は Jurkat 細胞および HCT116 細胞に対してそれぞれ IC<sub>50</sub> 値 24.7 および 33.5 μM で細胞増殖を阻害した。

#### 5) 源泉由来真菌 *Aspergillus nidulans* BF0142 株が生産する新規物質 helvafranone

北海道登別地獄谷温泉の源泉近くの土壌より分離された真菌 *Aspergillus nidulans* BF0142 株培養液中より新規化合物 helvafranone を単離構造決定した。残念ながら 100 μM で抗がん活性は示さなかった。

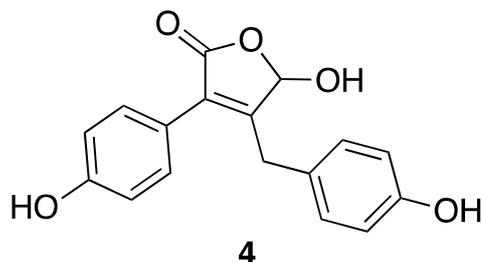


図 5 Helvafranone の構造

#### 6) その他の新規活性化合物

沖縄の海洋より分離された菌株の培養液より、新規抗がん活性化合物 A を取得した。本化合物の構造は相対立体まで決定済みである。また本化合物はメラノーマ細胞に対して 50 pM という超低濃度で抗がん活性を示すため、薬のシーズとして非常に有望と考えられる。現在特許取得の準備を進めている。

#### 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 3 件)

- 1) Fukuda T, Takahashi M, Nagai K, Harunari E, Imada C, Tomoda H. Isomethoxyneihumicin, a new cytotoxic agent produced by marine *Nocardopsis alba* KM6-1. *J. Antibiot.* 70: 590-594 (2017) doi: 10.1038/ja.2016.152 査読有
- 2) Fukuda T, Takahashi M, Kasai H, Nagai K, Tomoda H. Chlokamycin, a new chloride from the Marine-derived *Streptomyces* sp. MA2-12. *Nat. Prod. Com.* 12: 1-4 (2017) [www.naturalproduct.us](http://www.naturalproduct.us) 査読有
- 3) Furukawa T, Fukuda T, Nagai K, Uchida R, Tomoda H. Helvafuranone produced by the Fungus *Aspergillus nidulans* BF0142 Isolated from Hot Spring-derived Soil. *Nat. Prod. Com.* 11: 1001-1003 (2016) [www.naturalproduct.us](http://www.naturalproduct.us) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 福田隆志, 高橋美咲, 今田千秋, 供田洋 「海洋由来の抗がん活性物質に関する研究」第 19 回マリンバイオテクノロジー学会 (2017)
- 2) 高橋美咲, 古川茶勲, 福田隆志, 内田龍児, 供田洋 「細胞周期に着目した抗がん剤の探索研究」日本薬学会第 136 年会 (2016)
- 3) 高橋美咲, 福田隆志, 笠井宏朗, 内田龍児, 供田洋 「海洋由来放線菌 MA2-12 株が生産する新規抗がん活性物質の研究」第 18 回マリンバイオテクノロジー学会 (2016)
- 4) Fukuda T, Furukawa T, Uchida R, Tomoda H. New compounds produced by the fungus *Aspergillus nidulans* BF0142 isolated from hot spring-derived soil. International Symposium on Natural Products for the Future Tokushima (2016)
- 5) Fukuda T, Kanamoto A, Tomoda H. 「Discovering New Biologically active compounds from Marine-derived microorganism」The 8<sup>th</sup> Korea-Japan Chemical Biology Symposium. Okinawa, Japan (2016)
- 6) Fukuda T, Tomoda H. 「Discovery of marine microbial products」VIIIth US-Japan Seminar on Marine Natural Products in Hawaii, US (2016)

〔その他〕

ホームページ等

<http://suisanriyouken.sakura.ne.jp/riyo/top.htm>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 隆志 (FUKUDA, Takashi)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30348586