

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10615

研究課題名(和文)新規低分子化合物APAの前立腺癌におけるアンドロゲン依存増殖阻害機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of androgen-dependent growth inhibition mechanism in prostate cancer of novel small molecule compound APA

研究代表者

山崎 洋子 (YAMAZAKI, Yohko)

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：80342690

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)：前立腺がんは内分泌治療が奏効するが、数年後にはその半数以上が去勢抵抗性癌へと進行する。去勢抵抗性となってもアンドロゲンレセプター(AR)が前立腺がんの生存増殖に重要であるが、その阻害剤はアンタゴニストのみである。

筆者らは微生物代謝産物からヒト前立腺がん細胞のアンドロゲン依存性増殖を抑制する物質として androprostamine (APA) を発見した。APAはマウスを用いた動物実験において臨床で使用されているビカルタミドよりも優れた抗腫瘍作用を示したが、体重減少などの副作用が認められた。そこで、APAをもとに50種類の誘導体を合成し、活性を保持したまま副作用を軽減した化合物の合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：Although endocrine therapy is the mainstay of treatment for advanced prostate cancer, most patients with prostate cancer progress from androgen-dependent to castration-resistant (CRPC) disease. Androgen receptor (AR) is required for CRPC progression, but AR inhibitors are antagonists only.

We discovered androprostamine (APA), a novel inhibitor of androgen-dependent human prostate cancer cell growth, from microbial metabolite. APA showed better antitumor activity than clinically used bicalutamide in in vivo experiments using mice, but side effects such as weight loss were observed. Therefore, we synthesized 50 kinds of derivatives based on APA and succeeded in synthesis of new derivatives which keep antitumor activity with reduced side effects.

研究分野：創薬化学

キーワード：前立腺がん アンドロゲンレセプター

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は高齢化や食事の欧米化、および前立腺癌特異抗原 (PSA) 検査による早期前立腺癌の診断に伴って、その頻度が急増している癌である。疫学からの統計による予測では 2020 年には罹患数が癌の中で最多になると予想されている [がん・統計白書 2012]。

初期の前立腺癌はアンドロゲン依存性癌であり、1940 年代に Huggins と Hodges によりアンドロゲン除去が前立腺癌患者の症状を改善すること [Huggins et al., Cancer Res., 1941, 1:293] が報告されて以来、内分泌療法は進行前立腺癌に対する標準的な治療になっている。前立腺癌は進行病期に癌が発見されても、その 80% 以上は外科的あるいは薬物的アンドロゲン除去に反応し症状は軽快する。しかし数年後にはその半数以上がアンドロゲン依存性を喪失して去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) となり、1 ~ 2 年後に癌死に至る。

CRPC への進展の機序については、アンドロゲンレセプター (AR) の過剰発現、突然変異、メチル化、共役転写因子の異常、リガンド非依存性活性化などが、報告されており [Heinlein CA, Chang C., Endocr. Rev., 2004, 25(2):276]。臨床ではこれらの因子が重複し、解析が困難な状況にある。しかしながら、CRPC においても依然として AR が前立腺癌の生存増殖に重要であり、AR の機能を阻害することによってアンドロゲン非依存性の増殖を阻害できることが明らかになっている [Chen CD et al., Nature Med. 2004, 10: 33]。

2014 年、本邦ではエンザルタミド、アピラテロン、カバジタキセルという CRPC に対する新薬が相次いで承認された。さらに、これまでホルモン感受性の前立腺癌患者には使用されていなかったドセタキセルをホルモン感受性転移性前立腺癌の内分泌治療に併用する臨床試験の解析から、ホルモン療法開始時に化学療法を併用することで生存が改善されることが示された。このように近年前立腺癌の治療選択肢が大幅に増え、今後のデータの蓄積により治療戦略が大きく変化することが予想される。

### 2. 研究の目的

申請者らは、現在使用されている抗アンドロゲン剤とは異なった機序の抗前立腺癌物質の発見を目指して、微生物代謝産物約 20 万種類から探索研究を行った。その結果、放線菌培養液から精製した新規低分子化合物である androprostamine (APA、図 1) を発見し、APA が細胞毒性を示さずにヒト前立腺癌 LNCaP および VCaP のアンドロゲン依存増殖を特異的に阻害することを明らかにした。さらに、解析の結果、APA は AR のアンタゴニストとしては機能していなかったが、AR の下流遺伝子である PSA、KLK2、TMPRSS2 の発現を用量依存的に抑制していることを明らかにした。本研究では

APA の前立腺癌アンドロゲン依存増殖阻害の作用機序を解明して新たな創薬ターゲットを発見し、同時に APA の抗癌剤としての可能性を見極めることを目的とする。

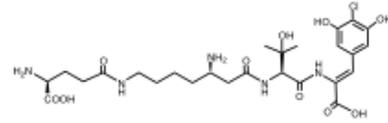


図1 Androprostamine (APA)の構造

### 3. 研究の方法

- (1) APA 生産菌の培養および APA の精製  
APA 生産菌である *Streptomyces* sp. MK932-CF8 を静置培養し、精製を行った。培養は麦を主成分とした培地を用いて 30 °C で 14 日間培養した。その後、50% アセトンで抽出し、合成吸着樹脂 Diaion HP20、イオン交換樹脂 Amberlite CG50、TOYOPEARL HW-40、ゲル濾過 Sephadex LH-20、HPLC を用いて精製を行った。
- (2) APA の動態試験  
マウスを用いて APA の薬物動態試験を行った。マウスに APA を静脈投与し、10 分、30 分、1 時間、2 時間、8 時間、24 時間後に採血し、アセトンで除タンパク処理し、HPLC で解析を行った。  
また、FITC で蛍光ラベルした APA を静脈および経口投与し、OV110 イメージングシステムを用いて生体蛍光観察を行った。
- (3) アンドロゲン依存増殖阻害活性における AR ノックダウンの効果  
APA のヒト前立腺がん細胞株におけるアンドロゲン依存増殖阻害活性への AR の関与を明らかにするために AR を siRNA でノックダウンし、阻害活性の変化を解析した。細胞は VCaP を用いて、RNAimax で AR に対する siRNA をトランスフェクションした。ノックダウンの効果はウェスタンブロットで確認し、同時にアンドロゲン依存増殖に対する阻害活性を解析した。
- (4) FG beads を用いた標的タンパクの同定  
FG beads に APA を固定化させ、前立腺がん細胞破碎液から標的タンパクの同定を試みた。FG beads に APA および活性のない APA 誘導体を固定化し、細胞破碎液と 4 時間から 24 時間、インキュベーションした。その後、FG beads を磁気分離し溶出サンプルを電気泳動し、銀染色で解析した。

(5) APA による遺伝子発現変化の網羅的解析

APA の作用機序解明のために DNA マイクロアレイを用いて APA 添加後の遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。VCaP を 2 日間血清およびアンドロゲンが含まれない培地で培養した後、1nM R1881 を添加した細胞、しない細胞から 24 及び 48 時間後に RNA を調整した。また、1nM R1881、ピカルタミドおよび APA 添加後 48 時間後の細胞からも RNA を調整し、DNA マイクロアレイを用いて解析を行った。

(6) 誘導体合成

APA はマウスを用いた動物実験において抗腫瘍活性を示したが、体重減少がみとめられた。そこで、活性を保持したまま体重減少を起こさない誘導体の合成を試みた。

4. 研究成果

(1) APA 生産菌の培養および APA の精製

震盪培養を行うと APA は生産されないため静置培養で放線菌を培養していたが、生産効率は悪く、放線菌培養液 1 リットルから APA 2.2 mg しか精製することができなかった。そこで、静置培養での条件検討として、培養スケール、および培地検討を行った。培養スケールとしては、当初のフラスコを用いた培養では手間がかかるため、数種の大きな容器で培養を試みたが、25×15 センチのバッドでの培養が限界でそれ以上にスケールアップを行うと、APA 生産が低下してしまうことが明らかになった。また、数種の穀物を用いた培地検討を行ったが、麦を用いた培地が最も APA 生産が高かった。同時に、静置培養では培養時間が非常に長いため、液体培地への変更も試みたが、液体培地では APA 産生が非常に低下してしまい、条件検討を行っても改善されなかった。

次いで、条件検討から得た条件で大量静置培養を行ったが、予定していた生産量が得られなかった。そこで、オリジナルスラントからモノコロニー操作により 25 種類の新しい放線菌株を得た。次いでこれらの新しい放線菌株をすべて静置培養し、APA 生産量の検定を行った結果、以前の生産量を保った新しい APA 生産株を得ることに成功した。(図 2)

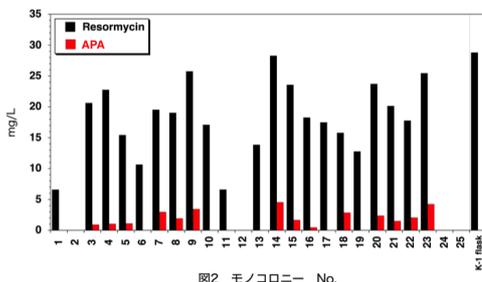


図2 モノコロニー No.

(2) APA の薬物動態試験

マウスにおける APA の動態試験を行った。マウスに APA を静脈投与したところ、10 分後に

血中から検出限界濃度以下に低下してしまうことが明らかになった。また、糞、尿、各臓器からは検出できないことから、僅かな時間で代謝されていることが予想された。

次に僅かな時間で APA が検出できなくなってしまったことから特定の臓器にトラップされる可能性を検証した。蛍光 (FITC) ラベルした APA 誘導体をマウスに静脈注射および経口投与し、蛍光観察を行った。その結果、APA は特定の臓器に蓄積する現象は観察されなかった。(図 3)

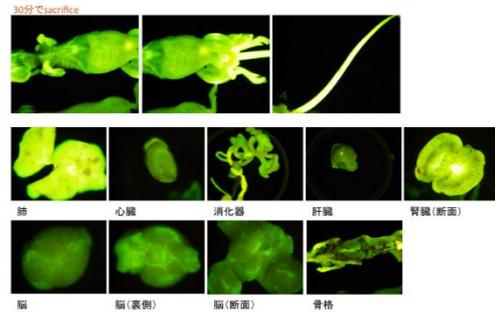


図3 FITC-APAによる薬物動態試験

(3) アンドロゲン依存増殖阻害活性における AR ノックダウンの効果

APA のヒト前立腺がん細胞株におけるアンドロゲン依存増殖阻害活性への AR の関与を明らかにするためにアンドロゲン依存性ヒト前立腺がん細胞株 VCaP を用いて AR を siRNA でノックダウンし、阻害活性の変化を解析した。

その結果、AR アンタゴニストであるピカルタミドは AR をノックダウンすると VCaP に対するアンドロゲン依存増殖阻害活性が低下するのに対して、細胞障害性抗がん剤であるマイトマイシンでは AR ノックダウンはアンドロゲン依存増殖阻害活性に影響を与えなかった。APA においてもピカルタミドと同様に AR ノックダウンによってアンドロゲン依存増殖阻害活性の低下が認められたことから、APA の前立腺がんに対する細胞毒性は AR を介していることが確認できた。(図 4)

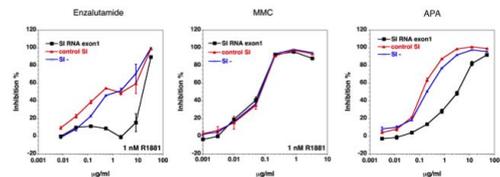


図4 アンドロゲン依存増殖阻害活性におけるARノックダウンによる効果

(4) FG beads を用いた標的タンパクの同定

FG beads に APA を固定化させ、前立腺がん細胞破碎液から標的タンパクの



Apr;80(4):774-8. doi:  
10.1080/09168451.2015.1127132. Epub  
2016 Jan 25.  
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  
査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

Yohko Yamazaki, Shun-ichi Ohba,  
Hikaru Abe, Takumi Watanabe, Isao  
Momose, Manabu Kawada, Masakatsu  
Shibasaki. AS1936: A new inhibitor  
of androgen receptor function in  
prostate cancer 2017年9月28日 第  
76 回日本癌学会学術総会 パシフィコ  
横浜 (横浜)

招待講演

Yohko YAMAZAKI, Tohru MASUDA, Isao  
MOMOSE, Manabu KAWADA, Akio NOMOTO,  
Masakatsu SHIBASAKI. Androprostamine  
A, a New Antitumor Agent for  
Castration Resistant Prostate Cancer.  
2016年3月28日 2nd International  
Symposium for Medicinal Sciences パシ  
フィコ横浜 (横浜)

Yohko Yamazaki, Isao Momose, Manabu  
Kawada, Masakatsu Shibasaki.  
Construction of screening system for  
new AR signaling inhibitors 2016年2  
月19日 第10回日米癌合同会議 Hyatt  
Regency Maui (Hawaii/USA)

Yohko Yamazaki, Isao momose, Manabu  
Kawada, Masakatsu Shibasaki.  
Construction of screening system for  
a novel AR signaling inhibitor. 2015  
年10月9日 第74回日本癌学会学術総  
会 名古屋国際会議場 (名古屋)

山崎洋子、増田徹、川田学、百瀬功、柴  
崎正勝。新規抗前立腺がん物質  
androprostamine A の抗腫瘍活性 第19  
回日本がん分子標的治療学会 2015年6  
月12日松山全日空ホテル (松山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

[http://www.bikaken.or.jp/laboratori  
es/numazu/summary.html](http://www.bikaken.or.jp/laboratori<br/>es/numazu/summary.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 洋子 (YAMAZAKI, Yohko)  
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：80342690

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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

阿部 光 (ABE, Hikaru)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物  
化学研究所・研究員  
研究者番号：10462269

(4) 研究協力者

( )