

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32613

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16555

研究課題名(和文)新規チアゾール含有ポリケチドによる栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the selective cytotoxicity of tomuruline, a novel thiazole-containing polyketide, under nutrient-starvation conditions

研究代表者

大野 修 (Ohno, Osamu)

工学院大学・先進工学部・准教授

研究者番号：20436992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新規チアゾール含有ポリケチド、トムルリンのがん細胞に対する栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構を解析し、トムルリンがグルコース飢餓条件下で選択的な細胞死誘導活性を示し、本活性がミトコンドリア呼吸鎖複合体Iに対する選択的な阻害によることを見出した。また、新たな栄養飢餓選択的な細胞死誘導剤を探索し、沖縄県産シアノバクテリアよりカルキピロンを単離し、トムルリンと同様の機能を有することを見出した。さらに、がん細胞の栄養飢餓に関連するがんリプログラミング機構と小胞体ストレスを対象とした新たなスクリーニング系を構築し、それぞれのスクリーニング系において活性物質を単離し、構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：The biological activity of the novel thiazole-containing polyketide tomuruline was elucidated to be the selective cytotoxicity toward cancer cells under glucose-restricted conditions. In addition, it was proved that tomuruline exerted cytotoxicity based on its selective inhibitory activity against the mitochondrial complex I activity. Next, we searched for compounds that showed the selective cytotoxicity toward cancer cells under nutrient-starvation conditions, and isolated kalkipyron from marine cyanobacterium collected in Okinawa. Kalkipyron was found to show the same biological activity with that of tomuruline. Meanwhile, we isolated new inhibitors of kynurenine-production and ER stress using the screening systems related to the nutrient starvation in cancers.

研究分野：生物分子科学

キーワード：トムルリン 栄養飢餓 呼吸鎖 シアノバクテリア カルキピロン リプログラミング 小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

海洋生物由来の生物活性物質には特異な構造に基づく有用な機能を持つものが多い。申請者らは、沖縄県石垣島で採集した海洋シアノバクテリアから新規チアゾール含有ポリケチド、トムルリン (図 1) を単離した。トムルリンは固形がん由来のがん細胞に対し、低密度培養条件では細胞毒性を示さない一方、栄養飢餓に陥りやすい高密度培養条件選択的に細胞死を誘導した。さらに、トムルリンは、細胞にグルコース欠乏状態を引き起こす 2-デオキシグルコース (2DG) 併用時選択的な細胞死誘導活性を示した。このように、トムルリンが栄養飢餓選択的な細胞死誘導物質であることを示す結果が得られた。栄養飢餓選択的な細胞死誘導物質は、固形がんに見られる栄養飢餓状態を標的とした抗がん剤のとしての応用が期待される。一方、がん細胞の栄養飢餓状態における応答機構には不明な点も多く、その全貌の解明は新たな創薬指標の確立に重要である。そこで、本課題ではトムルリンのがん細胞に対する栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解明を目指したとともに、栄養飢餓に関連するシグナル伝達の解析に役立つ薬剤の獲得を目指した。

2. 研究の目的

本課題では、沖縄県石垣島で採集した海洋シアノバクテリアより単離したトムルリンがなぜ栄養飢餓状態で選択的にがん細胞に細胞死を誘導するのかを解析し、作用発現機構の解明を目指した。また、新たにがん細胞の栄養飢餓状態選択的に細胞死を誘導する物質を海洋生物由来サンプルから探索し、活性物質を単離するとともに、その作用機構の解明を目指した。さらに、がん細胞の栄養飢餓に関連するシグナル伝達の阻害剤探索のための新たなスクリーニング系を構築し、それぞれのスクリーニング系における活性物質の獲得を目指した。

3. 研究の方法

海洋シアノバクテリア由来の新規化合物トムルリンが示す栄養飢餓選択的な細胞死誘導活性に関連し、主に下記の研究に着手した。

- (1) トムルリンによるがん細胞に対する栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解析
- (2) 新たな栄養飢餓選択的な細胞死誘導剤の探索及び作用機構の解析
- (3) がん細胞の栄養飢餓関連シグナル伝達の阻害剤探索のための新たなスクリーニング系の構築及び活性物質の獲得

上記の研究を通じ、トムルリン及び新たな栄養飢餓選択的な薬剤の栄養飢餓選択的な細胞死誘導活性の発現機構を解析した。また、新たな栄養飢餓関連シグナル伝達を標的とした薬剤を探索し、その機能解析を試みた。具体的な方法としては、(1)については、栄養飢餓条件に関連した各種条件で培養したがん細胞に対するトムルリンの細胞死誘導活

性を、トリパンプルー細胞外排出試験やアガロースゲル電気泳動法を用いて評価した。また、ウシ心臓より単離したミトコンドリアを用いて、呼吸鎖複合体 I-IV の活性に与える各種化合物の影響を評価した。(2)については、ヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞を高密度および低密度で培養し、海洋生物由来のスクリーニングサンプルを添加した際の生細胞数を MTT 法で定量し、高密度培養条件選択的に細胞数の減少を誘導する薬剤を探索した。活性を示したサンプルについては、分液操作や各種カラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて活性物質を精製した。また、単離した化合物について(1)と同様の評価により、作用機構を解析した。(3)については、栄養飢餓に関連する現象としてがんリプログラミング機構と小胞体ストレスを対象としたスクリーニング系を構築し、活性を見出したサンプルより(2)と同様の方法で活性物質の単離を試みた。

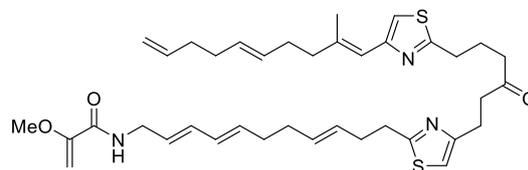


図 1. トムルリン

4. 研究成果

(1) トムルリンによるがん細胞に対する栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解析

沖縄県石垣島で採集した海洋シアノバクテリア *Symploca* sp.より単離した新規チアゾール含有ポリケチド化合物トムルリンについて、HeLa、HT1080、A431 等のがん細胞に対して解糖系阻害条件時に選択的な細胞死誘導活性を示すことを見出した。また、トムルリンが解糖系阻害剤である 2DG 併用条件でがん細胞の ATP レベルを低下させることを見出した。さらに、ウシ心臓由来ミトコンドリアを用いた評価により、トムルリンがミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に対し阻害活性を示すことを見出した (図 2)。一方、トムルリンはミトコンドリア呼吸鎖複合体 II, III, IV の活性は阻害しなかった。以上の結果より、トムルリンがミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に対する選択的な阻害剤であることを解明し、栄養飢餓条件としてグルコース飢餓条件選択的な細胞死誘導剤としての機能を有することを見出すことができた。

(2) 新たな栄養飢餓選択的な細胞死誘導剤の探索及び作用機構の解析

トムルリンと同様に、栄養飢餓選択的ながん細胞に細胞死を誘導する薬剤を天然より探索した。スクリーニング系として、がん細胞の播種細胞密度の差を利用し、栄養飢餓状

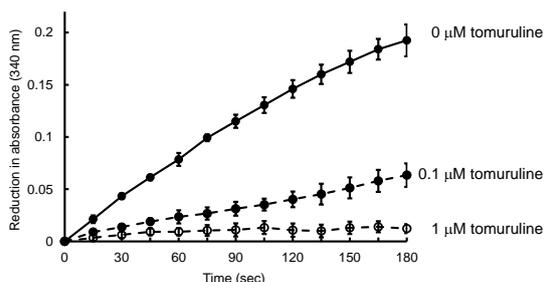


図 2. トムルリンによるウシ心臓ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I の阻害活性。

態に陥る高細胞密度条件選択的に細胞死を誘導する薬剤の探索系を構築した。各種海洋生物由来サンプルを評価した結果、沖縄県国頭郡で採集したシアノバクテリア抽出物に活性を見出した。活性成分を精製し、既知ポリケチド、カルキピロン (図 3) を単離した。生物活性の解析により、カルキピロンはトムルリンと同様に複数のがん細胞に対して高細胞密度条件において選択的に細胞死を誘導し、本細胞死がアポトーシスであることを見出した (図 4)。さらに、カルキピロンは 2DG 併用条件選択的なアポトーシス誘導活性を示すことを見出した。また、ウシミトコンドリアを用いた評価により、カルキピロンもミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に対する阻害活性を示すことを見出した。本結果より、カルキピロンはグルコース飢餓条件選択的にがん細胞のアポトーシス誘導に関与するシグナル伝達を活性化する薬剤であることを見出した。また、千葉県勝浦市、沖縄県本部町等で採集したシアノバクテリア抽出物にも同様の活性を見出し、活性物質を単離した。これらの化合物について構造解析を進め、部分構造を明らかにした。

(3) がん細胞の栄養飢餓関連シグナル伝達の阻害剤探索のための新たなスクリーニング系の構築及び活性物質の獲得

トムルリンのようにがん細胞の栄養状態を識別して働く薬剤を探索するために、がん細胞のリプログラミング機構に着目した新たなスクリーニング系を構築した。その一つとして、がん細胞の栄養代謝機構を標的としてがん免疫療法つながる、がん細胞におけるキヌレニン産生阻害剤の探索系を構築した。A431 細胞においてインターフェロン γ 刺激により誘導されるキヌレニンの産生を阻害する化合物を探索した。スクリーニングを実施し、活性を見出した沖縄県石垣島で採集したシアノバクテリア抽出物から活性物質 KNP-1 を単離した。本化合物について各種スペクトル解析による構造解析を進め、新規ペプチド化合物であることを見出した。さらに、KNP-1 の作用機構の解析に取り組み、本化合物がキヌレニン産生に関わる酵素インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ 1 の発現を阻

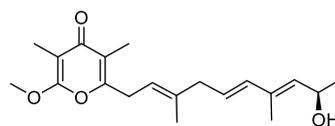


図 3. カルキピロン

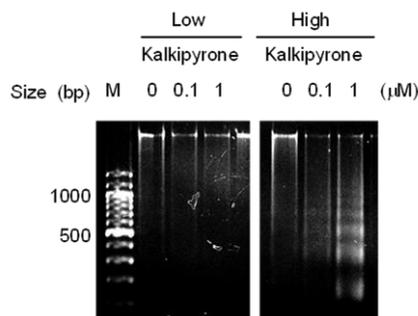


図 4. カルキピロンによる HeLa 細胞に対する高細胞密度条件選択的なアポトーシス誘導活性。Low: 低細胞密度条件、High: 高細胞密度条件。

害することを見出した。さらなる解析により、KNP-1 はインターフェロン γ のシグナル伝達の下流において STAT1 の発現を阻害することを見出した。また、栄養飢餓と密接な関係があり、糖尿病などの疾患の発症に関与する小胞体ストレスを阻害する薬剤の探索も試みた。小胞体ストレス誘導剤であるタブシガルギンを用い、本化合物が HeLa 細胞に誘導する細胞死を阻害する物質を海洋生物より探索した。スクリーニングの結果、沖縄県石垣島で採集した緑藻抽出物に活性が認められたため、分液操作と ODS カラムクロマトグラフィー、HPLC による精製により活性物質を単離した。得られた活性物質は、各種スペクトル解析により構造を明らかにし、脂肪酸誘導体であることを見出した。

以上のように、本課題ではトムルリンによるがん細胞に対する栄養飢餓選択的細胞死誘導機構を解明することができたとともに、新たな栄養飢餓選択的薬剤及び、複数の栄養飢餓関連シグナル伝達阻害剤を獲得することを達成した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- (1) Hisashi Kato-Noguchi, Fukiko Kimura, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Involvement of allelopathy in inhibition of understory growth in red pine forests, *Journal of Plant Physiology*, 218, 66–73, 2017. DOI: 10.1016/j.jplph.2017.07.006 (査読有り)
- (2) Ying Huang, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Kenji Miyamoto, Apoptosis-inducing activity and antiproliferative effect

of Paeoniflorigenone from moutan cortex, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 20, 1-8, 2017. DOI: 10.1080/09168451.2017.1300517 (査読有り)

- (3) Tomoyuki Koyama, Yoshinori Kawazoe, Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Daisuke Uemura, Anti-obesity activities of the yoshinone A and the related marine γ -pyrone compounds, *Journal of Antibiotics*, 69, 348-351, 2016. DOI: 10.1038/ja.2016.19 (査読有り)
- (4) Shinichiro Okamoto, Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Isolation and Structure of Kurahyne B and Total Synthesis of the Kurahynes, *Journal of Natural Products*, 78, 2719-2725, 2015. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00662 (査読有り)
- (5) Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shun Katsuyama, Maho Morita, Yukiko Sasazawa, Shingo Dan, Siro Simizu, Takao Yamori, Kiyotake Suenaga, Identification of a Molecular Target of Kurahyne, an Apoptosis-inducing Lipopeptide from Marine Cyanobacterial Assemblages, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 5295-5298, 2015. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.09.044 (査読有り)

[学会発表] (計 26 件)

- (1) 長屋裕貴、伊藤明美、向畑孝成、松野研司、大野修、海洋生物からの栄養飢餓選択的な細胞死誘導物質の探索、日本化学会第 98 春季年会、2018 年 3 月 21 日、日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉県・船橋市)
- (2) 大野修、長屋裕貴、伊藤明美、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、海洋シアノバクテリア由来栄養飢餓選択的な細胞死誘導物質の単離と機能解析、第 64 回トキシシンポジウム、2017 年 7 月 11 日、有馬温泉・兵衛向陽閣 (兵庫県・神戸市)
- (3) 長屋裕貴、伊藤明美、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、大野修、カルキピロンによる栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解明、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 17 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川県・横浜市)
- (4) 大野修、伊藤明美、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、海洋生物由来ポリケチド化合物による栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解析、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 3 月 26 日、同志社大学京田辺キャンパス (京都市・京田辺市)
- (5) Osamu Ohno, Kyouhei Same, Chihiro Kudo, Shinpei Sumimoto, Toshiaki Teruya, Etsu Tashiro, Siro Simizu, Masaya Imoto, Kiyotake Suenaga, Isolation of tomuruline,

a novel thiazole containing polyketide with selective cytotoxicity under glucose-restricted conditions, Pacificchem 2015 conference, 2015. 12. 18. Hilton Hawaiian Village (Hawaii, USA)

- (6) Osamu Ohno, Ami Ito, Shuntaro Obata, Arihiro Iwasaki, Kiyotake Suenaga, Kenji Matsuno, Isolation and Functional Analysis of Novel Compounds with Selective Cytotoxicity under Glucose-restricted Conditions, The 14th International Symposium on Advanced Technology, 2015. 11. 1. Hachioji Campus, Kogakuin University (Hachioji, Japan)
- (7) 大野修、田代悦、清水史郎、井本正哉、末永聖武、新規チアゾール含有ポリケチドトムルリンによる栄養飢餓選択的な細胞死誘導機構の解析、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015 年 6 月 11 日、松山全日空ホテル (愛媛県・松山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：環状ペプチド化合物、キヌレニン産生阻害剤及び医薬組成物

発明者：松野研司、大野修

権利者：学校法人工学院大学

種類：特許

番号：KGP-00201

出願年月日：2017 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 修 (OHNO, Osamu)

工学院大学・先進工学部・准教授

研究者番号：20436992

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

末永 聖武 (SUENAGA, Kiyotake)

松野 研司 (MATSUNO, Kenji)