

令和元年6月18日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08512

研究課題名(和文) p53依存的細胞死を誘導するがん治療薬の開発と薬効評価

研究課題名(英文) Drug development of new bioactive compounds induced p53-dependent growth suppression

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・研究員

研究者番号：20442569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新しいがん治療薬の創製を目的としてp53を分子標的としてp53依存的細胞死を誘導する化合物をセル・ベースのスクリーニング系を行い、微生物代謝産物からキノフラシンとココキノンを見出した。本研究ではキノフラシンやココキノンを結合するp53依存的細胞死の誘導に関わる可能性を持つ因子を同定し、また担がんマウスを用いた実験の結果、前立腺癌に対してキノフラシンやココキノンは抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では我々の見出した新規化合物であるキノフラシンやココキノンは特異的な作用によってp53依存的細胞死を誘導することを示唆しており新しい作用機序を持つユニークな化合物として学術的に興味深い成果を得た。またキノフラシンやココキノンはin vitroだけでなくin vivoでも抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。このことはこれらの化合物が新しいがん治療薬の開発へとつながる可能性を有しており本研究成果は社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mdm2 binds to and ubiquitinates p53, a tumor suppressor, and induces degradation of p53 by 26S proteasome in tumor cells. Suppression of p53 degradation, however, can activate p53, and induce cell cycle arrest and apoptosis. To search for a new activator of the p53-dependent signaling pathway, we screened microbial metabolites using human glioblastoma LN2TA3 cells in which p53 expression can be regulated by tetracycline. As a result of screening, we identified quinofuracins A-E from *Staphylotrichum boninense* PF1444 and coccoquinones A and B from *Staphylotrichum coccosporum* PF1460, novel anthraquinone derivatives. Quinofuracins and coccoquinones induced p53-dependent cell death upregulated the expression of p53 and stimulated PARP degradation in p53-expressing LN2TA3 cells. Quinofuracin D specifically bound to several proteins in p53-expressing LN2TA3 cells. In a xenograft model, quinofuracins and coccoquinones suppressed prostate cancer tumor growth.

研究分野：分子生物学

キーワード：抗腫瘍効果 p53依存的細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の2人に1人ががんを患う近年、分子標的治療薬や抗体医薬によって治療成績が向上し、さらに画期的な抗体医薬であるPD-1抗体が承認され、様々ながんに対する治療薬としての期待が高まっている。しかしながら、転移性がん、臓器特異性、がん治療薬耐性や新薬に対する新たな副作用など問題も多く、また小児がんや希少がんへの抗がん剤は圧倒的に不足している。また、高齢者だけでなく労働世代の30～40代でのがんの発症率も上昇しており新しいがん治療薬の必要性が年々高まっている。

がん治療薬の新しい標的の1つとしてがん抑制遺伝子のp53が注目され、p53はがんの増殖を負に制御することが知られている。がん細胞を含め細胞が増殖する際にはp53はユビキチンE3リガーゼであるMdm2によってユビキチン化を受け、プロテアソームによって分解されることで細胞内のタンパク質量と機能を抑制されている。Mdm2はp53をユビキチン化する際にp53と結合していることが明らかとなっており、p53とMdm2の結合を阻害するMdm2インヒビターの臨床開発が進んでいる。しかしながらMdm2インヒビターは臨床試験においてp53が野生型であるにも関わらず治療効果がない患者があり、薬効の指標となるバイオマーカーの設定ができていない状況にある。

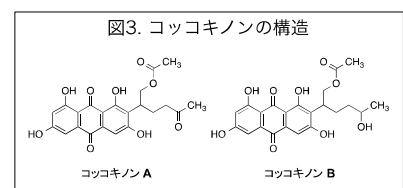
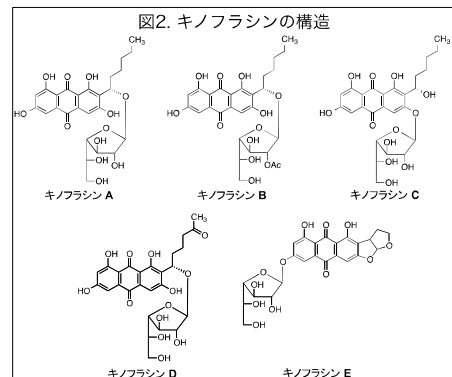
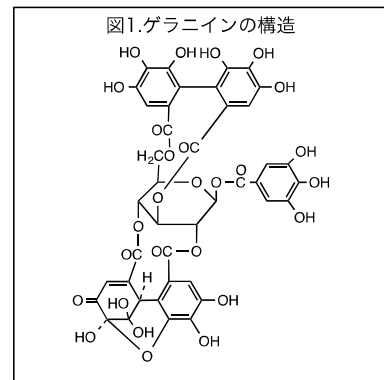
2. 研究の目的

我々は新しいがん治療薬の創製を目的としてp53を分子標的として微生物代謝産物をはじめとした天然物化合物ライブラリーを用いてセル・フリーのスクリーニングからp53-Mdm2の結合阻害化合物として生薬ゲンショウコの成分であるゲラニン(図1)を見出し、*in vivo*において骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。我々はさらにp53-Mdm2の結合阻害化合物だけではなくp53依存的細胞死を誘導する化合物を見出すために、細胞を用いたphenotypeスクリーニングを行った。その結果、カビ*staphylotrichum bononense* PF1444株、*staphylotrichum coccosporum* PF1460株からアンスラキノン骨格を持つ新規化合物であるキノフラシン(図2)、コッコキノン(図3)を見出した。

キノフラシン、コッコキノンはp53の発現量をテトラサイクリンによって制御するヒトグリオブラストーマLNZTA3細胞でp53依存的に細胞死を誘導するスクリーニングによってヒットした新規化合物である。キノフラシンやコッコキノン処理したLNZTA3細胞ではp53の蓄積が見られ、その転写活性によって下流の遺伝子の発現や、細胞死のシグナルが伝達されている。しかしながらそのメカニズムは明らかになっていない。リコンビナントタンパク質を使ったp53-Mdm2の結合実験から、キノフラシンやコッコキノンはp53-Mdm2の結合を阻害しないことを明らかにしている。p53はMdm2の他にもさまざまな遺伝子によって制御されていることからキノフラシンやコッコキノンによってp53依存的細胞死の標的分子を同定し、*in vivo*でも*in vitro*と同様にp53依存的細胞死を誘導できるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

p53依存的細胞死を誘導するキノフラシンやコッコキノンは同じアンスラキノン骨格を持っていることから同じ標的に作用することが考えられるので、見出した複数の化合物の中で微生物代謝産物の生産量が多く、p53依存的細胞死の誘導が強いキノフラシンAを用いて実験を行う。キノフラシンAはこれまでの研究からp53-Mdm2の結合は阻害しないことを明らかにしており、まずキノフラシンA処理した細胞においてMdm2以外でp53に作用する分子との相互作用やp53のタンパク質の修飾状態について特異的抗体を用いて解析する。それと同時に標的分子同定のために、東京大学の半田宏教授の開発したFG beads(多摩川精機株式会社)とキノフラシンAと架橋する。テトラサイクリンでp53の発現制御可能なヒトグリオブラストーマLNZTA3細胞を用いてp53が発現する細胞としない細胞からlysateを調製してキノフラシンAを架橋したビーズと混ぜてアフィニティークロマトグラフィーを行い、溶出画分を電気泳動後に銀染色を行う。銀染色の結果、p53が発現する細胞特異的に結合するタンパク質を切り出してLC-MSやTOF-MSで解析する。解析結果から目的の因子の絞り込みを行う。具体的には標的分子特異的なsiRNAによるノックダウンや過剰発現細胞株を作製して、*in vitro*の細胞増殖の変化やp53をはじめ細胞死の誘導経路に関わる因子の発現量や修飾変化を解析する。*In vitro*ではキノフラ



シンやココキノンのがん細胞の増殖を抑制したが *in vivo* でも腫瘍増殖を抑制できるか腫瘍を移植したヌードマウスにキノフラシンやココキノン投与して腫瘍大きさの変化を解析する。

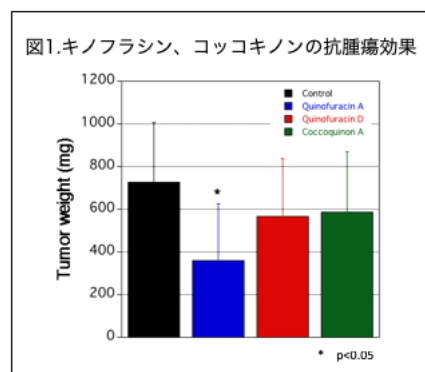
4. 研究成果

主な研究成果

アンスラキノン骨格を持つ抗がん剤として mitoxantrone が知られており DNA トポイソメラーゼ II を阻害することが明らかとなっている。同じく DNA トポイソメラーゼ II を阻害する抗がん剤としてアンスラサイクリン骨格を持つアドリアマイシンが知られているが、これらの化合物は DNA トポイソメラーゼを阻害することで DNA にダメージを与えて細胞死を誘導する。この DNA ダメージの目印としてヒストン H2AX がリン酸化されることが明らかとなっている。Mitoxantrone と同じ骨格を持つキノフラシンやココキノンで DNA ダメージが生じているか細胞にこれらの化合物を添加して H2AX のリン酸化を解析した結果、H2AX のリン酸化は化合物処理をしても変化しなかった。したがってキノフラシンやココキノンでの p53 依存的細胞死の誘導において DNA ダメージは生じていない可能性が示唆された。

キノフラシンやココキノンの標的を明らかにするためにまず化合物の FG ピーズへの架橋を検討した結果、キノフラシン D が適切であった。次にテトラサイクリンによって p53 の発現量を制御するヒトグリオブラストーマ LN2TA 3 細胞を用いて p53 の発現する細胞としない細胞から lysate を調製して FG ピーズに架橋したキノフラシン D と混合した後にプルダウン、SDS-PAGE、銀染色を行った結果、p53 が発現した lysate 特異的に結合するバンドが明らかになった。これらのバンドを切り出して LC-MS で解析して複数の因子を見出した。

in vivo におけるキノフラシンやココキノンの腫瘍抑制効果を明らかにするために担がんマウスを使った動物実験を行った。まず、動物実験に必要な大量のキノフラシンやココキノンを得るために産生菌の培養条件を検討した結果、固体培養によってもっとも化合物の産生量が高いことが明らかとなった。この条件で菌の大量培養を行い動物実験に必要なキノフラシンやココキノンを得た。マウスでの化合物投与実験を行うために化合物のマウスでの急性毒性試験を行なった結果、キノフラシン、ココキノンともに尾静脈からの投与で 50 mg/kg まで毒性を示さないことが明らかとなった。マウスに移植するがん細胞株についてキノフラシンやココキノンに対する感受性を *in vitro* で調べた結果、野生型 p53 遺伝子を持つがん細胞株で大腸癌株 HCT-116 と前立腺癌株 LNCAP-CR が適していることが明らかとなった。これらのがん細胞株をマウスの鼠径部に移植した後にキノフラシンやココキノン尾静脈から投与した結果、投与期間中のマウスの体重減少等毒性は見られず、前立腺癌株 LNCAP-CR に対してキノフラシンやココキノンは抗腫瘍効果を示した。特にキノフラシン A は強い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった (図 1)。



得られた成果の国内外の位置付けとインパクト

p53 依存的細胞死を誘導する化合物として見出したキノフラシンやココキノンはアンスラキノン骨格を持つことから当初、同じ骨格を持つ mitoxantrone と同じトポイソメラーゼ II の阻害による DNA ダメージが増殖抑制につながっていると考えられていたが細胞内 DNA ダメージの指標となるヒストン H2AX のリン酸化がキノフラシンやココキノン添加した細胞では変化しないことから他の作用によるがん細胞の増殖抑制効果であることが示された。このことはキノフラシンやココキノンが p53 依存的細胞死の経路において新しい標的に作用していることを示唆している。

キノフラシンやココキノンはセル・ベースのアッセイ系で p53 依存的細胞死を誘導する新規化合物として見出したが *in vivo* においても前立腺癌細胞株 LNCaP に対して強い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。 *In vitro* で活性を持つ化合物であっても *in vivo* において実験動物での代謝や毒性等によってほとんどの化合物が効果を示さない中、我々の見出した化合物はマウスに対して毒性を示さない安全で強い抗腫瘍効果を持つ化合物であることが明らかとなった。

得られた成果から、我々が見出したキノフラシンやココキノンは p53 依存的細胞死の経路に作用し、 *in vivo* でも強い抗腫瘍効果を示す国内外においてこれまでにない化合物ということが明らかとなった。

今後の展望

キノフラシンやココキノンは *in vitro* では p53 依存的細胞死を誘導するが *in vivo* では野生型 p53 を持つ前立腺癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示した。このことから p53 依存的細胞死の経路に関わる特定の因子が *in vivo* での抗腫瘍効果に重要である可能性が高い。我々がキノフラシンやココキノンと特異的に結合する因子として同定した中からこれらの因子を明らかに

することでバイオマーカーとしての可能性を検討すると共により抗腫瘍効果の高い誘導体の開発へとつなげていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 10 件)

発表者名 Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Masahide Amemiya, Kengo Sumiyoshi, Takumi Watanabe, Manabu Kawada, Masakatsu Shibasaki

発表表題 Coccoquinones, new anthraquinone derivatives, suppress p53-dependent growth of cancer cells

学会名 30th EORTC-NCI-AACR Molecular Targets and Cancer Therapeutics Symposium

発表年 2018 年

発表者名 Daisuke Tatsuda, Junjiro Yoshida, Manabu Kawada

発表表題 Analysis of the mechanism of kinase inhibitors resistance by Pancreatic tumor-stromal cell interactions

学会名 第 77 回日本癌学会学術総会

発表年 2018 年

発表者名 立田大輔、吉田潤次郎、川田 学

発表表題 すい臓がん細胞と間質細胞の共培養によるキナーゼ阻害剤抵抗性の解析

学会名 第 22 回がん分子標的治療学会学術集会

発表年 2018 年

発表者名 Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Takao Kunisada, Takumi Watanabe, Manabu Kawada, Masakatsu Shibasaki

発表表題 Novel compounds suppressing p53-dependent growth of tumor cells

学会名 AACR-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics

発表年 2017 年

発表者名 Daisuke Tatsuda, Junjiro Yoshida, Tomokazu Ohishi, Manabu Kawada

発表表題 Effect of tumor-stromal cell interactions on drug sensitivity of pancreatic cancer cells

学会名 第 76 回日本癌学会学術総会

発表年 2017 年

発表者名 立田大輔、大庭俊一、川田 学、百瀬 功

発表表題 骨肉腫に対するゲラニンの抗腫瘍効果

学会名 第 1 回シーズ・ニーズ (SN) ワークショップ

発表年 2017 年

発表者名 立田大輔、吉田潤次郎、大石智一、川田 学

発表表題 すい臓がん細胞の薬剤感受性に与える間質細胞の影響

学会名 第 21 回がん分子標的治療学会学術集会

発表年 2017 年

発表者名 Daisuke Tatsuda, Isao Momose, Shun-ichi Ohba, Yoji Umezawa, Manabu Kawada, Masakatsu Shibasaki

発表表題 Inhibition of osteosarcoma cell growth by geraniin in vivo

学会名 28th EORTC-NCI-AACR Molecular Targets and Cancer Therapeutics Symposium

発表年 2016 年

発表者名 Daisuke Tatsuda, Manabu Kawada, Isao Momose

発表表題 p53-dependent growth suppression of cancer cells by coccoquinones

学会名 第 75 回日本癌学会学術総会

発表年 2016 年

発表者名 立田大輔、百瀬 功、川田 学、柴崎正勝

発表表題 p53 依存的な細胞増殖を阻害する新規アンスラキノ化合物

学会名 第 20 回がん分子標的治療学会学術集会

発表年 2016 年

〔産業財産権〕

取得状況 (計 3 件)

名称：抗がん剤及び併用抗がん剤

発明者：立田大輔、百瀬功、北山隆

権利者：公益財団法人 微生物化学研究会

種類：特許

番号：TW 1622397

取得年：2018 年 5 月 1 日

国内外の別：国外 (台湾)

名称：抗がん剤及び併用抗がん剤

発明者：立田大輔、百瀬功、北山隆
権利者：公益財団法人 微生物化学研究会
種類：特許
番号：特許 6253591
取得年：2017年12月27日
国内外の別：国内

名称：新規化合物キノフラシン類、その製造方法、及びその用途、並びに新規微生物
発明者：立田大輔、百瀬功、染野哲也、國定孝夫
権利者：公益財団法人 微生物化学研究会
種類：特許
番号：特許 6130248
取得年：2017年5月17日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
公益財団法人微生物化学研究所 <http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：百瀬 功
ローマ字氏名：(MOMOSE Isao)
研究協力者氏名：川田 学
ローマ字氏名：(KAWADA Manabu)
研究協力者氏名：大庭俊一
ローマ字氏名：(OHBA Shunichi)
研究協力者氏名：吉田潤次郎
ローマ字氏名：(YOSHIDA Junjiro)
研究協力者氏名：大石智一
ローマ字氏名：(OHISHI Tomokazu)
研究協力者氏名：澤 竜一
ローマ字氏名：(SAWA Ryuichi)
研究協力者氏名：高橋裕子
ローマ字氏名：(TAKAHASHI Yuko)