

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32613

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05341

研究課題名(和文) 海洋生物由来がん細胞リプログラミング機構調節物質の探索

研究課題名(英文) Search for marine organisms-derived compounds that regulate the reprogramming mechanism of cancer cells

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 沖縄県石垣市産シアノバクテリア *Okeania* sp. より単離した新規キヌレニン産生阻害剤 KNP-1 の各種 NMR スペクトルを解析し、平面構造を決定した。また、KNP-1 を構成する各アミノ酸と valic acid、アミノ酸を単離し、Marfey 法とキラルカラムによる分析により、9 か所の不斉点の立体化学を決定し、KNP-1 の構造を解明した。

一方、高細胞密度培養条件のがん細胞に選択的な細胞死を誘導する化合物を探索し、千葉県勝浦市産シアノバクテリアより panaxcerol B を単離した。panaxcerol B はグルコース飢餓条件のがん細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、栄養代謝のリプログラミングにより正常細胞とは異なるエネルギー獲得機構を有している。このがん細胞による栄養代謝のリプログラミングは、がん細胞の生存、増殖、転移等を可能にしているため、新たな抗がん剤開発の標的と成り得る。しかしながら、がん細胞でなぜこのようなエネルギー代謝が行われているのかは解明されておらず、更なる研究が必要とされている。本研究では、がん細胞のリプログラミング機構を調節する薬剤を獲得し、作用機構の解明に取り組むことで、不明な点の多いがん細胞のリプログラミング機構の解明に繋がる治験が得られる点に学術的意義や社会的意義があると言える。

研究成果の概要(英文)： The planar structure of the novel kynurenine production inhibitor KNP-1, isolated from the cyanobacterium *Okeania* sp. collected in Ishigaki City, Okinawa Prefecture, was determined based on the analyses of NMR spectra. Next, the amino acids, the valic acid, and the amino acid constituting KNP-1 were isolated. The stereochemistry of 9 asymmetric points in those structures was determined by Marfey's method and by chiral column analysis, and the whole structure of KNP-1 was determined.

On the other hand, we searched for a compound that induces selective cell death in cancer cells under high cell density conditions, and isolated panaxcerol B from cyanobacterium collected in Katsuura City, Chiba Prefecture. Panaxcerol B was found to selectively induce apoptosis in cancer cells under glucose starvation conditions.

研究分野：生物分子科学

キーワード：リプログラミング キヌレニン シアノバクテリア KNP-1 アミノ酸 栄養飢餓 グルタミン

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、栄養代謝のリプログラミングにより正常細胞とは異なり、解糖系に依存したエネルギー獲得機構を有している。また、がん細胞はアミノ酸代謝にもリプログラミングを起こし、グルタミン、セリン、グリシン、トリプトファンをエネルギー源として活用している。さらに、がん細胞はリプログラミングによって生産したアミノ酸の代謝物を利用して免疫細胞からの攻撃を回避している。これらのがん細胞による栄養代謝のリプログラミングは、がん細胞の生存、増殖、転移等を可能にしているため、新たな抗がん剤開発の標的と成り得る。しかしながら、がん細胞でなぜこのようなエネルギー代謝が行われているのかは解明されておらず、更なる研究が必要とされている。一方、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。申請者は海洋生物から有用性が期待される新規化合物の獲得に取り組み、応用に繋がる研究を進めてきた。そこで、本研究では多様な構造・機能を有する生物活性物質を供給する海洋生物から、がん細胞における栄養代謝のリプログラミング機構の解析に役立ち、新たな医薬シーズに成り得る化合物の獲得を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞のリプログラミング機構を調節する薬剤を探索し、作用機構の解明に取り組むことで、不明な点の多いがん細胞のリプログラミング機構の解明に繋がる成果を得ることを目的とした。具体的には、多様な構造・機能を有する生物活性物質を供給する海洋生物から、[1] がん細胞におけるキヌレニン産生阻害による免疫寛容抑制剤と、[2] がん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する物質を獲得し、がん細胞における栄養代謝のリプログラミング機構の解明に役立て、新たな医薬シーズとしての応用に繋がる成果を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、がん細胞のリプログラミング機構に関わる下記の2つの課題を設定し、それぞれ活性物質の探索とその機能解析を試みた。

[1] がん細胞におけるキヌレニン産生阻害による免疫寛容抑制剤の構造解明

がん細胞はアミノ酸代謝のリプログラミングによりトリプトファンの代謝物であるキヌレニンを分泌する。キヌレニンは、T細胞やNK細胞等の免疫細胞の不活性化すなわち「免疫寛容」を引き起こすことが報告されている。したがって、キヌレニン産生を抑制する薬剤は、がん細胞の免疫寛容機構を解除する新たな抗がん剤としての応用が期待される。本課題では独自に採集した海洋生物より見出した、がん細胞におけるキヌレニン産生阻害物質の構造解明を目指した。具体的には、沖縄県石垣島産海洋シアノバクテリア *Okeania* sp. の MeOH 抽出物より単離した新規キヌレニン産生阻害物質である KNP-1 の構造解明を試みた。KNP-1 はペプチド性化合物であり平面構造が未決定であったとともに、分子内に9か所存在する不斉点の立体化学が不明であった。そこで、KNP-1 の NMR 解析による平面構造を確定するとともに、酸加水分解により各アミノ酸を確保しアミノ酸分析による絶対構造の決定を試みた。

[2] がん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する物質の探索と機能解明

がん細胞は正常細胞とは異なり、リプログラミングにより低栄養環境や低酸素環境等の特殊環境に適応する能力を有する。その際、グルタミン等のアミノ酸をエネルギー源として利用することが報告されている。このような、がん細胞に特有なエネルギー代謝のリプログラミングを標的とする薬剤は、新たな抗がん剤としての応用が期待される。このことを踏まえ、本課題では海洋生物よりがん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する化合物を探索した。具体的には、下記の研究に着手した。

低栄養状態のがん細胞に選択的な細胞死誘導物質の探索と機能解明

がん細胞としてヒト子宮頸がん細胞株 HeLa を用い、低密度及び高密度条件でそれぞれ培養し、低栄養状態にある高密度条件の細胞に選択的に細胞死を誘導する物質を海洋生物から探索した。本研究により強力な低栄養環境選択的薬剤を獲得し、作用機構の解析に取り組んだ。

がん細胞特有のアミノ酸代謝経路を標的とした細胞増殖阻害剤の探索と機能解明

がん細胞特有のアミノ酸代謝におけるエネルギー源としてのグルタミンに着目し、グルタミン代謝を抑制する物質を探索した。グルタミン含有培地 (2 mM) とグルタミン不含培地で HeLa 細胞を培養し、グルタミン含有条件選択的に増殖を阻害する物質を海洋生物より探索した。

4. 研究成果

多様な構造・機能を有する生物活性物質を供給する海洋生物から、がん細胞のリプログラミング機構に着目し、[1] がん細胞におけるキヌレニン産生阻害による免疫寛容抑制剤と、[2]

がん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する物質の獲得を試みた。

[1] がん細胞におけるキヌレニン産生阻害による免疫寛容抑制剤

沖縄県石垣市産シアノバクテリア *Okeania* sp. の MeOH 抽出物より、キヌレニン産生阻害活性を有する化合物として見出した新規環状ペプチド KNP-1 の量的確保を試み、4.62 kg のシアノバクテリアから 41.6 mg の KNP-1 を単離した。単離した KNP-1 を用い、KNP-1 の各種 NMR スペクトルを解析し、平面構造を決定した。また、KNP-1 の酸加水分解により構成する各アミノ酸を単離し、Marfey 法とキラルカラムによる分析により立体構造が不明であった全 4 個のアミノ酸の絶対配置を決定した。また、構造内に含まれる valic acid の絶対配置についても、キラルカラムによる分析により決定した。続いて、未決定であったβアミノ酸部位の 2 か所の不斉点の立体化学の決定を試みた。同様のβアミノ酸部位を含有する既知化合物で取られた手法を参照し、まず、KNP-1 を水素添加しβアミノ酸部位に含まれるアルキンを還元した。水素添加した KNP-1 を酸加水分解し、末端アルキンがアルカンとなったβアミノ酸を得た。次に、本βアミノ酸の化学合成を試みた。過去の報告を参照し、市販の *trans*-methyl 2-octenoate から全 4 工程で所望のβアミノ酸を合成した。なお、2 か所の不斉点の立体化学が異なる 2 種類のジアステレオマーをそれぞれ合成した。KNP-1 由来のβアミノ酸と合成した 2 種類のジアステレオマーを Marfey 誘導体化し、それらの HPLC における保持時間の比較により、2 か所の不斉点の立体化学を決定した。これらの結果より、KNP-1 の 9 か所の不斉点の全立体化学を決定でき、KNP-1 の構造を解明した(図 1)。

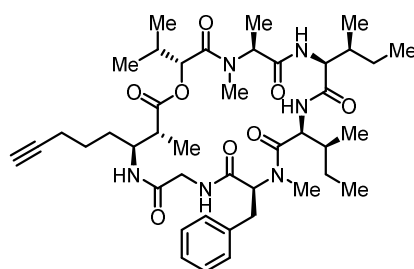


図 1. KNP-1

[2] がん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する物質

栄養飢餓状態を模した高細胞密度培養条件のがん細胞に対し、選択的な細胞死誘導活性を示す化合物を海洋生物より探索し、千葉県勝浦市産シアノバクテリアの MeOH 抽出物に活性を見出した。各種カラムクロマトグラフィーにより活性物質を単離し、各種スペクトル解析により活性物質が脂肪酸グリセリドの配糖体 panaxcerol B (図 2) であることを見出した。panaxcerol B は解糖系阻害条件およびグルコース飢餓条件のがん細胞に対して選択的に細胞死を誘導した。さらに、panaxcerol B は栄養飢餓条件のがん細胞に対して選択的に選択的にアポトーシスを誘導することを見出した。また、同活性を有する天然由来サンプルを探索し、千葉県館山市産シアノバクテリアの MeOH 抽出物に活性を見出した。各種カラムクロマトグラフィーにより活性物質を単離し、各種スペクトル解析により活性物質が既知の脂肪酸誘導体であることを見出した。また、同一サンプルより、強力な活性を示す他の化合物も単離した。

同様に、がん細胞特有のアミノ酸代謝におけるエネルギー源としてのグルタミンに着目し、グルタミン含有条件選択的ながん細胞の増殖を阻害する物質を海洋生物より探索し、沖縄県石垣市産の種未同定シアノバクテリアの MeOH 抽出物に活性を見出した。本シアノバクテリアの MeOH 抽出物を、分液、各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、活性物質を単離した。単離した化合物の ESIMS と ¹H NMR のスペクトルを解析し、本化合物が新規のペプチド性化合物であることを見出した。また、化合物ライブラリーからグルタミン含有条件選択的ながん細胞の増殖を阻害する物質の探索を行い、複数の既知化合物に活性を見出した。更に、それらの化合物のグルタミナーゼに対する阻害活性を評価したところ阻害活性を示さないことを見出した。

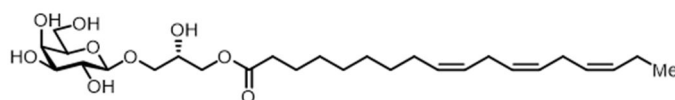


図 2. Panaxcerol B

研究期間全体を通じて、[1]がん細胞におけるキヌレニン産生阻害による新たな免疫寛容抑制剤候補物質の獲得と構造解明を達成し、[2]がん細胞に特有な栄養代謝機構を阻害する有用物質の獲得と、構造・機能解明に繋がる重要な成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Osamu Ohno, Keigo Sato, Ryo Honma, Ruri Chiba, Kenji Matsuno	4. 巻 85
2. 論文標題 Anti-apoptotic activity of methyl (3R,4E,6Z,15E)-3-hydroxyoctadecatrienoate in human cervical carcinoma HeLa cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 228-232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbba006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osamu Ohno, Takuro Terasaki, Takuya Sano, Yuki Hitomi, Junichiro Miyamoto, Kenji Matsuno,	4. 巻 30
2. 論文標題 Inhibitory effects of biseokeaniamide A against lipopolysaccharide-induced signal transduction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Keitaro Iwasaki, Arihiro Iwasaki, Shimpei Sumimoto, Takuya Sano, Yuki Hitomi, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga	4. 巻 59
2. 論文標題 Croissamide, a proline-rich cyclic peptide with an N-prenylated tryptophan from a marine cyanobacterium <i>Symploca</i> sp.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 3806-3809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2018.09.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimpei Sumimoto, Masayuki Kobayashi, Rio Sato, Seiichi Shinomiya, Arihiro Iwasaki, Shoichiro Suda, Toshiaki Teruya, Toshiyasu Inuzuka, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga	4. 巻 21
2. 論文標題 Minnamide A, a Linear Lipopeptide from the Marine Cyanobacterium <i>Okeania hirsuta</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1187-1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b00135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Prapaipit Suwitchayanon, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Hisashi Kato-Noguchi	4. 巻 41
2. 論文標題 Phytotoxic property of Piper retrofractum fruit extracts and compounds against the germination and seedling growth of weeds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Physiologiae Plantarum	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11738-019-2824-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ying Huang, Osamu Ohno, Kenji Miyamoto	4. 巻 83
2. 論文標題 PFG acted as an inducer of premature senescence in TIG-1 normal diploid fibroblast and an inhibitor of mitosis in the HeLa cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1585744	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大野修、佐々木智未、人見悠毅、中風奈々恵、浅井章良、滝川修、松野研司
2. 発表標題 海洋シアノバクテリア由来新規キヌレニン産生阻害剤の構造解析および生物活性
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田翔太、水本友紀子、安達優輝、浅井章良、滝川修、齋藤隆夫、大野修、松野研司
2. 発表標題 キヌレニン産生抑制剤の探索
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本順一郎、佐野拓哉、松野研司、大野修
2. 発表標題 沖縄県産ソフトコーラルに由来するリボポリサッカライド機能阻害剤の単離
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 萩原佳輔、木村将大、小山文隆、加藤学、景山心悟、生田智樹、松野研司、大野修
2. 発表標題 キイロスズメバチ由来キチナーゼ阻害物質の単離と機能解析
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野修
2. 発表標題 海洋生物由来細胞応答制御物質の探索と機能解明
3. 学会等名 新規素材探索研究会第18回セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田翔太、鈴木健二、水本友紀子、浅井章良、滝川修、齋藤隆夫、大野修、松野研司
2. 発表標題 化合物ライブラリーからのキヌレニン産生抑制剤の探索
3. 学会等名 新規素材探索研究会第18回セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田翔太、鈴木健二、水本友紀子、浅井章良、滝川修、齋藤隆夫、大野修、松野研司
2. 発表標題 キヌレニン産生抑制剤の探索
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 人見悠毅、佐々木智未、中風奈々恵、浅井章良、滝川修、大野修、松野研司
2. 発表標題 シアノバクテリア由来新規キヌレニン産生阻害剤の構造解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本順一郎、佐野拓哉、松野研司、大野修
2. 発表標題 沖縄県産ウミキノコからのlipopolysaccharide機能阻害物質の単離
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野拓哉、人見悠毅、寺崎拓郎、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来新規lipopolysaccharide機能阻害剤の探索
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田翔太、鈴木健二、水本友紀子、浅井章良、滝川修、齋藤隆夫、大野修、松野研司
2. 発表標題 キヌレニン産生抑制剤の探索
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長屋裕貴、山田亮一、向畑宥成、松野研司、大野修
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野拓哉、人見悠毅、寺崎拓郎、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来新規lipopolysaccharide機能阻害剤の探索
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 人見悠毅、佐々木智未、中風奈々恵、浅井章良、滝川修、大野修、松野研司
2. 発表標題 海洋シアノバクテリア由来新規キヌレニン産生阻害剤の構造解析および生物活性
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野拓哉、人見悠毅、宮本順一郎、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来 Lipopolysaccharide 機能阻害剤の探索研究
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 人見悠毅、佐々木智未、中風奈々恵、浅井章良、滝川修、大野修、松野研司
2. 発表標題 海洋シアノバクテリア由来新規キヌレニン産生阻害剤の構造解析および生物活性
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 人見悠毅、寺崎拓郎、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来リポポリサッカライド (LPS) 機能調節物質の探索
3. 学会等名 新規素材探索研究会第17回セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤慶吾、本間椋、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来小胞体ストレス誘導性細胞死阻害剤の探索
3. 学会等名 新規素材探索研究会第17回セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野修、佐々木智未、浅井章良、滝川修、松野研司
2. 発表標題 海洋生物由来新規キヌレニン産生抑制物質の探索
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐野拓哉、寺崎拓郎、岩崎有紘、末永聖武、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来LPS誘導性NO産生阻害物質の探索
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤慶吾、本間暎、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来の小胞体ストレス誘導性細胞死阻害剤の探索
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野修
2. 発表標題 海洋生物由来細胞応答制御物質の探索と機能解析
3. 学会等名 第五回天然物化学研究会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Ohno, Yuki Nagaya, Ami Ito, Arihiro Iwasaki, Kiyotake Suenaga, Kenji Matsuno
2. 発表標題 Isolation and Functional Analysis of Novel Compounds with Selective Cytotoxicity under Glucose-restricted Conditions
3. 学会等名 ICPAC Langkawi 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長屋裕貴、向畑若成、松野研司、大野修
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤慶吾、本間椋、松野研司、大野修
2. 発表標題 海洋生物由来小胞体ストレス誘導性アポトーシス阻害剤の探索
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 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 大野修、松野研司	権利者 学校法人工学院 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-140431,	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 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 大野修、松野研司	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、KGP-00261	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松野 研司 (Matsuno Kenji) (50433214)	工学院大学・先進工学部・教授 (32613)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------