

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05363

研究課題名(和文) 海洋天然物を基軸とするがん細胞増殖メカニズムの解明と創薬への展開

研究課題名(英文) Mechanistic studies of tumor cell growth using marine natural product and its application for anti-tumor drug discovery

研究代表者

古徳 直之 (Kotoku, Naoyuki)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号：20362618

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)：海洋天然物arenastatin Aの標的タンパク質の一つであるEXD3の機能阻害が、ガン細胞の増殖のみを阻害できることに着目し、本化合物由来のケミカルプローブを用いた選択的ラベル化によってEXD3の詳細な機能評価が可能になると考え、目的の機能を有するプローブの設計に向けた誘導体合成と構造活性相関研究を行なった。その結果、EXD3との結合に關与する部位の特定および細胞毒性発現に必要な立体配座の解明に成功し、有効なプローブの設計につながる重要な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の抗ガン剤の多くは正常細胞の増殖にも影響を与えるため、重篤な副作用を引き起こす原因となっていることから、ガン細胞選択的な薬効を示す治療薬の開発は急務である。本研究結果をさらに発展させることで、新たな作用機序を有する、ガン細胞選択的な増殖抑制効果を示す治療薬の創出につながることを期待される。また、EXD3に関する研究から、ガン細胞と正常細胞の増殖メカニズムの相違点を解明できれば、さらに有効な治療法の確立へと発展する可能性があるため、本研究のさらなる推進は学術的、社会的意義の大きいものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have previously disclosed that the inhibition of EXD3, one of the target proteins of arenastatin A, leads to the selective growth inhibition against tumor cells. To investigate the precise role of EXD3 in the tumor cells, selective intracellular labeling of EXD3 using photoaffinity probe derived from arenastatin A is needed, and various analogues of arenastatin A were prepared for analyzing its structure-activity relationship. Through cytotoxic evaluation against some cell lines, the essential substructure for binding to EXD3 and the effective conformation for exhibiting cytotoxicity were disclosed. These findings might be useful for designing the effective affinity probe molecule to analyze the role of EXD3 in the future.

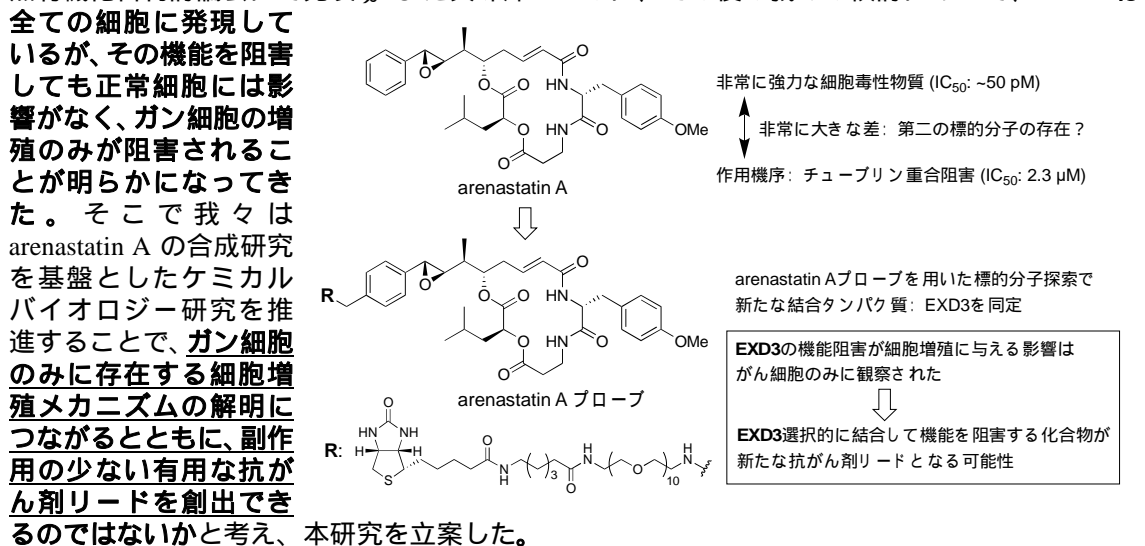
研究分野：天然物有機化学

キーワード：海洋天然物 ガン細胞増殖メカニズム 作用機序解明 細胞内ラベル化 抗ガン剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Arenastatin A は沖縄産海綿より見出された環状デプシペプチドで、ガン細胞に対して極めて強力な細胞毒性(IC_{50} : ~50 pM)を示すことが知られている (*Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7969)。その作用機序はこれまで、チューブリンの重合阻害だとされてきたが、重合阻害活性(IC_{50} : 2.3 μ M)と細胞毒性に大きな差があることから、細胞毒性に関わる別の標的分子の存在が示唆されていた (*Chem.-Biol. Interact.* **1996**, 102, 183)。最近我々は、arenastatin A 由来のアフィニティプローブ分子を合成し、これを用いた標的探索研究を改めて検討した結果、チューブリン以外の第二の標的分子として、これまでその機能等に関する研究がほとんどなされておらず、結晶構造も未知のタンパク質、exonuclease mut-7 homolog, isoform 5 (EXD3)を見出した (論文投稿準備中、第 57 回天然有機化合物討論会にて発表)。また興味深いことに、その後の我々の検討において、**EXD3 は全ての細胞に発現しているが、その機能を阻害しても正常細胞には影響がなく、ガン細胞の増殖のみが阻害されることが明らかになってきた。**そこで我々は arenastatin A の合成研究を基盤としたケミカルバイオロジー研究を推進することで、**ガン細胞のみに存在する細胞増殖メカニズムの解明につながる**とともに、**副作用の少ない有用な抗がん剤リードを創出できるのではないかと考え、本研究を立案した。**



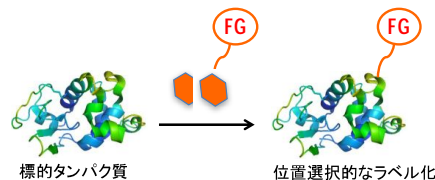
2. 研究の目的

本研究は、強力な細胞毒性を有する海洋天然物 arenastatin A の作用メカニズムについて我々が最近見いだした新たな知見をもとに、本化合物を基盤とした創薬化学研究を通して、**正常組織に影響を与えず、ガン組織のみを特異的に攻撃できる、新たな抗ガン剤リードの創製**を最終目標とするものである。その達成に向け、本化合物の結合タンパク質として新たに見いだした EXD3 の新規薬剤標的としての可能性についても検証することを目的として、arenastatin A を合成的に改変した分子プローブを利用したケミカルバイオロジー研究を展開することで、これまで全く検討されていない **EXD3 の機能解明、特にがん細胞の増殖への関与について詳細な解明を目指す。**

3. 研究の方法

上記目的の達成に向け、arenastatin A 由来のケミカルプローブを合成して EXD3 選択的なラベル化を行い、その細胞内局在や機能評価について検討することとした。上述の通り、arenastatin A はチューブリンと EXD3 の双方と結合することが分かっているが、本研究目的を達成するためには、この 2 種のタンパク質を識別して EXD3 特異的にラベル化できなければならず、精密に設計したケミカルプローブを用いた、ピンポイントかつ高効率なラベル化手法の確立が不可欠である。これを解決する手段として、我々は、『**修飾基内包型プローブ**』というコンセプトの適用を計画した。以前に我々は、新規抗がん剤シーズ biakamide 類 (*J. Org. Chem.* **2017**, 82, 1705) の細胞内動態研究において、biakamide 類の構造活性相関研究を参考にして設計・合成したフォトアフィニティプローブを用いることで、その細胞内局在を明らかにしているが、同様の手法を本研究に適用することで、EXD3 の機能解明が可能であると考えた。

すなわち、すでに確立している全合成法 (*Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 7147) を活用して、分子内の様々な位置に光反応性基およびアルキンタグを導入した化合物の合成と活性評価から、EXD3 選択的に共有結合を形成できるフォトアフィニティプローブを創出し、これを利用して EXD3 を細胞内で蛍光標識することで、その細胞内局在を解析する。過去の構造活性相関研究 (*J. Med. Chem.* **2004**, 47, 3697, etc.) およびチューブリンの結晶構造とのドッキングスタディ (*Biochemistry*, **2001**, 40, 13510) を考慮して設計したプロ



光反応性基を有するアナログを合成して細胞内に導入
EXD3 を選択的にラベル化できるプローブの創出
蛍光標識して細胞内局在の観察を目指す

ープを用いることで、EXD3 を選択的にラベル化できる可能性が高いと考えられる。

本計画を進めるにあたり、まず2種の標的タンパク質それぞれと近接して相互作用する部位の特定と、光反応性基の適切な導入部位を探るために、光反応性基に相当するサイズの官能基を導入した誘導体の合成と機能評価を行なった。機能評価については、ガン細胞と正常細胞それぞれに対する増殖阻害試験を行い、細胞間で選択性が発現されるものが、2種の標的タンパク質を区別して結合し、ラベル化できるケミカルプローブになりうると考えた。

4. 研究成果

上記計画に従い、まず各種誘導体の合成と機能評価を検討した。右図に示すように、過去の構造活性相関研究における知見が少ない部位を中心に、置換基の構造変換あるいは追加を行うこととし、多様な誘導体を効率よく合成できるよう、合成の最終盤で変換できるようなルートを構築し、合成した化合物について、咽頭上皮ガン細胞 KB3-1 および皮膚線維芽細胞 NHDF に対する増殖阻害試験を行った。

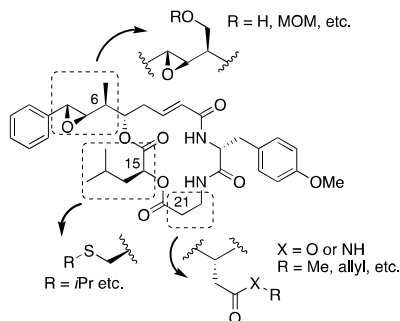
その結果、置換基の立体的高さや極性の変更により、活性に大きな影響を及ぼすことが明らかになったが、多くの場合において、細胞間での増殖阻害活性に選択性が発現されることはなく、両者に対して同様の活性の低下が見られた。例えば、6位メチル基を官能基化した誘導体では、高高さの増大に伴って細胞毒性が減弱する結果となった。共同研究によってチューブリンとのドッキングスタディを行った結果、6位メチル基がチューブリン表面の小さな疎水性ポケットにはまり込む形で結合していることが示唆される結果となり、この部位の官能基化による細胞毒性の減弱と良い一致を示した。また、15位イソブチル基についても、チオラートの付加により最終段階で種々の誘導体へと変換できる方法論を確立し、数種の化合物について細胞毒性評価を行なったが、細胞間での選択性を示す化合物の取得には至らなかった。

一方、21位に置換基を導入した誘導体において、一部の化合物では天然物と比較して分子全体の立体構造が変化していることが NMR スペクトルから明らかになった。それら誘導体は細胞毒性が完全に消失していたことから、化合物の立体構造が標的タンパク質との結合に大きな影響を与えることが示されたものと見られ、今後の誘導体設計および合成において重要な指針の一つになると考えている。

また、NHDF に対する細胞毒性は天然物と同等であるのに対し、KB3-1 細胞に対する細胞毒性のみが減弱した誘導体の取得にも成功した。上述の通り、EXD3 の機能阻害はガン細胞の増殖のみに関わっていることから、この結果は、arenastatin A がこの部位および周辺を介して EXD3 と結合していることを強く示唆している。さらに検討を重ね、置換基のサイズ許容性などを確認した上で、適切な光反応性基を導入したフォトアフィニティープローブを合成し、EXD3 の選択的ラベル化および細胞内局在解析を進めていく予定である。

以上のように本研究では、arenastatin A の新規誘導体の合成および活性評価によって、当初計画していた EXD3 の細胞内ラベル化までには至らなかったものの、ラベル化に用いるプローブの設計につながる重要な指針を得ることができた。今後、この知見をもとに、ガン細胞選択的な増殖阻害剤の創出についても挑戦していきたい。

本研究に関連して、修飾基内包型プローブを用いたラベル化研究の一環で行った研究、すなわち海洋天然物 biakamide 類の構造活性相関研究ならびに選択的セロトニン再取り込み阻害剤エスタロプラム由来のアルキン修飾プローブを用いた脳内局在イメージング研究についても、本研究のさらなる発展につながる知見が得られたため、本研究の研究成果とした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masato Tanuma, Atsushi Kasai, Kazuki Bando, Naoyuki Kotoku, Kazuo Harada, Masafumi Minoshima, Kosuke Higashino, Atsushi Kimishima, Masayoshi Arai, Yukio Ago, Kaoru Seiriki, Kazuya Kikuchi, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Hitoshi Hashimoto	4. 巻 5
2. 論文標題 Direct visualization of an antidepressant analog using surface-enhanced Raman scattering in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e133348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.133348	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 Ryosuke Ishida, Hirokazu Matsumoto, Sayaka Ichii, Motomasa Kobayashi, Masayoshi Arai, Naoyuki Kotoku	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure-Activity Relationship of Biakamide, Selective Growth Inhibitors under Nutrient-Starved Condition from Marine Sponge	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical & Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 210-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c18-00587	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tanuma, M.; Kasai, A.; Bando, K.; Kotoku, N.; Higashino, K.; Ago, Y.; Kawata, S.; Fujita, K.; Hashimoto, H.
2. 発表標題 In vivo imaging of alkynylated S-citalopram using surface-enhanced Raman scattering
3. 学会等名 SfN Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujimoto, K.; Kishimoto, M.; Nakamura, S.; Nakanishi, I.; Kotoku, N.
2. 発表標題 Synthesis and Evaluation of Novel Analogs of Arenastatin A
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本晃規、岸本真歩、古徳直之
2. 発表標題 Arenastatin Aの新規誘導体の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Hatta, M. Kishimoto, Y. Mihara, N. Kotoku.
2. 発表標題 Synthesis and biological evaluation of novel analogs of arenastatin A by late-stage functionalization
3. 学会等名 AIMECS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

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