

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06718

研究課題名(和文)新規抗がん剤創製を目指したチューブリン制御分子の探索と活性発現部位の解明研究

研究課題名(英文) Search for tubulin regulatory molecules and elucidate the site of active expression for the creation of novel anticancer drugs

研究代表者

山田 耕史 (YAMADA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：00253469

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)：本研究では、海洋無脊椎動物からチューブリン重合・脱重合阻害作用を示す成分を検索し、得られた成分を新規抗がん剤のリード化合物として開発するために、海洋生物の採集と活性成分の分離操作を行った。具体的には、採集した各試料動物並びに微生物培養物を処理して、粗抽出物を作成した。第一次活性試験として、各粗抽出物について、神経成長因子共存下で PC12 細胞に対する神経突起伸張作用を調べ、突起の伸張作用を示し、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する抽出物を選出し、活性成分の単離を行った。その結果、海藻、海綿動物、海洋性細菌類からセラミド、セレブロシド、環状ペプチドを単離し構造決定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
がん克服を実現するためには、化学療法で用いられる有効な新規抗がん剤を創出することが不可欠である。そのためには、抗がん剤開発の鍵となるリード化合物の創成が求められる。本研究において、海洋無脊椎動物からリード化合物になりうる活性成分を検索することを目的として実施し、海綿動物、海藻、海洋微生物から活性成分を分離することに成功したことは学術的に意義深く、将来医薬開発の糸口になりえる点で社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to search for components exhibiting tubulin polymerization / depolymerization inhibitory activity from marine invertebrates and develop the obtained components as seed compounds for new anticancer agents, collection of marine organisms and active constituents was separated. Specifically, each sample animal collected and the microbial culture were processed to prepare a crude extract. As the first screening, we investigated the neurite outgrowth effect on PC12 cells in the presence of nerve growth factor for each crude extract, and showed a neurite outgrowth effect, which may affect tubulin function. Extracts were selected and the active ingredient was isolated. As a result, ceramides, cerebrosides, and cyclic peptides could be isolated from seaweeds, sponges, and marine bacteria and their structures determined.

研究分野：天然物化学

キーワード：チューブリン分子 海洋無脊椎動物 海綿動物 海藻 AChE阻害活性阻害 H5N1ウイルス増殖抑制  
抗がん剤 PC12

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

がんの治療には、4種の治療方法が行われている。すなわち、化学療法、外科療法、放射線療法、そして、免疫療法である。このうち、特に、化学療法は、広範囲ながん治療の第一選択の治療方法として行われることが多い。すなわち、化学療法は、がんの転移もしくは転移の可能性がある場合や、広範囲に治療が必要な血液やリンパのがんの治療などに取り入れられている。更に、化学療法は、抗がん剤単独で治療を行うこともあるが、実際には、手術治療や放射線治療などの他の治療方法と抗がん剤治療を組み合わせることもある。また、化学療法では、一種の薬剤だけを使う場合と、いくつかの種類の薬剤を組み合わせる場合(多剤併用療法)がある。このように、がんの治療において、化学療法は広範囲で適用されている。しかし、薬剤耐性をもったがん細胞の出現や、薬剤の副作用などのために、薬剤投与量に制限が必要となり、十分な治療効果が得られない場合があることも知られている。従って、がん克服を実現するためには、化学療法で用いられる、より有効な新規抗がん剤を創出することが不可欠である。そのためには、新規抗がん剤開発の鍵となる抗がん物質のシード化合物の創成が求められる。

これまで代表者は、神経突起伸張作用成分を多数分離してきた。神経突起の伸張現象は、主に、チューブリン分子の重合に基づく微小管の形成に依存していることが知られている。一方、微小管は、細胞分裂等の様々な細胞機能にも関与していることも明らかになっている。従って、がん細胞のチューブリン分子の重合・脱重合阻害剤を開発することは、微小管の機能を制御することでがん細胞の分裂を抑制する薬剤の開発につながると考えられる。代表者は、これまでの研究の経験に基づき、容易に判別可能な PC12 細胞の神経突起伸張作用活性やヒト線維肉腫細胞 HT1080 の細胞質微小管に対する影響を指標にして、チューブリン分子の重合・脱重合阻害活性を示す新規抗がん剤の素材となり得る活性成分の探索を行い、更には活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として本研究を企画した。

神経突起伸張作用物質の探索研究に関しては、代表者らの研究<sup>1)~3)</sup>をはじめ、分化誘導物質に関する研究例が多く報告されている。一方、チューブリン重合阻害活性物質に関する報告例としては、微生物の産生物質としては、rhizoxin<sup>4)</sup>、phomopsin<sup>5)</sup>、ustiloxin<sup>6)</sup>等が、更に、植物成分としては、colchicine<sup>7)</sup>、や steganacin<sup>8)</sup>に端を発し、taxol<sup>9),10)</sup>等をはじめ多くの成分が知られている。一方、海洋生物由来のチューブリン重合阻害活性物質としては、dolastatin<sup>10<sup>11)</sup></sup>、halichondrin B<sup>12)</sup>、laulimalide<sup>13)</sup>、eleutherobine<sup>14)</sup>、diazonamide<sup>15)</sup>等の報告がなされているが、抽出・分離の段階からチューブリンを分子標的として抗がん剤のシード化合物を海洋動物から極微量成分に至るまで探索する試みは、世界的にも稀である。

## 2. 研究の目的

がん克服の実現のためには、より有効な新規抗がん剤を創出することが不可欠である。本研究では、新規抗がん剤開発のためのシード化合物の創製を目指した基礎研究として、(1)がん細胞の分裂等の細胞機能に大きく関与しているチューブリン分子の重合・脱重合を阻害する化学物質を九州西岸海域産海洋無脊椎動物から探索し、(2)その構造解明と構造活性相関の検討を行い、(3)活性アナログ体開発のための基礎データとして、活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として行った。具体的には、代表者は、これまでの海洋無脊椎動物、特に棘皮動物由来の神経突起伸張性スフィンゴ糖脂質に関する研究の経験に基づき、容易に判別可能な PC12 細胞の神経突起伸張作用活性やヒト線維肉腫細胞 HT1080 の細胞質微小管に対する影響を指標にして、チューブリン分子の重合・脱重合阻害活性を示す新規抗がん剤の素材となり得る活性成分の探索を行い、更には活性発現に必須な構造単位を解明することを目的として本研究を企画した。

## 3. 研究の方法

本研究では、海洋無脊椎動物からチューブリン重合・脱重合阻害作用を示す成分を検索し、得られた成分を新規抗がん剤のシード化合物として開発するために、(1)2018年度は、海洋生物の採集と活性成分の分離操作を行った。(2)2019年度では、活性成分の化学構造の解明を行い、(3)2020年度では、活性発現に必須な構造単位の解明を行った。具体的には、以下の手順で研究を推進した。

(1)2018年度：海洋無脊椎動物のスクリーニングと活性成分の抽出・単離

九州西岸海域(五島列島、天草灘、有明海沿岸海域)に豊富に生息している海洋無脊椎動物(棘皮動物、腔腸動物、軟体動物、海綿動物、原索動物等)の採集を行った。(一部の動物試料については、現在、既に採集済みである)

採集した各試料動物を処理して、粗抽出物(*n*-hexane、酢酸エチル、*n*-BuOH等)を得た。(既に採集している試料動物については、処理して粗抽出物を調製済みである)

第一次活性試験として、各粗抽出物について、神経成長因子(NGF)共存下で PC12 細胞に対する神経突起伸張作用を調べ、突起の伸張作用を示し、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する抽出物を選出した。

活性を示した抽出物について、活性を指標にしながら、微量成分に至るまで徹底的に活性成分の分離・精製を行った。活性成分の分離精製操作には、各種オープンカラムクロマトグラフ、中圧液体クロマトグラフ装置、高速液体クロマトグラフ装置等を用いて行った。

#### (2) 2019年度：チューブリン重合・脱重合作用の検討と精密構造解析

単離した活性成分の作用点がチューブリン/微小管であることを確認するために、第二次活性試験として、ヒト線維肉腫細胞 HT1080 の細胞質微小管に対する作用を、抗チューブリン抗体を用いた免疫染色法で解析することによって、高感度かつ高い特異性をもって、チューブリン重合・脱重合への作用を確認した。作用を示すことが認められた成分について、各種機器スペクトルデータならびに化学的手法を用いて、化学構造の解明を行った。

構造が明らかになった成分について、さらに詳細(定量的)にチューブリン重合・脱重合への作用を調べた。特に、チューブリンの重合/脱重合に影響を及ぼすことが知られている colchicine、vinblastine や taxol を Positive Control として用い、活性強度を比較し、Control 物質より顕著な活性を示す成分の検索に努めた。

#### (3) 2020年度：活性成分の構造活性相関の検討と活性発現構造単位の解明

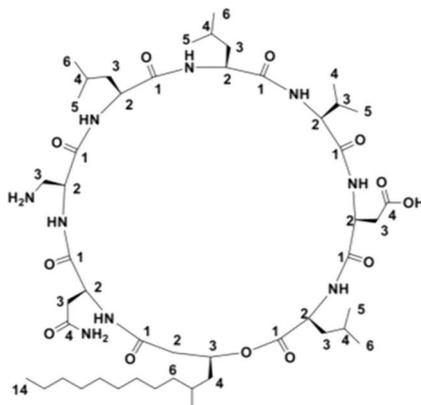
前年度 Control 物質より顕著な活性を示すことが認められた化合物の誘導体を調製した。

天然由来の成分並びに、調製した誘導体について、HT1080 細胞を用いて、チューブリン重合・脱重合への作用を詳細に調べた。

### 4. 研究成果

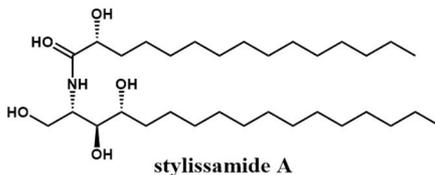
(1) 2018年度には活性成分の分離を行うために、海洋無脊椎動物の採集を行い、各動物を処理して粗抽出物を得た。更に、第一次活性試験として、得られた試料について、神経成長因子(NGF)存在下で、PC12細胞に対する作用を調べ、チューブリン機能に影響を与えている可能性を有する粗抽出物を見出した。

(2) 2019年度は、フサコケムシより分離した海洋性細菌の培養抽出エキスから、環状デブシペプチド化合物(Comp.1)を単離することに成功した<sup>16)</sup>。

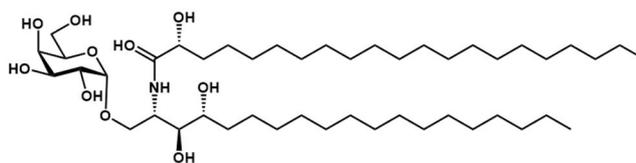


Comp. 1

(3) 2020年度は、2018年度に活性を示すことが認められた、海綿動物並びに海草の活性成分の検索を行った。海綿動物からセラミド類、セレプロシド類を分離することができた。一方、海草からは stigmasterol を含む多くの既知物質を分離することができた。特に、海綿動物 *Stylissa carteri* から得られた、セラミド(stylissamide A) 並びにセレプロシド(stylissoside A)は、ともに顕著な抗腫瘍活性を示すことを見出すことができたとともに、in silico 実験において、標的たんぱく質との分子結合能の解明も行うことができた<sup>17)</sup>。



stylissamide A



stylissoside A

#### 引用文献

- 1) K. Yamada *et. al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 57 (3), 315 (2009).
- 2) K. Yamada *et. al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 56(5), 734 (2008).
- 3) M. Kaneko, K. Yamada, *et. al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 55(3), 462 (2007).
- 4) S. Iwasaki *et. al.*, *J. Antibiot.*, **37**, 354, (1984).
- 5) M. F. Mackey *et. al.*, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1219 (1986).
- 6) Y. Koiso *et. al.*, *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4157 (1992).
- 7) J. W. Cooke *et. al.* " The Alkaloids II " Academic Press (1952).
- 8) S. M. Kupchan *et.al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1335 (1973).
- 9) P. Schiff *et. al.*, *Nature*, **277**, 665 (1979).
- 10) J. Manfredi *et. al.*, *J. Cell. Biol.*, **42**, 126 (1986).
- 11) G. R. Pettit *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 6883 (1987).
- 12) D. Uemura *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 4796 (1985).
- 13) S. L. Mooberry *et. al.* *Cancer Rev.*, **58**, 653 (1998).
- 14) T. Lindel *et. al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8744 (1997).
- 15) N. Lindquist *et. al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2303 (1991).
- 16) Reda F. A. and K. Yamada *et. al.*, *Metabolites*, **2019**, 273 (2019).
- 17) Reda F. A. and K. Yamada *et. al.*, *Marine Drugs*, **18**, 241 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 13件／うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Nagat Ghareba, Norhan M. El-Sayedc, Reda Abdelhameedd, Yamada K, Mohamed Saleh Elgawishe	4. 巻 86
2. 論文標題 Toward a treatment of diabetes: Rational design, synthesis and biological evaluation of benzene-sulfonamide derivatives as a new class of PTP-1B inhibitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 322-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2019.01.052	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 該当する
1. 著者名 Reda F. A. Abdelhameed, Sameh S. Elhady, Ahmad O. Noor, Diena M. Almasri, Alaa A. Bagalagel, Galal T. Maatooq, Amgad I. M. Khedr and Yamada K	4. 巻 2019
2. 論文標題 Production of a New Cyclic Depsipeptide by the Culture Broth of Staphylococcus sp. Isolated from Corallina ocinalis L.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 273-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo9110273	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 該当する
1. 著者名 Mohamed S. Refaey, Reda A. Abdelhamid, Mohamed A. A. Orabi, Ahmmed A. Ali, Reda Fouad Ahmed Abdelhameed, Eman A. A. Mousa, Shinjiro Hamano, and Yamada K	4. 巻 98
2. 論文標題 A new Iridodi Glucoside from Anisacanthus virgularis and Its Antiamoebic Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 1229-1235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-16-14102	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 該当する
1. 著者名 Rania El-Shaheny, Mohamed Radwan, Yamada K and Mahmoud El-Maghrabey	4. 巻 27
2. 論文標題 Estimation of nizatidine gastric nitrosatability and product toxicity via an integrated approach combining HILIC, in silico toxicology, and molecular docking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Food and Drug Analysis	6. 最初と最後の頁 915-925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jfda.2019.08.001	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 該当する

1. 著者名 Riho Kurata, Kenji Shimizu, Xiaofeng Cui, Masamitsu Harada, Takayuki Isagawa, Hiroaki Semba, Jun Ishihara, Koji Yamada, Jun Nagai, Yasuhiro Yoshida, Norihiko Takeda, Koji Maemura, Tomo Yonezawa	4. 巻 18
2. 論文標題 Novel Reporter System Monitoring IL-18 Specific Signaling Can Be Applied to High-Throughput Screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine drugs	6. 最初と最後の頁 260-271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md18010060	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 該当する

1. 著者名 Abdelhameed, R.F., Ibrahim, A.K., Yamada K, Ahmed, S.A	4. 巻 27
2. 論文標題 Cytotoxic and anti-inflammatory compounds from Red Sea grass <i>Thalassodendron ciliatum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 1238-1244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00044-018-2143-7	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 該当する

1. 著者名 Amgad I.M.Khedra, Sabrin R.M.Ibrahimbc, Gamal A.Mohamedde, Samir A.Rossf, Yamada K	4. 巻 23
2. 論文標題 Panduramides A-D, new ceramides from <i>Ficus pandurata</i> fruits	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 100-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2017.11.023	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 該当する

1. 著者名 Ama Kyeraa Thomford, Reda Fouad Ahmed Abdelhameed and Yamada K	4. 巻 2018
2. 論文標題 Chemical studies on the parasitic plant <i>Thonningia sanguinea</i> Vahl	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 21002-21011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8RA03913E	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 該当する

1. 著者名 Ghareb N, El-Sayed NM, Abdelhameed R, Yamada K, Elgawish MS.	4. 巻 27
2. 論文標題 Toward a treatment of diabetes: Rational design, synthesis and biological evaluation of benzene-sulfonamide derivatives as a new class of PTP-1B inhibitors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic Chemistry	6. 最初と最後の頁 322-338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bioorg.2019.01.052	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 該当する

1. 著者名 Abdelhameed Reda F. A., Habib Eman S., Ibrahim Ahmed K., Yamada Koji, Abdel-Kader Maged S., Ahmed Safwat A., Ibrahim Amany K., Badr Jihan M., Nafie Mohamed S.	4. 巻 26
2. 論文標題 Chemical Constituent Profiling of Phyllostachys heterocycla var. Pubescens with Selective Cytotoxic Polar Fraction through EGFR Inhibition in HepG2 Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 940 ~ 940
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules26040940	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 該当する

1. 著者名 Abdelhameed Reda F. A., Nafie Mohamed S., Ibrahim Ahmed K., Yamada Koji, Abdel-Kader Maged S., Ibrahim Amany K., Ahmed Safwat A., Badr Jihan M., Habib Eman S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Cytotoxic, Apoptosis-Inducing Activities, and Molecular Docking of a New Sterol from Bamboo Shoot Skin Phyllostachys heterocycla var. pubescens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5650 ~ 5664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25235650	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 該当する

1. 著者名 El-Shaheny Rania, Radwan Mohamed O., Belal Fathalla, Yamada Koji	4. 巻 186
2. 論文標題 Pentabromobenzyl-RP versus triazole-HILIC columns for separation of the polar basic analytes famotidine and famotidone: LC method development combined with in silico tools to follow the potential consequences of famotidine gastric instability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 113305 ~ 113317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2020.113305	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 該当する

1. 著者名 Abdelhameed Reda F. A., Habib Eman S., Eltahawy Nermeen A., Hassanean Hashim A., Ibrahim Amany K., Mohammed Anber F., Fayez Shaimaa, Hayallah Alaa M., Yamada Koji, Behery Fathy A., Al-Sanea Mohammad M., Alzarea Sami I., Bringmann Gerhard, Ahmed Safwat A., Abdelmohsen Usama Ramadan	4. 巻 18
2. 論文標題 New Cytotoxic Natural Products from the Red Sea Sponge <i>Stylissa carteri</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 241 ~ 253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md18050241	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 該当する

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 香田沙羅、日下世菜、出田智明、森崎弘司、岩崎一成、山田耕史
2. 発表標題 長崎県産トウゲシバ ( <i>Huperzia serrata</i> ) の成分研究 (第2報)
3. 学会等名 第36回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mohamed S. Refaey, 池本瑞季, Reda A. Abdelhamid, Mohamed A. A. Orabi, Ahmed A. Ali, Reda Fouad Ahmed Abdelhameed, Eman A. A. Mousa, 濱野真二郎, 山田耕史
2. 発表標題 <i>Anisacanthus vigularis</i> 由来の生物活性成分に関する化学的研究 (第1報) ~ イリドイド配糖体について ~
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺 彩子、武田 美優、梅木 美樹、山田 耕史、望月 聡、小田 裕昭
2. 発表標題 マナマコ由来セレブロシドの血清コレステロール代謝改善作用のメカニズム
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池本瑞季、Ama K. Thomford、Reda F. A. Abdelhameed、山田耕史
2. 発表標題 ガーナ産植物( <i>Thonningia sanguinea</i> Vahl) の成分研究(第2報)
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
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
---------	---------