

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14933

研究課題名(和文) HeLa/Fucci2細胞の表現型解析による新規作用機序を有する海洋天然物の探索

研究課題名(英文) Search for cell cycle inhibitors from marine natural products by phenotypical screening of HeLa/Fucci2 cells

研究代表者

人羅 勇気 (Hitora, Yuki)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教

研究者番号：00755308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤の多くは、細胞分裂に関わる分子の機能を阻害することで細胞周期を停止させ、がん細胞の増殖を抑制する。そのため、がん細胞の細胞周期の進行を阻害する化合物は、抗がん剤開発のシーズとしての利用が期待される。本研究では、生細胞の状態で細胞周期を解析することができるFucci技術を天然物探索研究に応用することで、細胞周期を阻害する天然物の網羅探索をおこなった。その結果、2種類の海綿エキスから細胞周期を阻害する新規天然物を複数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞周期の進行を阻害する化合物は、がん細胞の増殖を抑制するので、新規抗がん剤シーズとしての利用が期待される。本研究では、Fucci技術を用いて細胞周期を阻害する天然物を網羅的に探索する実験系を構築し、天然物エキブライブラリーをスクリーニングした。本研究の成果として、細胞周期をS期からG2期で停止させる新規化合物ならびに細胞周期を延長させる新規化合物を海綿エキスから見出した。本研究によって天然物創薬を推進する研究基盤を構築することができた。

研究成果の概要(英文)：Anti-cancer agents prevent cell cycle progression and inhibit the proliferation of cancer cells. Small molecules which inhibit cell cycle progression are promising anticancer agents. Fucci is a fluorescent probe which enables the analysis of cell cycle progression in living cells. In this study, we searched for the natural products inhibiting cell cycle progression of HeLa/Fucci2 cells, and we identified several new compounds which affect the cell cycle progression.

研究分野：天然物化学

キーワード：細胞周期 天然物 スクリーニング Fucci

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

天然物は古くから創薬資源として利用されてきた。現在上市されている医薬品の約半数は天然物、あるいは天然物もとに開発された化合物である。医薬品の中でも、抗がん剤開発研究における天然物の貢献は大きく、これまでに開発された抗がん剤の約 65% は天然物に由来する<sup>1</sup>。そのため、抗がん剤シーズとしての利用が期待される新規天然物の発見が求められている。

これまでに抗がん剤シーズとして見出された天然物は、それぞれ特有の標的分子に作用し、がん細胞の増殖を抑制することが知られている。*Cryptotethya* 属海綿より発見されたスポンゴチミジンやスポンゴウリジンは、DNA 合成を阻害し、*Streptomyces* 属放線菌から発見されたアントラサイクリン系薬剤は、トポイソメラーゼを阻害する。また、イチイの樹皮から単離されたパクリタキセルは、微小管に結合し安定化させることで抗がん作用を示す。化合物により抗がん作用を示す機構は様々であるが、抗がん剤の多くは細胞分裂に関連する分子の機能を阻害することで、がん細胞の細胞周期を停止し、細胞死を誘導する。

細胞周期は、間期と有糸分裂期 (M 期) に分けられる。間期はさらに DNA 合成準備期 (G1 期) DNA 合成期 (S 期) および分裂準備期 (G2 期) に分類される。細胞周期の進行は、主にサイクリン、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) および、がん抑制タンパク質である p53 によって厳密に制御されている。正常細胞では、細胞周期の進行はチェックポイント機能によって管理されており、DNA 損傷や DNA 複製の異常が生じた場合は、細胞周期の停止や DNA 損傷の修復、アポトーシスの誘導が起こる。しかし、がん細胞では細胞周期チェックポイントを制御する p53 シグナル経路の不活化や遺伝的不安定性により、チェックポイント機能が失われている。そのため、がん細胞では細胞周期が恒常的に進行し、異常な細胞増殖が起こる。このような背景のもと、がん細胞の細胞周期の進行を停止する天然物は抗がん剤シーズとしての利用が期待される。

一般的に細胞周期の解析では、フローサイトメトリーによる DNA 量の測定が定法として用いられる。DNA 量の解析では、細胞の固定および DNA 染色を伴うので、継時的な細胞周期の変化を解析することは困難である。また、測定までに多段階の工程が必要であり、細胞周期阻害物質探索のためのハイスループットスクリーニングへの展開は容易ではない。しかし近年、生細胞の状態での細胞周期を解析することができる蛍光プローブである Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) が開発され、蛍光イメージングにより細胞周期の進行を簡便かつ迅速に解析可能になった<sup>2</sup>。そこで本研究では、Fucci 技術を天然物スクリーニングに応用することで、細胞周期を停止する天然物の網羅探索を計画した。

### 2. 研究の目的

がん細胞では、細胞周期の制御系が破綻しており、細胞周期が停止することなく進行し細胞が分裂する。一方、正常細胞は静止期 (G0 期) にあり、細胞分裂を停止した状態にあることが知られている。そのため、細胞分裂に関連する分子に作用し細胞周期の進行を阻害する化合物は、がん細胞選択的に細胞増殖を抑制すると考えられるので、抗がん剤としての利用が期待される。

微生物、植物、海洋生物などの生物が生産する天然物は、構造多様性に富んでおり、独特な作用機構で生物活性を示すものが多い。これまでに細胞周期の制御に関わる生体分子に作用し、細胞周期阻害作用を示す天然物が複数見出されている。天然物は、既存の抗がん剤とは異なる独自のメカニズムで抗がん活性を示す可能性が高く、創薬シーズの探索源として注目されている。独自の作用機構で細胞周期を阻害する天然物を発見することで、天然物創薬シーズの創出、あるいは生命科学研究の発展に貢献するケミカルプローブの開発につながると考えられる。

本研究では、Fucci 技術を天然物の生物活性の評価系に応用したハイスループットな評価系を構築し、細胞周期を阻害する天然物の網羅探索を計画した。本研究を実施するにあたり、Fucci2 が遺伝子導入された HeLa/Fucci2 細胞を用いた<sup>3</sup>。Fucci2 は、G1 期に発現する DNA 複製のライセンス化制御因子である Cdt1 と S 期から M 期にかけて発現する DNA 複製のライセンス化阻害因子 Geminin に赤色蛍光タンパク質および緑色蛍光タンパク質を融合した細胞周期可視化蛍光プローブである。そのため、Fucci2 プローブが導入された細胞では、G1 期では赤色蛍光タンパク質を、S 期から M 期にかけては緑色蛍光タンパク質を核内に発現するので、蛍光顕微鏡で観察することで生細胞の状態での細胞周期を解析することができる (図 1)。また、タイムラプスイメージングによって細部周期の進行を継時的に解析することが可能である。本研究では、HeLa/Fucci2 細胞の細胞周期の進行を阻害する天然物エキスをスクリーニングし、細胞周期阻害物質を探索した。

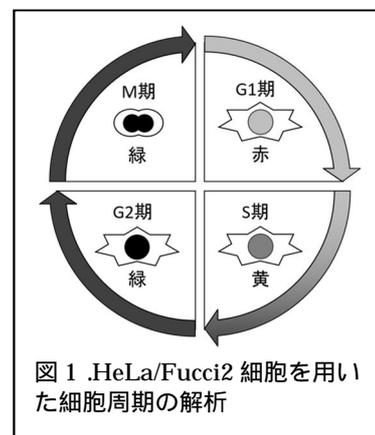


図 1 .HeLa/Fucci2 細胞を用いた細胞周期の解析

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 細胞周期阻害物質のスクリーニング系の構築

HeLa/Fucci2 細胞は、G1 期に該当する細胞では赤色蛍光タンパク質が核内に蓄積し、S 期から M 期にかけては緑色蛍光タンパク質が核内に蓄積する。そこで、細胞周期阻害物質を探索するにあたり、赤色蛍光を発する細胞と緑色蛍光を発する細胞の割合を算出することで、細胞周期の異常を検出することが可能であると考えた。緑色蛍光を示す細胞数を、赤色蛍光を示す細胞数で割った値（細胞周期指数）を細胞周期解析の指標として算出し、天然物エキスが細胞周期に与える影響を評価した（図 2）。条件検討を行った結果、HeLa/Fucci2 細胞は対数増殖期において細胞周期指数が 0.56 であることが分かった。また、細胞毒性があるサンプルでは、正確な細胞周期の解析ができないので、蛍光イメージングを行った後に細胞毒性試験を行い、細胞の生存率を算出した。細胞周期指数と細胞の生存率の解析結果から細胞周期に影響を与えるサンプルを選抜する評価系を構築した。

#### 3-2. 天然物エキ斯拉イブラリーのスクリーニング

当研究室が保有する海洋無脊椎動物、放線菌、および糸状菌培養物から調製した天然物エキ斯拉イブラリーの中から、約 7000 サンプルについて、HeLa/Fucci2 細胞に対する細胞周期阻害活性を評価した。HeLa/Fucci2 細胞を 96 マルチウェルプレートに播種し、エキスサンプルを添加し 2 日間培養後、蛍光イメージングプレートリーダーを用いて細胞周期阻害活性を評価した。また、MTT 試験により細胞生存率を算出した。細胞生存率が 40% 以上であるサンプルについて、細胞周期指数が 0.4 以下のものは G1 期での細胞周期停止が起きたサンプルとし、細胞周期指数が 1.2 以上となったサンプルは S 期から M 期にかけて細胞周期を停止する作用があると判断した（図 2）。天然物エキ斯拉イブラリーをスクリーニングした結果、細胞周期阻害作用を示す天然物エキスを複数見出した。

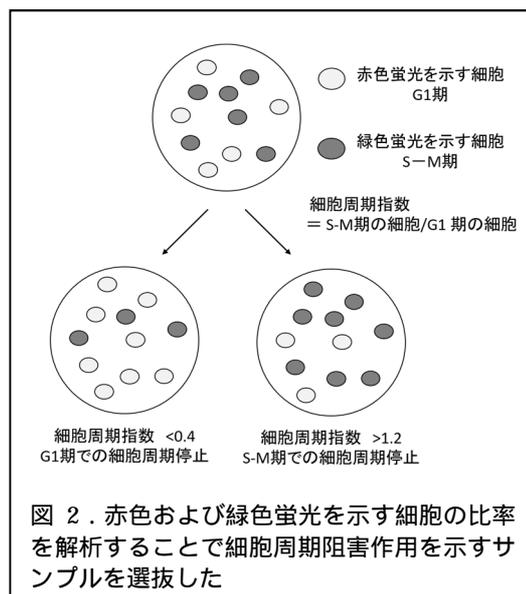


図 2. 赤色および緑色蛍光を示す細胞の比率を解析することで細胞周期阻害作用を示すサンプルを選抜した

#### 3-3. 細胞周期阻害物質の単離と構造決定

前述のスクリーニングで細胞周期阻害活性が見られたエキスサンプルについて、活性成分の探索をおこなった。本研究では、細胞周期を S 期から M 期で停止させる作用を示した *Dactylospongia* 属海綿のエキスならびに G1 期で細胞周期を停止させる作用を示した *Haliclona* 属カイメンの 2 種類のサンプルについて活性成分の探索をおこなった。海綿抽出物を溶媒分画ならびに各種クロマトグラフィーによって精製し、*Dactylospongia* 属海綿から新規化合物 A およびその類縁体を単離し、*Haliclona* 属海綿から新規化合物 B およびその類縁体を単離した。マススペクトルおよび NMR スペクトルの解析により構造を決定した（論文投稿準備中）。

#### 3-4. 細胞周期阻害物質の作用機構の解析

化合物 A およびその類縁体について、蛍光顕微鏡を用いて HeLa/Fucci2 細胞を観察することで、細胞周期に与える影響を評価した。また、ヨウ化プロビジウムで DNA 染色し、フローサイトメーターにより細胞周期を解析した。類縁体を用いて構造活性相関研究を行った。

化合物 B およびその類縁体についても同様に HeLa/Fucci2 細胞の蛍光顕微鏡観察を行い、細胞周期阻害作用を評価した。また、蛍光タイムラプスイメージングにより細胞周期の進行に与える影響を継時的に観察し、細胞周期阻害機構を解析した。

### 4. 研究成果

#### 4-1. *Dactylospongia* 属海綿より単離した細胞周期阻害物質

*Dactylospongia* 属海綿エキスより細胞周期阻害物質として新規化合物 A および 4 個の既知類縁体を単離した。HeLa/Fucci2 細胞を蛍光顕微鏡で観察した結果、化合物 A およびその類縁体は、いずれも化合物添加 24 時間以内にほぼすべての細胞が緑色蛍光を示す状態、すなわち S 期から M 期の間で細胞周期を停止することが明らかとなった。さらに、フローサイトメーターにより詳細に細胞周期を解析したところ、化合物処理により G1 期の細胞の割合が低下し、S 期および G2 期に該当する細胞の割合が増加することが分かった（論文投稿準備中）。

#### 4-2. *Haliclona* 属海綿より単離した細胞周期阻害物質

*Haliclona* 属海綿より細胞周期の進行を阻害する化合物として新規化合物 B およびその類縁体を単離した。化合物を単離した当初は、化合物 A は G1 期で細胞周期を停止すると考えていたが、HeLa/Fucci2 細胞を用いて詳細に細胞周期に与える影響を評価したところ、化合物 A およびその類縁体は細胞周期を特定の期間で停止させるのではなく、各細胞周期の時間を延長し、細胞分裂を抑制する作用を示す可能性が示唆された。そこで、蛍光タイムラプスイメージングによって、細胞周期の進行に与える影響を詳細に解析した。その結果、通常 HeLa/Fucci2 細胞は、G1 期の開始から M 期で細胞分裂が起きるまで細胞周期にかかる時間が約 18 時間であったのに対して、化合物 B を 10  $\mu$ M 処理した場合、細胞周期が 1 周するまでにかかる時間は 42 時間であった。また、化合物 B の濃度依存的に細胞周期の G1 期および S 期から M 期にかけて一様に細胞周期の進行にかかる時間が延長することが明らかになった。細胞周期の阻害作用を示す天然物は複数報告されているが、細胞周期を延長する化合物については研究報告が少なく<sup>4</sup>、その作用メカニズムは興味もたれる。現在、化合物 B の細胞周期延長作用について、類縁体を用いた構造活性相関研究や標的分子の探索研究を計画中である。本研究で見出された化合物 B のように細胞周期延長作用を示す化合物は、フローサイトメーターを用いた既存の細胞周期の解析手法では検出が困難であり、HeLa/Fucci2 細胞を用いることで発見することができた。今後は、化合物 B の細胞周期延長作用の作用メカニズムの解析を進めると共に、HeLa/Fucci2 細胞を用いた天然物スクリーニングを継続し、細胞周期阻害作用を示す新規抗がん剤シーズとしての利用が期待される新規天然物の発見を目指す。

#### < 引用文献 >

- 1) Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83(3):770–803.
- 2) Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.* 2008;132(3):487–498.
- 3) Sakaue-Sawano A, Kobayashi T, Ohtawa K, Miyawaki A. Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biol.* 2011;12:2.
- 4) Prasedya ES, Miyake M, Kobayashi D, Hazama A. Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:270.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

〔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 前田 莉花、人羅 勇気、塚本 佐知子
2. 発表標題 インドネシアで採集した海綿から単離した新規 1,3-アルキルピリジニウムの化学構造と生物活性について
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 人羅 勇気、前田 莉花、小柳 侑平、瀬治山 藍、塚本 佐知子
2. 発表標題 HeLa/Fucci2 細胞の蛍光イメージングによる細胞周期を阻害する天然物の探索
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬治山 藍、人羅 勇気、塚本 佐知子
2. 発表標題 インドネシアで採取した海綿より得られた新規セスキテルペンキノンの構造と生物活性
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柳 侑平、人羅 勇気、塚本 佐知子
2. 発表標題 Fucci2/HeLa細胞を用いた海洋生物由来の細胞周期阻害物質の探索
3. 学会等名 日本生薬学会第65回年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----