

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20380039

研究課題名（和文）昆虫由来生理活性物質を利用した新規抗ガン剤開発のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research on the development of novel anticancer drugs utilizing bioactive substances from insects

研究代表者

山川 稔 (YAMAKAWA MINORU)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域 特任上級研究員

研究者番号：30183677

研究成果の概要（和文）：昆虫由来抗微生物タンパク質を改変したペプチドが正常細胞には作用せず一部のがん細胞を破壊する機序を明らかにする目的で研究が行われた。改変ペプチドはがん細胞表面のマイナス電荷をもつホスファチジルセリンとペプチドのプラス電荷との静電的引き合いに起因する細胞膜の膜破壊が起きることが証明された。

一方、タカサゴシロアリからがん細胞増殖抑制活性を示す新規化合物 1,1'-biphenyl-3,3',4-triol が分離・同定された。この物質は既知の抗がん剤とは異なる作用メカニズムを有することを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the mode of action of beetle-derived antimicrobial peptides which attack some cancer cells but not normal cells. The peptides were revealed to electrostatically interact with negatively charged phosphatidylserine and disrupt the membrane of some cancer cells.

On the other hand, a new compound, 1,1'-biphenyl-3,3',4-triol was isolated and identified from a termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). This compound showed the suppressing activity of cancer cell proliferation, and the mode of action was suggested to be different from those of already-known anticancer drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |
| 2009年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2010年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2011年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2012年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 総計 | 14,200,000 | 4,260,000 | 18,460,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：昆虫、抗がん剤、がん細胞、増殖抑制活性、新規化合物、がん細胞増殖抑制メカニズム、タカサゴシロアリ

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の三大疾病（がん、心臓病、脳卒中）の第一位をしめる生活習慣病の1つに分類される慢性疾患である。近年がんが増えた原因について、高脂肪、低繊維、カロリー過多等による戦後の食生活の欧米化や喫煙率の上昇

による肺がんによる死亡率の増加が挙げられる。このような背景からがん研究には多額の国家予算が投じられてきたが、完全な治療法の確立には程遠いのが現状で、新たな作用機構に基づく画期的な抗がん剤の開発が待たれる。

我々はこれまで昆虫のもつ特異的な生体防

御機構を解明し、その成果を医薬分野に応用利用する目的で、昆虫由来のさまざまな抗微生物タンパク質を分離・同定し、その作用メカニズムを明らかにしてきた。その中でもコウチュウ目昆虫であるカブトムシ(*Allomyrina dichotoma*)や熱帯地域に生息しヤシの害虫として知られているタイワンカブトムシ(*Oryctes rhinoceros*)由来の抗微生物タンパク質ディフェンシンを改変し、緑膿菌やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)等の多くの病原細菌に対して強い殺菌作用があり、MRSA や病原性大腸菌に感染したマウスにも治療効果を示すペプチドを開発してきた。これらの改変ペプチドは負電荷を帯びた細菌膜に選択的に結合し、膜バリアー能を破壊することにより細菌を殺すことが分かった。また、真核生物では細菌膜表面が電気的に中性であり、これらの改変ペプチドは作用できないことが明らかになった。しかし、2005年に一部のがん細胞種の細胞膜表面はわずかながら負電荷を帯びているという論文が発表された。このことが事実であれば、我々の改変ペプチドががん細胞を選択的に殺し、正常細胞には何ら影響を及ぼさないということが可能であると思えた。そこでマウス由来のがん細胞を用い改変ペプチドによる増殖阻害活性を調べてみたところ、予備的な結果ではあったが、マウス骨髄腫細胞の膜破壊が引き起こされることが電子顕微鏡による形態学的な観察により判明した。一方、正常細胞は何ら変化がみられなかった。この実験結果はマウス骨髄細胞の表面電荷と細胞膜の脱分極さらには膜破壊へと進む改変ペプチドの作用機構を立証できれば、画期的な新しい抗がん剤開発の重要な基礎的知見が得られることを示唆していた。

一般的に現在臨床で用いられている抗がん剤は副作用の強いものが多く、がん細胞も殺すが同時に正常細胞にも作用するものが多い。その欠点を補うために、作用機構の異なる抗がん剤を用いるのが一般的である。我々の研究目的は正常細胞には作用せずがん細胞を選択的に殺す抗がん剤の開発であり、その点なぜ上述のような改変ペプチドが選択的にがん細胞のみを破壊するのかという原因の解明は重要であると思われた。このような研究は世界的にもまだなされておらず、発表論文の中で推測された例がわずかにあるのみである。

一方、昆虫のもつ機能性物質の研究は未開拓の萌芽的分野であり、既知の抗がん剤とは異なる作用をもつ新規物質の探索は重要だと思われた。実際に日本においてモンシロチョウのサナギから抗がんタンパク質が分離・同定されたが、正常細胞にも作用してしまうことが明らかとなり、このタンパク質を基に実用化された例はまだ無いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、従来の抗がん剤とは全く

作用の異なる新規抗がん剤開発のための基礎的知見を得ることである。具体的には、昆虫由来抗微生物タンパク質改変ペプチドのがん細胞増殖抑制活性をもつ物質の探索を通し、新規抗がん剤開発のシーズを得ることである。

(1) 改変ペプチドが働くためには標的細胞の細胞膜表面が負電荷を帯びることが必須条件であるが、マウス骨髄腫の細胞表面がマイナスにチャージしているかどうかは不明である。従って、まずこの点を明らかにし、改変ペプチドがマウス骨髄腫細胞の膜バリアー能を破壊するのかどうかの詳細を明らかにする。その作用機構を明らかにすることにより、新規抗がん剤開発のための基礎的知見とする。さらに、この作用機構を利用した抗がん戦略を構築し、その有効性を証明するモデル実験を行う。

(2) タカサゴシロアリをはじめ他の昆虫からスクリーニングを行い、新たながん細胞増殖抑制活性をもつ物質を探索し、それについて構造決定を行う。更に、これらががん細胞増殖抑制物質のがん細胞に対する作用機構を調べ既知の抗がん剤と異なる作用をもつかどうかを明らかにし、新たな抗がん剤の可能性についての基礎知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 研究材料としては、カブトムシ及びタイワンカブトムシ由来の抗微生物タンパク質ディフェンシンを出発材料に作出された4種の改変ペプチドを用い、6種の培養がん細胞(ヒト子宮がん、ヒト肺がん、ヒト扁平上皮がん、マウス骨髄腫、マウス神経膠腫、アフリカミドリザル腎臓がん)に対する増殖抑制活性を調べるため IC_{50} 値を決定した。さらに、増殖が強く抑制されるがん細胞に対しては、電子顕微鏡による形態学的観察やペプチド濃度と細胞内酵素の漏出の関係を調べた。また、改変ペプチドががん細胞の細胞膜に直接作用しているかどうかを明らかにするために、膜電位感受性の蛍光色素を用い細胞膜の脱分極について調べた。一方、がん細胞表面のマイナス電荷をもつホスファチジルセリンの量と改変ペプチドのがん細胞増殖抑制活性の関係について調べた。次に、改変ペプチドのC末にアルギニン残基を8個付け加えた細胞膜を通過できるペプチドを新たに合成し、細胞内のミトコンドリアに対する影響を調べた。

その結果に基づき、がん細胞や新生血管上皮細胞で過剰発現しているインテグリン $\alpha V\beta 3$ に対して指向性を持ち、さらに細胞内移行機能を持つ環状型 RGD 配列をドラッグデリバリー配列として付加した改変ペプチドを合成し、その細胞選択性、標的細胞での細胞内移行とミトコンドリアに対する影響及びアポトーシスの誘導能について調べた。

(2) 新たな昆虫由来がん細胞増殖抑制物質の探索のため、タカサゴシロアリを出発材料としてスクリーニングを行った。タカサゴシロアリの

磨砕液の上清を逆相カートリッジ Sep-Pak_{C18} で粗精製し、さらにヒト白血病細胞 Jurkat に対し増殖抑制活性を示したアセトニトリル 30% 溶出画分を逆相 HPLC で精製した。単離された活性物質を FT-¹³C-MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, NOESY, COSY, HMBC, HMQC スペクトルの解析を行い構造の決定を試みた。

タカサゴシロアリ由来のがん細胞増殖抑制物質の作用機構を明らかにするためヒトがん細胞 39 系統を用いがん特有な因子の阻害活性評価を行い、その物質の作用メカニズム及び分子標的の予測をインフォーマティクスによる化合物評価系であるヒトがん細胞パネルを用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 昆虫由来抗微生物タンパク質の改変ペプチドのがん細胞増殖抑制と形態変化に与える影響を調べた結果、D 型改変ペプチド B がマウス骨髄腫に対し強い増殖抑制活性を示すことが明らかとなった。電子顕微鏡観察からこのペプチドによる明らかな細胞膜破壊が観察された。次に、このペプチドはマウス骨髄腫の細胞膜に直接作用し膜の脱分極を引き起こすことが判明した。この現象はがん細胞表面に存在するマイナス電荷をもつホスファチジルセリンとプラス電荷をもつペプチドの静電的引き合いに起因することが証明された。さらに、調査した 6 種の培養がん細胞に対する改変ペプチドの増殖抑制活性は細胞表面のホスファチジルセリンの量に比例して強くなるという明らかな相関関係が認められた。

従来の D-ペプチド C の C 末端にアルギニン残基 8 個を付け加え細胞膜を通過する機能をもたせた新規ペプチド C2 は D-ペプチド C に比べ細胞増殖抑制効果が高く、細胞内へ移行しミトコンドリア膜を破壊した結果膜ポテンシャルを消失させることが明らかとなった。このミトコンドリア膜破壊は電子顕微鏡による観察からも実証された。

ドラッグデリバリーシステムを用いて、改変ペプチドに膜通過機能と細胞選択機能を付与しその特定細胞への輸送と細胞増殖抑制活性を調べた結果、環状型 RGD-改変ペプチド複合体が、細胞表面のインテグリン $\alpha V \beta 3$ の発現の多いヒト血管上皮細胞内に取り込まれ、ミトコンドリアの膜電位の消失を引き起こすのに対し、インテグリン $\alpha V \beta 3$ の発現が少ない細胞にはほとんど取り込まれず、ミトコンドリアは正常状態を保つことが分かった。また、このペプチド複合体はヒト血管上皮細胞にアポトーシスを引き起こすことから、がん治療のための新規抗血管新生阻害薬の可能性を秘めていることが明らかとなった。

(2) 昆虫由来がん細胞増殖抑制物質の探索の結果、タカサゴシロアリ磨砕液の上清よりこれまで報告されたことのない新規の 1,1'-biphenyl-3,3',4'-triol (BPT) が分離・同定された。BPT のプロテインキナーゼ阻害活性、ク

ラス選択的ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害活性の評価、アンドロゲン受容体 (AR) シグナル伝達阻害活性の評価、低酸素誘導因子 (HIF) 制御活性の評価、上皮-間葉転換 (EMT) 制御活性の評価が行われたが、いずれもネガティブであった。さらに、これらの結果を既知の抗がん剤の結果と比較することにより活性メカニズムの推測を試みた。その結果、BPT はがん細胞増殖抑制活性の有効濃度はやや高かったが 39 種のヒトがん細胞株に対し、differential growth inhibition が認められ、また既知の抗がん剤との比較から、その作用機構がユニークである可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Iwasaki, T., Ishibashi, J., Saido-Sakanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2008) Antibacterial and anticancer activity of diastomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins. *Peptide Science* 2007, 79-82. (査読あり)
- ② Iwasaki, T., Ishibashi, J., Saido-Sakanaka, H., Tanaka, H., Sato, M., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2009) Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. *Peptides* 30, 660-668. (査読あり)
- ③ Iwasaki, T., Ishibashi, J., Kubo, M., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2009) Multiple functions of short enantiomeric peptides based on beetle defensins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 683-687. (査読あり)
- ④ Iwasaki, T., Ishibashi, J., Taanaka, H., Sato, M., Asaoka, A., Taylor, D. and Yamakawa, M. (2009) Antibacterial and anticancer activity of diastomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins. *Peptide Science* 2008, 51-59. (査読あり)
- ⑤ Iwasaki, T., Yamakawa, M., Asaoka, A., Kawano, T. and Ishibashi, J. (2012) Anti-angiogenesis activities of novel peptide complexes: mitochondria disruptive 9-mer peptides conjugated with integrin alpha V beta 3-homing cyclic RGD motif.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 76, 2044-2048.
(査読あり)

- ⑥ 山川 稔、岩崎 崇、石橋 純。昆虫抗微生物ペプチドを用いた生体防御研究—
改変ペプチドの抗菌・抗ガン活性と作用機
構—。(2010)感染・炎症・免疫 40、6—15。
(査読なし)

[学会発表](計7件)

- ① Iwasaki, T., Yamakawa, M. *et al.*
Multi-target of enanteromeric 9-mer
peptides derived from beetle defensins. 日
本ペプチド学会 2008年10月29日東京
- ② 岩崎 崇、山川 稔ら。カプトムシディフ
エンシン由来改変ペプチドのマルチタ
ーゲット。第41回若手ペプチド夏の勉
強会。2008年8月4日京都
- ③ 岩崎 崇、山川 稔ら。カプトムシディフ
エンシン由来改変ペプチドの多機能解
析。平成21年度蚕糸・昆虫機能利用
学術講演会 2009年3月21日東京
- ④ Iwasaki, T., Yamakawa, M. *et al.*
Multi-target of enanteromeric 9-mer
peptides derived from beetle defensins.
2009 Keystone Symposia 2009年3月29
日カナダ、ウイスラー
- ⑤ Iwasaki, T., Yamakawa, M. *et al.*
Mitochondria disruptive 9-mer peptides
conjugated with tumor homing domain:
cyclic RGD motif. 第46回ペプチド討論会
2009年11月4~6日北九州市
- ⑥ 石橋 純、山川 稔ら。タカサゴシロアリ由
来ガン細胞増殖抑制物質の探索と同定。
平成23年度蚕糸・昆虫機能利用学術
講演会 2012年3月19日福岡
- ⑦ 石橋 純、山川 稔ら。昆虫抗微生物タン
パク質改変ペプチドのリン脂質膜との相互
作用。平成25年度蚕糸・昆虫機能利
用学術講演会 2013年3月18日茨城

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称:新規ビフェニール化合物

発明者:亀山真由美、石橋 純、山川 稔、

米田泰崇、吉田 充

権利者:農業生物資源研究所、食品総合研
究所

種類:特許

番号: 特願 2010-164384

出願年月日:平成22年7月21日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

山川 稔 (Yamakawa Minoru)

独立行政法人 農業生物資源研究所

昆虫科学研究領域

研究者番号:30183677

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

