

機関番号：34533
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20510209
 研究課題名 (和文) 内因性血管新生阻害物質活性化を標的とした天然由来新規抗がんリード化合物の創製
 研究課題名 (英文) Search of natural compound activating endogenous anti-angiogenesis factor as an anti-cancer agent.
 研究代表者
 青木 俊二 (AOKI SHUNJI)
 兵庫医療大学・薬学部・教授
 研究者番号:60252699

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、endostatin や angiostatin, thrombospondin といった内因性血管新生阻害因子に着目し、これら因子の発現をがん細胞や血管内皮細胞自身において高めることができる天然由来の「内因性血管新生阻害因子プロモーター活性化物質」の探索を試みた。ホスト細胞に内因性血管新生阻害因子である thrombospondin-1 遺伝子の promoter 領域を融合した luciferase レポータープラスミドを導入・安定発現させた遺伝子改変細胞の樹立を試みたが、安定発現株の樹立には至らなかった。一方、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト咽頭上皮がん細胞 (KB) やヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562) など数種の由来の異なるがん細胞を用いて増殖抑制試験を行い、HUVEC に対して選択的に増殖抑制効果を示す化合物の探索法を用いてスクリーニングし、生薬の抽出エキスイブラリーから数種のエキスに活性を見だし、試験の結果を指標に分画精製を行った。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we attempt to find the natural compounds which activate the promoter of “endogenous anti-angiogenesis factor” such as endostatin, angiostatin and thrombospondin. We tried to establish a bioassay method using the cells that were stably transfected by the luciferase reporter plasmid fused with the promoter domain of the thrombospondin-1 gene. However, We couldn't achieve to establish the stably transfected cells.

On the other hand, on the guidance of selective growth inhibition against human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), we searched for anti-angiogenic substances from extracts of medicinal plants. We found several active extract and tried to isolate the active components by the assay-guided separation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：天然薬物学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：内因性血管新生阻害因子、プロモーター活性化、thrombospondin-1、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞、腫瘍血管新生

1. 研究開始当初の背景

固形がんの増殖に血管新生は必須の現象で、この腫瘍血管新生を特異的に阻害する物質が、副作用が少ない新たな抗がん剤として有望であると考えられている。事実、近年、血管新生促進因子 VEGF の中和抗体 Bevacizumab が大腸癌の治療薬として認可され、また、多くの開発研究が現在も盛んに行われている。しかしながら、それらの開発研究は VEGF に代表される増殖因子の受容体拮抗薬 (Beebe J. S. et al. *Cancer Res.*, 2003, 63, 7301-7309) の開発など血管新生に関わる多様な因子の中の一つにのみ注目しており、結果として成功しているとは言い難い。

一方、近年、endostatin や angiostatin, thrombospondin といった内因性の血管新生阻害因子が発見され、大きな注目を集めている (Hanford, H. A. et al. *Cancer Res.* 2003, 63, 4275-4280. Jimenez, B. et al. *Nature Med.* 2000, 6, 41-48)。これらの内因性の血管新生阻害因子は、様々な条件で惹起される血管内皮細胞の増殖を特異的に抑制する作用があり、腫瘍血管新生を特異的に阻害する抗がん活性物質として臨床応用も試みられている (Kulke M. H. et al. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 3555-3561)。また、一部の既存の抗がん剤に腫瘍細胞における thrombospondin の発現を高める作用があり、thrombospondin の発現が高くなることで腫瘍細胞の悪性度が著しく減弱することも報告されている (Hawighorst, T. et al., *Oncogene*, 2002, 14, 7945-56)。

2. 研究の目的

本研究では、これらの内因性血管新生阻害因子に着目し、これら因子の発現をがん細胞や血管内皮細胞自身において高めることができる「内因性血管新生阻害因子プロモーター

活性化物質」を天然由来の低分子化合物から探索する。

1) 新たなタイプの腫瘍血管新生阻害剤としての「内因性血管新生阻害因子プロモーター活性化物質」を、レポータージーンアッセイを用いて天然由来の低分子化合物から探索する。

2) 腫瘍血管新生において中心的役割を果たしている血管内皮細胞の増殖や運動性に焦点を絞り、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) と由来の異なる数種のがん細胞を用いた血管内皮細胞に対する選択的増殖抑制物質の探索法や HUVEC の遊走阻害実験などのスクリーニング法を用いて血管新生を制御する情報伝達系に特異的に作用する活性物質を探索する。

3. 研究の方法

1) ホスト細胞に内因性血管新生阻害因子である thrombospondin-1 遺伝子の promoter 領域を融合した luciferase レポータープラスミドを導入・安定発現させた遺伝子改変細胞を樹立する。この遺伝子改変細胞に作用させた時、luciferase 活性の上昇が見られるエキスをアッセイの結果を指標に分画精製し、thrombospondin-1 promoter を活性化する新規活性物質の単離を試みる。

2) 上記スクリーニング法を用いて活性成分として単離した活性化合物について、各種がん細胞に作用させた時の thrombospondin-1 の発現誘導活性をウェスタンブロットによって解析するとともにソフトアガーアッセイなどを用いて in vitro 系でがん細胞の悪性形質の減弱を確認する。また、得られた活

性化合物を血管内皮細胞に作用させた時の thrombospondin-1 の発現誘導活性も確認し、得られた活性化合物の作用をがん細胞と血管内皮細胞の両面から評価する。

3) 得られた活性物質については、さらに類縁体の探索や化学変換による誘導体を作成し、その活性を比較することでより簡便に合成できる活性モデル化合物や各種ラベル体合成に必要な構造活性相関についての知見を得る。

4) これまでに確立している、ヒト齊帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト咽頭上皮がん細胞 (KB) やヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562) など数種の由来の異なるがん細胞を用いて増殖抑制試験を行い HUVEC に対して選択的に増殖抑制効果を示す化合物の探索法を用いて、これまでに収集している海綿を中心とする海洋生物の抽出エキスイブラリーや生薬の抽出エキスイブラリーから活性を示すエキスを探索する。活性の見られたエキスについては、活性試験の結果を指標に分画精製を行い、新規血管新生阻害物質の単離を試みる。

5) 上記アッセイ法によりすでに単離構造決定している HUVEC に対して数千倍もの選択増殖抑制効果を示すステロイドアルカロイド cortistatin A について前述の内因性血管新生阻害因子の発現に対する影響などその作用機序の解析を進めるとともに、2 次元電気泳動を用いた網羅的プロテオーム解析を行うことで、そのターゲット分子の解析も平行して行う。

6) *in vitro* 系で有効性が確認できた活性化

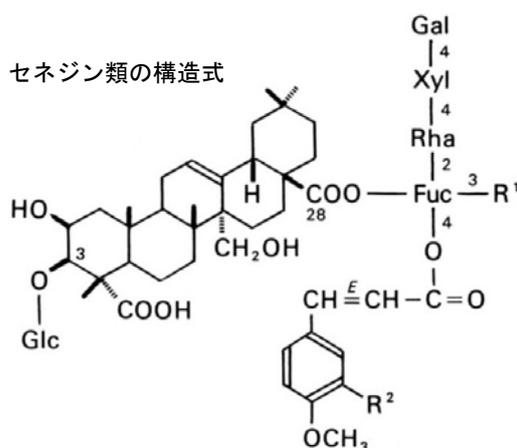
合物については、マウス角膜法を用いた *in vivo* での血管新生阻害活性の評価系やヒトがん細胞をヌードマウスに移植する移植腫瘍マウスでの *in vivo* 抗腫瘍効果評価系を用いて、*in vivo* での血管新生阻害活性および抗腫瘍効果を検討する。

7) Thrombospondin-1 promoter の各種ミュータントを組み込んだレポーター遺伝子を発現させた細胞を作成し、それを用いて得られた活性物質の thrombospondin-1 promoter 上のレスポンスエレメントの解析やプルダウンアッセイによる転写因子との直接作用の確認などその作用機序の詳細について解析する。また、得られた活性物質の構造活性相関の知見をもとに光親和性・放射性標識プローブの合成を行い、転写因子やその co-factor など相互作用する因子の同定を試みる。

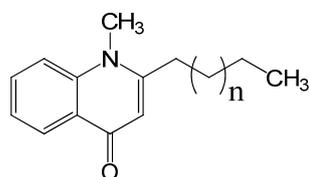
4. 研究成果

ホスト細胞である Caco2 細胞に内因性血管新生阻害因子である thrombospondin-1 遺伝子の promoter 領域を融合した luciferase レポータープラスミドを導入・安定発現させた遺伝子改変細胞の樹立を試みた。Thrombospondin-1 遺伝子の promoter 領域は全長が長く、ベクターの種類やプロモーター領域の大きさなどを種々検討しトランスフェクションを行った結果、一過性にレポーター遺伝子の発現は確認できたが、安定発現株の樹立には至らなかった。また、ヒト齊帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) とヒト咽頭上皮がん細胞 (KB) やヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562) など数種の由来の異なるがん細胞を用いて増殖抑制試験を行い HUVEC に対して選択的に増殖抑制効果を示す化合物の探索法

を用いてスクリーニングを行った。その結果、生薬の抽出エキスイブラリーからオンジやセネガといった植物のエキスに活性を見いだした。さらに、活性の見られたエキスを溶媒分画したところ、BuOH 可溶部に活性が見られた。活性の見られた BuOH 可溶部を順相及び逆相シリカゲルカラムや逆相 HPLC を用いて分画精製した結果、セネジンなどのサポニン成分に活性を見いだした。一方、



ヒトの前立腺がんおよび膵臓がんを高発現が見られ、増悪因子でもある DNA 脱メチル化酵素 PCA-1 の脱メチル化活性を阻害する化合物のスクリーニングを行った結果、アスナロやゴシュユといった生薬の抽出エキスに活性を見いだした。活性の見られたエキスは試験の結果を指標に各種クロマトグラフィーにより分画を行ない、最終的には HPLC を用いて精製することで活性物質としてフラボノイド二量体やインドール型アルカロイド・エボカルピンの単離に成功した。



エボカルピンの化学構造

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- 1) Yamasaki S., Masahiro Asakura M., Neogi S. B., Hinenoya A., Iwaoka E., Aoki S. Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compound. *Indian J Med. Res.* **133**, 232-239 (2011). 査読有
- 2) Chatterjee S., Asakura M., Chowdhury N., Neogi S., Sugimoto N., Haldar S., Prasad SA., Hinenoya A., Aoki S., & Yamasaki S. Capsaicin, a potential inhibitor of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett.*, **306**, 54-60 (2010). 査読有
- 3) Kotoku, N.; Hiramatsu, A.; Tsujita, H.; Hirakawa, Y.; Sanagawa, M.; Aoki, S.; Kobayashi, M. Structure-activity relationships study of bastadin 6, an anti-angiogenic brominated-tyrosine derived metabolite from marine sponge. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **341**, 568-577 (2008). 査読有
- 4) Kong D., Aoki S., Sowa Y., Sakai T., Kobayashi M. Smenospongine, a sesquiterpene aminoquinone from a marine sponge, induces G1 arrest or apoptosis in different leukemia cells. *Mar. Drugs*, **6**, 480-488 (2008). 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 俊二 (AOKI SHUNJI)
兵庫医療大学・薬学部・教授
研究者番号：60252699

(2) 連携研究者

古川 龍彦 (FURUKAWA TATSUHIKO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：40219100