

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03396

研究課題名(和文)p53の作用増強に着目した天然資源由来新規抗がん薬シーズのHTS探索と機能解析

研究課題名(英文) Search for new p53 activating natural compounds as cancer therapeutic drugs and their functional analyses

研究代表者

塚本 佐知子 (Tsukamoto, Sachiko)

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・教授

研究者番号：40192190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子産物p53はがん細胞において約50%が変異している。本研究では、がん治療薬開発のため変異型p53の機能を回復させる化合物を探索した。そして、p53-R175Hを過剰発現するSaos-2 (p53-R175H)細胞を用いて、当研究室で保有する天然資源エキスをスクリーニングし、植物内生菌から変異型p53の細胞内レベルを低下させる化合物を単離した。化合物の作用機構を調べたところ、本化合物は当初推定したように変異型p53を野生型構造に変換させて機能回復させるのではなく、変異型p53を不安定にさせプロテアソームによる分解や凝集を誘導させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで本研究代表者は、それぞれを阻害することでp53の作用を増強すると考えられるUba1 (E1)、Ubc13 (E2)、Mdm2 (E3)及びUSP7 (DUB)を対象として阻害剤の探索を行ってきた。それは、がん治療薬としての効果を考えると、p53の作用を増強する薬剤の中で異なる標的に作用する薬剤を複数併用することにより相乗効果が現れ、治療効果の飛躍的な向上が期待できると考えたからである。そして本研究では、p53に関する別な視点からのがん治療薬の開発として、変異型p53の機能を回復させる化合物の探索に関する研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The p53 mutant is a tumor suppressor. In more than 50% of tumors, p53 mutates and loss its suppressor function. In this study, the compounds that restore wild-type p53 function were searched from natural sources. The extracts of natural sources were screened using Saos-2 (p53-R175H) cells, and the compounds, which decreased mutant p53 level in the cells, were isolated from the plant endophyte. The compounds may promote the proteasome-mediated degradation of mutant p53 and the accumulation of the aggregated mutant p53.

研究分野：天然薬物学

キーワード：p53作用増強 HTS探索 がん治療薬 天然資源 機能解析

1. 研究開始当初の背景

細胞内での主要な選択的タンパク質分解は、ユビキチン-プロテアソームシステム [ubiquitin-proteasome system (UPS)、図 1] により行われている。標的タンパク質は、3種の酵素 [ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3)] によりユビキチン化された後、脱ユビキチン化酵素 [deubiquitinating enzyme (DUB)] によりユビキチンが除去され、プロテアソームにより分解される。プロテアソームはさまざまな機能タンパク質の分解を通して生命現象を制御している。そして、E1、E2、E3 により構成されるユビキチン修飾系は、プロテアソーム分解に先立つポリユビキチン化に関与し、多様な様式でタンパク質機能を調節することにより多彩な生命現象を制御している。その結果、UPS の各ステップに対する阻害物質は、創薬シーズとしてだけでなく、UPS の未知の機能を解明するための分子ツールとしても期待されている。しかしその開発は、既存の合成化合物ライブラリーのスクリーニングやリード化合物の修飾による方法が中心で、天然資源からの網羅的な探索は世界的にもあまり行われていなかった。

そこで、本研究代表者は、2003年にプロテアソーム阻害物質である bortezomib が多発性骨髄腫の治療薬として認可される以前から、UPS の全体が創薬の新規標的になりうると考え、構造的に多様性を有する天然物から次世代型がん治療薬の探索を行なってきた。そして、これまで、UPS の各ステップに対する阻害物質を探索するための評価系を確立して自らスクリーニングを行い、新規の各種阻害物質の発見に成功した。しかし、これまでに構築した評価系は、酵素やタンパク質間相互作用に対する阻害試験などであったため、検出にあたり天然物エキスに含まれる蛍光物質などの影響を受けやすかった。また、細胞レベルの評価系では、化合物の細胞膜透過性や細胞内での安定性などの予測は困難であった。そこで本研究では、これらの欠点を克服し、かつ効率の良いハイスループットスクリーニング (hithrouput screening: HTS) システムの構築を行った。

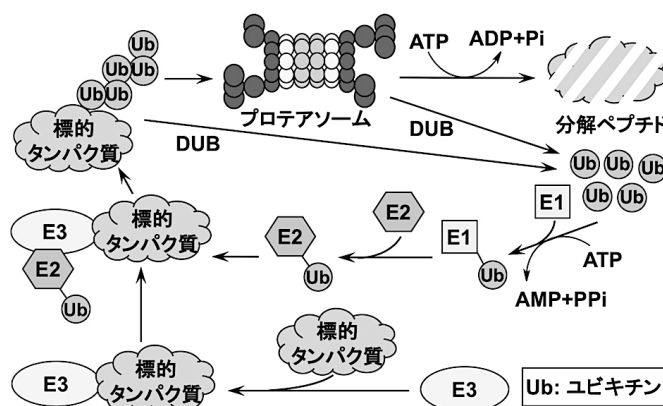


図 1. ユビキチン-プロテアソームシステム

2. 研究の目的

「ゲノムの守護神」であるがん抑制遺伝子産物 p53 は、細胞のがん化を抑えている。ヒトのユビキチン修飾系においては、E1 は主に 1 種、E2 と E3 はそれぞれ約 40 種および 600 種、また DUB は 98 種存在する。これまで本研究代表者は、それぞれを阻害することで p53 の作用を増強する、Uba1 (E1) (引用文献①、②)、Ubc13 (E2) (引用文献③、④)、Mdm2 (E3) (引用文献⑤、⑥) および USP7 (DUB) (引用文献⑦、⑧) に対する阻害物質の探索を行ってきた。なぜなら、p53 の作用を増強する薬剤に関して、異なる標的に作用する薬剤を複数併用すると相乗効果が現れ、がん治療効果の飛躍的な向上が期待できると考えたからである。そこで本研究では、p53 に対する作用増強物質の開発を強力に進めるため、Saos-2 (p53-R175H) 細胞を用いた評価系による変異型 p53 の機能回復物質の探索を行った (引用文献⑨)。

p53 はがん細胞において約 50% が変異していると言われていたので、本研究代表者は、「変異型 p53 を修飾し機能回復させる方法」や「変異型 p53 の凝集阻害に着目した方法」に関する評価系の構築を検討した。そして、変異型 p53 および野生型 p53 それぞれに対する抗体を用いて、p53 変異体を野生型に変換させる化合物を探索してきた。しかし、抗体による検出感度に問題があったので、本研究では新たな方法として、ヒト骨肉腫細胞 Saos-2 (p53 欠損) に変異型 p53 [R175H: 175 番目の Arg (R) が His (H) に変異] 遺伝子を導入し doxycycline 依存的に p53-R175H を過剰発現できる細胞 [Saos-2 (p53-R175H) 細胞] を用いた方法 (Wassman *et al.*, Nat. Commun. 2013, 4, 1407) (図 2) を採用した。すなわち、Saos-2 (p53-R175H) 細胞を doxycycline で処理した後、天然資源エキス存在下で培養した際に、変異型 p53 が野生型構造へと変換すると、p53 の作

用によりアポトーシスが誘導され細胞が死滅する。そこで、細胞生存率を MTT 法で評価することにより、HTS により「p53 の機能回復物質」の探索が可能である。p53 機能回復物質として合成化合物である PRIMA-1 (Amaro *et al.*, Nat. Commun. 2013, 4, 1407) の治験が進んでいるが、構造的多様性を有する天然物から臨床適用可能な新規 p53 機能回復物質を発見する研究は、世界的にも報告がない。

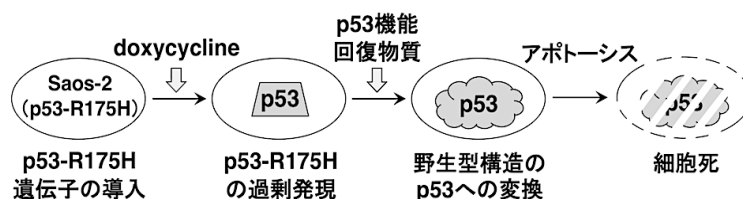


図 2. Saos-2 (p53-R175H) 細胞を用いた評価系：
変異型 p53 の機能回復物質の検出

3. 研究の方法

Saos-2 (p53-R175H) 細胞をマルチウェルプレートに播種し、翌日 doxycycline を添加した。8 時間後に変異型 p53 が発現するタイミングで、天然資源エキスを添加した。72 時間培養後に、MTT 試薬を添加し細胞生存率を測定した。エキス中に変異型 p53 を野生型構造の p53 へと変換させ、p53 の機能を回復させる化合物が存在する場合には、アポトーシスによりがん細胞が死滅することが期待される。この方法で天然資源エキスをスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) Saos-2 (p53-R175H) 細胞を用いて、2,311 の真菌エキスをスクリーニングした結果、数種類のエキスが細胞内の変異型 p53 を野生型構造の p53 に変換することが示唆された。それらの中で、阿蘇の植物から単離した *Colletotrichum* 属真菌を米培地で培養した。そして、エキスを精製し、既知化合物の colletofragarone A2 と 3 種類の新規類縁体 colletoins A-C を活性物質として単離した。NMR スペクトル、マスマスペクトルおよび計算化学を用いて、絶対立体配置を含む構造を決定した (図 3) [日本薬学会第 141 年会で口頭発表 (2021 年 3 月); 引用文献⑩]。

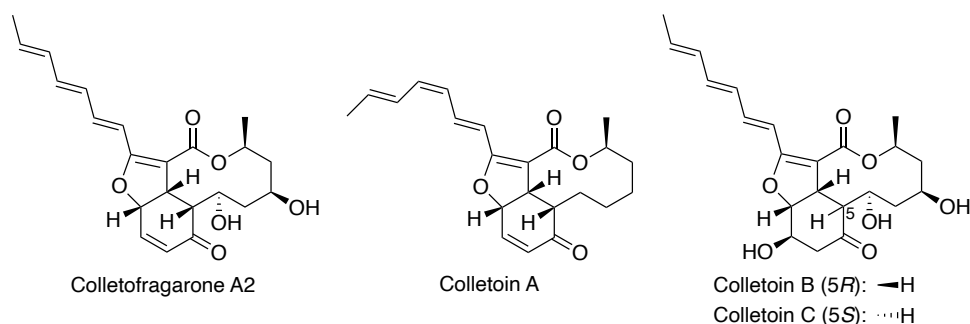


図 3. *Colletotrichum* 属の真菌から単離した化合物の構造

Colletofragarone A2 と colletoin A の Saos-2 (p53-R175H) 細胞に対する IC₅₀ 値は、いずれも 0.36 μM であった。そして、colletoins B、C は 21 μM および 12 μM だったので、α,β-不飽和カルボニルの有無により活性に大きな差が生じたと考えられる。また、変異型 p53 の機能回復物質として報告されている APR-246 や PEITC の IC₅₀ 値は 13 μM および 1.3 μM だったので、colletofragarone A2 および colletoin A の方が強い細胞増殖阻害作用を示したと言える。さらに、p53 の発現型の異なる細胞を用いて調べたところ、colletofragarone A2 は R175H 変異を有する細胞に対して特に強い増殖阻害作用を示し、SK-BR-3 細胞に対する IC₅₀ 値は 0.18 μM であった (図 4)。また、HuCCT1 細胞を移植したマウスに colletofragarone A2 を投与したところ腫瘍体積が縮小したので、in vivo においても腫瘍を縮小させる効果がある (図 5)。引き続き作用機構を調べた結果、colletofragarone A2 は HSP90 のような分子シャペロンに作用することにより変異型 p53 を不安定にさせ、プロテアソームによる分解や凝集を誘導させていると考えられる (図 6) [第 63 回天然有機化合物討論会で口頭発表 (2021 年 9 月)、第 37 回日本薬学会九州山口支部大会で口頭発表 (2021 年 11 月); 引用文献⑪]。

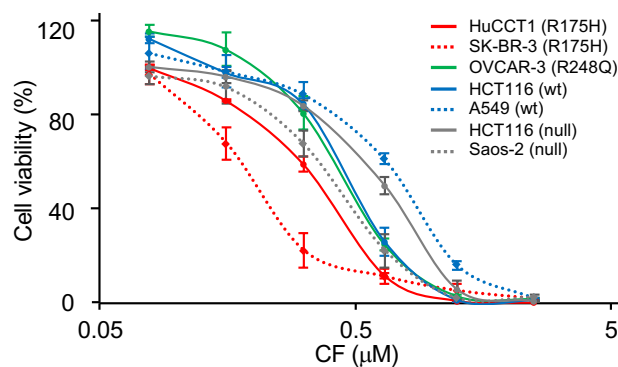


図4. p53 の発現型の異なる細胞に対する colletofragarone A2 (CF) の影響. 細胞は CF で 72 時間処理した.

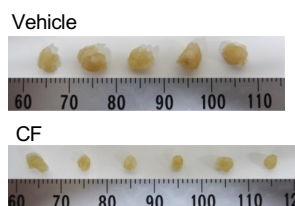


図5. HuCCT1 細胞を移植したマウスに colletofragarone A2 (CF) を腫瘍内投与した際の影響. CF は 1 日おきに投与し 13 日目に腫瘍を摘出した.

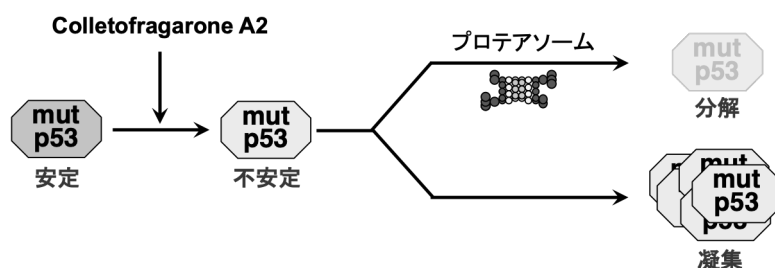


図6. Colletofragarone A2 の変異型 p53 (mut p53) に対する作用に関する考察.

(2) 宮崎で採取したオオバタンキリマメの葉から単離した真菌を米培地で培養し、そのエキスから torreyanic acid の新規類縁体を単離した。Saos-2 (p53-R175H) 細胞を用いて、変異型 p53 に対する化合物の作用を、変異型および野生型両方の p53 を認識する DO-1 抗体と、変異型 p53 のみを認識する Pab240 抗体を用いて蛍光免疫染色により評価した。さらに、ウェスタンブロッティングにより、化合物で Saos-2 (p53-R175H) 細胞を処理すると、変異型 p53 が減少することを確認した [日本生薬学会第 68 回年会で口頭発表 (2022 年 9 月)]。

<引用文献>

- ①S. Tsukamoto, H. Hirota, M. Imachi, M. Fujimuro, H. Onuki, T. Ohta, H. Yokosawa. Himeic acid A: a new ubiquitin-activating enzyme inhibitor isolated from a marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 191-194 (2005).
- ②R. Yamanokuchi, K. Imada, M. Miyazaki, H. Kato, T. Watanabe, M. Fujimuro, Y. Saeki, S. Yoshinaga, H. Terasawa, N. Iwasaki, H. Rotinsulu, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, M. Namikoshi, N. J. de Voogd, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. Hirtioreticulines A–E, indole alkaloids inhibiting the ubiquitin-activating enzyme, from the marine sponge *Hyrtios reticulatus*. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 4437-4442 (2012).
- ③S. Tsukamoto, T. Takeuchi, H. Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, R. W. M. van Soest, K. Ukai, H.

- Kobayashi, M. Namikoshi, T. Ohta, H. Yokosawa. Leucettamol A: a new inhibitor of Ubc13-Uev1A interaction isolated from a marine sponge, *Leucetta* aff. *microrhaphis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 6319-6320 (2008).
- ④ S. Ushiyama, H. Umaoka, H. Kato, Y. Suwa, H. Morioka, H. Rotinsulu, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. Manadosterols A and B, sulfonated sterol dimers inhibiting Ubc13-Uev1A interaction, isolated from the marine sponge *Lissodendryx fibrosa*. *J. Nat. Prod.* **75**, 1495-1499 (2012).
- ⑤ S. Tsukamoto, T. Yoshida, H. Hosono, T. Ohta, H. Yokosawa. Hexylitaconic acid: a new inhibitor of p53-HDM2 interaction isolated from a marine-derived fungus, *Arthrimum* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 69-71 (2006).
- ⑥ Y. Nakamura, H. Kato, T. Nishikawa, N. Iwasaki, Y. Suwa, H. Rotinsulu, F. Losung, W. Maarisit, R. E. P. Mangindaan, H. Morioka, H. Yokosawa, S. Tsukamoto. Siladenoserinols A–L: new sulfonated serinol derivatives from a tunicate as inhibitors of p53-Hdm2 interaction. *Org. Lett.* **15**, 322-325 (2013).
- ⑦ M. Yamaguchi, M. Miyazaki, M. P. Kodrasov, H. Rotinsulu, F. Losung, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, H. Yokosawa, B. Nicholson, S. Tsukamoto. Spongiacidin C, a pyrrole alkaloid from the marine sponge *Stylissa massa*, functions as a USP7 inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 3884-3886 (2013).
- ⑧ N. Tanokashira, S. Kukita, H. Kato, T. Nehira, E. D. Angkouw, R. E. P. Mangindaan, N. J. de Voogd, S. Tsukamoto. Petroquinones: Trimeric and dimeric xestoquinone derivatives isolated from the marine sponge *Petrosia alfiani*. *Tetrahedron* **72**, 5530-5540 (2016).
- ⑨ 人羅勇氣、塚本 佐知子. p53 を標的とするがん治療薬. 実験医学増刊「ゲノム医療時代のがん分子標的薬と診断薬研究 (編集: 西尾和人)」, 羊土社, **38**, 184-190 (2020).
- ⑩ Y. Sadahiro, H. Kato, R. M. Williams, S. Tsukamoto. Irpexine, an Isoindolinone Alkaloid Produced by Coculture of Endophytic Fungi, *Irpex lacteus* and *Phaeosphaeria oryzae*. *J. Nat. Prod.* **83**, 1368-1373 (2020).
- ⑪ Y. Sadahiro, Y. Hitora, S. Tsukamoto. Colletofragarone A2 and colletoins A–C from a fungus *Colletotrichum* sp. decrease mutant p53 levels in cells. *J. Nat. Prod.* **84**, 3131-3137 (2021).

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）

1. 著者名 Sadahiro Yusaku, Hitora Yuki, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 84
2. 論文標題 Colletofragarone A2 and Colletoins A-C from a Fungus Colletotrichum sp. Decrease Mutant p53 Levels in Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 3131 ~ 3137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00913	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 -

1. 著者名 人羅勇氣、塚本 佐知子	4. 巻 38
2. 論文標題 p53を標的とするがん治療薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 実験医学増刊「ゲノム医療時代のがん分子標的薬と診断薬研究（編集：西尾和人）」	6. 最初と最後の頁 184-190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Sadahiro Yusaku, Hitora Yuki, Kimura Ichiro, Hitora-Imamura Natsuko, Onodera Risako, Motoyama Keiichi, Tsukamoto Sachiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Colletofragarone A2 Inhibits Cancer Cell Growth <i>In Vivo</i> and Leads to the Degradation and Aggregation of Mutant p53	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1598 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.2c00202	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6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大久保美咲、人羅勇氣、貞廣優作、塚本佐知子
2. 発表標題 新規torreyanic acid類縁体の単離・構造決定と変異型p53に対する作用について
3. 学会等名 日本生薬学会第68回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塚本佐知子
2. 発表標題 p53を標的とする天然物創薬
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 貞廣優作、人羅勇氣、塚本佐知子
2. 発表標題 Colletofragarone A2による変異型p53の分解誘導のメカニズムに関する研究
3. 学会等名 第37回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sachiko Tsukamoto, Yusaku Sadahiro, Yuki Hitora
2. 発表標題 Search for the natural products that decrease mutant p53 levels in cells
3. 学会等名 PACIFICHEM 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貞廣優作、人羅勇氣、塚本佐知子
2. 発表標題 新規colletofragarone A2類縁体の単離構造決定および変異型p53に対する作用について
3. 学会等名 第63回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 貞廣優作、人羅勇氣、塚本佐知子
2. 発表標題 変異型 p53の機能回復に着目した天然物スクリーニング
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 天然薬物学分野 http://kumamoto-natmed.org/
--

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