

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06977

研究課題名(和文) 抗アポトーシス性タンパク質MCL-1選択的阻害活性を持つ新規抗がん剤の創製

研究課題名(英文) Development of new anti-cancer drug with anti-apoptotic protein MCL-1 selective inhibitory activity

研究代表者

横屋 正志 (YOKOYA, MASASHI)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50338539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タイ国に生息する海洋生物より発見したレニエラマイシンT(RT)をモチーフとし、本化合物がもつ抗がん活性を保持したままでの構造の簡略化をおこなった。がんの中でも特に発症率と死亡率が増加傾向にある肺がんのうち最も多いタイプである非小細胞肺がんをターゲットとし、合成した化合物群の活性評価を実施した。その結果、DH-25と命名したチアゾール環をもつRTの右半部モデル化合物が、肺がん細胞に対して非常に強力な抗がん活性を示すことを明らかとした。本化合物は、がんの再発や薬剤耐性への関与が指摘されているがん幹細胞にも効果があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において死因のトップであるがんを新しい作用で治療する医薬品の開発をおこなった。がんの根治が難しい要因として、がん細胞が医薬品に対し抵抗性を示すことが挙げられる。我々が開発した化合物は、この抵抗性に関与しているタンパク質を減少させることで、がん細胞自らを細胞死(アポトーシス)させることができる。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the most prevalent cause of cancer death, and according to estimates of the global cancer statistics of incidence and mortality of all types of malignancies, its incidence is increasing. Derivatives of the RT right-half analog were used to treat NSCLC cells (H460 and H23) to analyze cell viability. The results revealed that the right half model compound of RT with thiazole ring, named DH-25, shows very potent anticancer activity against NSCLC. The compound was also shown to be effective against cancer stem cells, which have been implicated in cancer recurrence and drug resistance.

研究分野：天然物化学、医薬品化学

キーワード：海洋天然物 抗がん剤 イソキノリンアルカロイド アポトーシス Mcl-1 がん幹細胞

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。

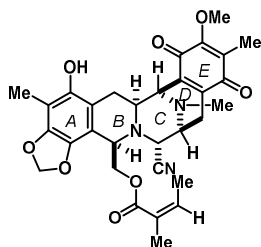
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において、がんは死因のトップを走り続けている。中でも肺がんは、その死亡率の高さから克服すべき重要ながんの一つとされている。非小細胞肺がん (NSCLC: Non-small-cell Lung Cancer) は肺がんの中で最も多いタイプであり、この病気は発見時に進行期 (stage -) にあることが多い。そのため、がん治療における第一選択肢となる外科的切除が非適応なケースが多く、放射線療法と化学療法の併用療法に頼っている実情がある。しかし、NSCLC に対する化学療法剤の開発は遅れており、死亡率が高い要因となっている。

NSCLC における化学療法抵抗性の発現には、細胞死の一つであるアポトーシスに関連するタンパク質でありアポトーシスを抑制する Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) ファミリーたんぱく質が NSCLC 内で高発現していること、また、再発や転移性腫瘍の発現は、幹細胞の性質と腫瘍形成能をもつがん幹細胞 (CSCs: Cancer Stem Cells) が関与していることが報告されている。したがって、Bcl-2 タンパク質の選択的阻害剤の開発や、CSCs をターゲットとした新規抗がん剤の開発は、化学療法による NSCLC の新たな治療法創製への応用が期待される。

本研究者はすでに、タイ国の沿岸に生息する青色海綿である *Reniera sp.* の抽出エキスより新規海洋天然物としてレニエラマイシン T (RT) を発見し、本化合物が強力な抗がん活性を示し、さらにその抗がん活性発現機構が、アポトーシスを抑制するタンパク質である Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) を阻害していることを見いだしている。



レニエラマイシン T
(RT)

2. 研究の目的

上記背景より本課題は、RT の化学構造を基盤とする構造最適化により、抗アポトーシス性タンパク質である Mcl-1 や Bcl-2 タンパク質を選択的に阻害し、がん細胞のアポトーシスを誘発する化合物の創製を目指すものである。RT の不斉合成をすでに達成しているが、複雑な構造を有しているため大量供給は困難である。そこで、本系化合物の安定供給方法の確立と、RT の抗がん活性の発現に重要な部分構造の抽出による、構造単純化に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) RT の化学構造を基盤とする、右半部モデル化合物群の不斉合成をおこない、RT と同等の抗がん活性を示す化合物の創製をめざす (図 1)。具体的には、RT の E 環部の置換様式および窒素置換基の最適化を検討する。

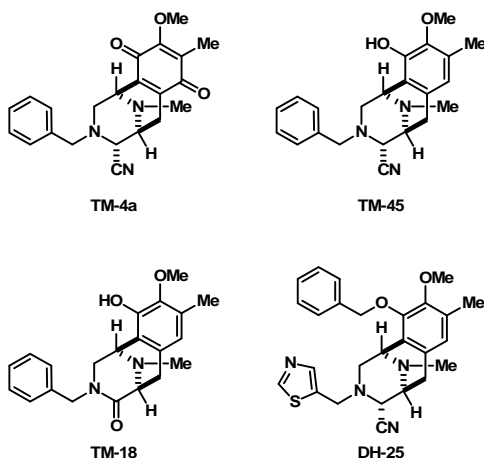


図 1. RT 右半部モデル化合物の具体例

(2) RTの構造的特徴として、二つの芳香環(A環、E環)の存在が挙げられる。そこで、種々の置換基をもつ二つの芳香環をメチレン鎖で繋げた bibenzyl 化合物の合成をおこない、RT と同等の抗がん活性を示す化合物の創製をめざす(図2)。

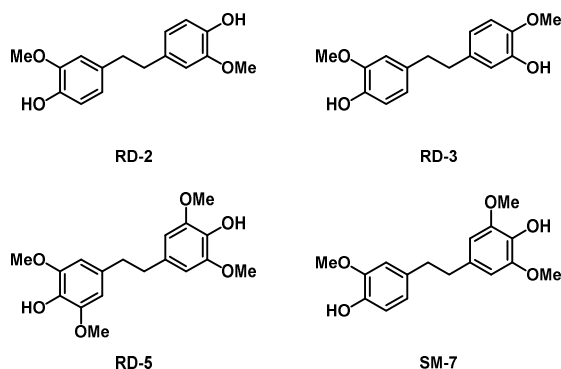


図2. Bibenzyl 型 RT モデル化合物の具体例

(3) ET743の置換様式構築方法の開発
 エクチナサイジン 743 (ET743) は米国フロリダ半島南岸に生息する群体ホヤ (*Ecteinascidia turbinata*) のメタノール抽出液から発見されたイソキノリン系天然物であり、一般名: ヨンデリス、商品名: タラベクテジンとして、約 80 か国で抗悪性軟部肉腫薬として使用が承認されている。本課題において基盤化合物とした RT は ET743 と部分的に類似した構造をもっている。そこで RT を出発物質とした ET743 の E 環置換様式をもつ ET743 類似体(図3)への半合成をめざし、抗がん活性に対する AE 環部の置換基様式の影響を明らかにする。

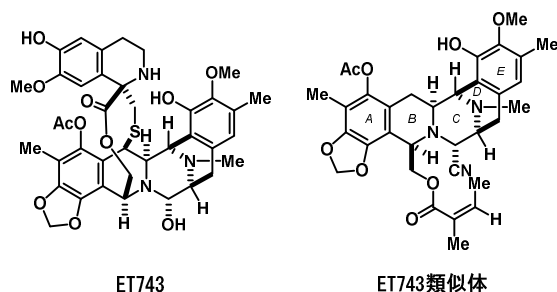


図3. ET743 および ET743 類似体の化学構造

(4) RTの安定供給方法の確立に向けた光環化反応
 RT および ET743 の構造的共通点として、A 環部メチレンジオキシ環の存在が挙げられる。本置換様式をもつ芳香環化合物を簡便に合成する手法を開発し、RT の安定供給方法を確立する。

4. 研究成果

(1) RTの右半部モデル化合物の合成と活性評価

RT の化学構造を基盤とする右半部モデル化合物を合成し、肺がん細胞株 (H460) における細胞毒性試験を実施した(図4)。その結果、殺細胞活性の発現にはアミノトリル構造が重要であり、さらに窒素置換基としてアリル基ではなく、ベンジル基などの芳香環が必要であることが明確になった。そのうち、最も殺細胞活性が強かったチアゾール環をもつ DH-25 を用い、更なる発現機構の解明を目指し研究を継続した。H460 細胞を DH-25 で処理した後に、Hoechst33342 および PI 染色をおこなう事で、H460 細胞がアポトーシス誘導されていることが確認された。さらに、DH-25 で処理した後の H460 細胞をウェスタンブロッティング解析しアポトーシス関連タンパク質を調査した。その結果、DH-25 処理に反応して Mcl-1 タンパク質が減少していることが確認できた。また DH-25 は、がん幹細胞の上流シグナルである Akt と直接相互作用していることがドッキングシミュレーションから示された。DH-25 は基盤化合物とした RT と同等の抗がん活性を示し、その殺細胞活性機構として Akt と相互作用することによるアポトーシス誘導であることを示唆する結果が得られ、NSCLS をターゲットとした新たな抗がん剤の開発につながる知見を得た。

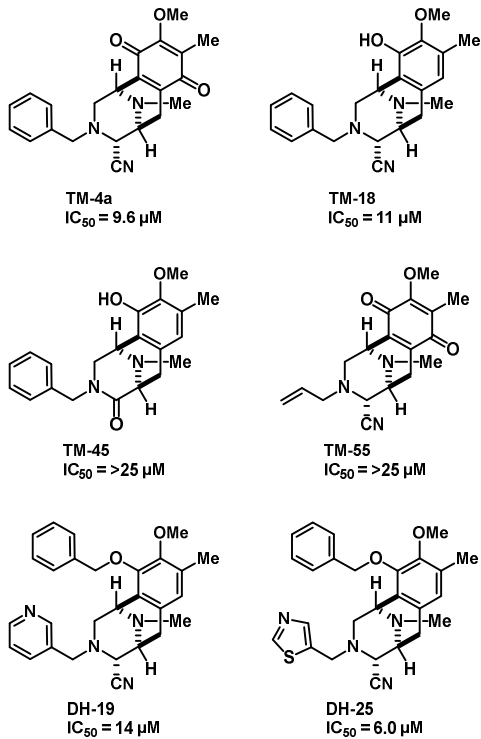


図 4 . RT 右半部モデル化合物の化学構造と殺細胞活性

(2) RT の AE 環部に相当する bibenzyl 化合物の合成と活性評価

上記の右半部モデル化合物の更なる構造簡略化を目指し、RT の AE 環部に相当する bibenzyl 化合物を合成し、肺がん細胞株 (H23) における細胞毒性試験を実施した (図 5)。その結果、左右のベンゼン環にヒドロキシ基とメトキシ基がそれぞれ一つずつ結合した RD-2 および RD-3 で、それぞれ H23 肺がん細胞に対する殺細胞活性に大きな違いがあることが分かった。また、RD2 の片方のベンゼン化にメトキシ基を一つ追加した SM-7 が最も殺細胞活性が強く、H292 肺がん細胞に対する IC₅₀ は、5.5 μM を示し、RT 右半部モデル化合物と同等の活性を示した。最も殺細胞活性が強かった SM-7 を用い更に研究を継続した。SM-7 は、正常ヒト肺上皮細胞 (BEAS-2B) に対する殺細胞活性 IC₅₀ は、>200 μM であり、正常細胞に対する毒性を示さない。さらに、Hoechst33342 および PI 染色でアポトーシス誘導していることが確認された。また、Akt とのドッキングシミュレーションの結果、SM-7 は Akt のアロステリック阻害剤として作用し、アポトーシス誘導していることを示唆する知見が得られた。

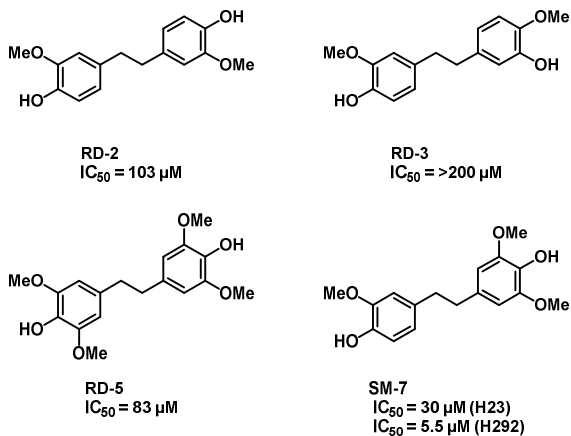
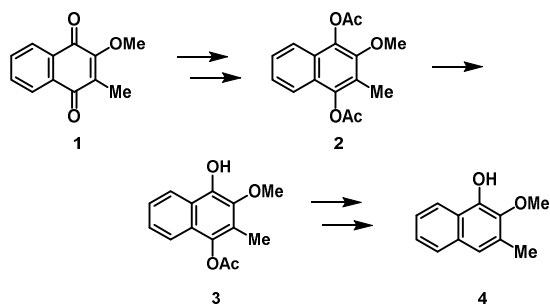
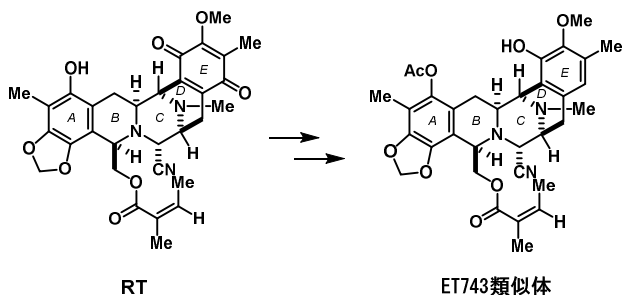


図 5 . Bibenzyl 型 RT モデル化合物の化学構造と殺細胞活性

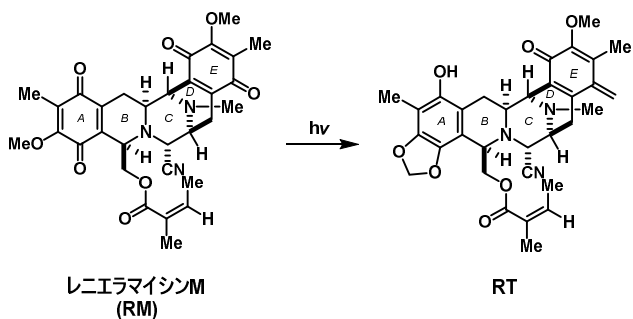
(3) ET743 の置換様式構築方法の開発

本課題で基盤化合物として設定した RT は、すでに約 80 国で抗悪性軟部肉腫薬として使用が承認されている Et743 と同じ A から E 環までの 5 環骨格をもち、さらに A 環部置換様式も同じである。一方で、E 環部は RT が p-キノン環なのに対し、ET743 はフェノールと酸化段階が異なっている。そこで、RT の E 環部置換様式を ET743 の E 環部置換様式へと変換する手法を確立するため、モデル化合物として設定したナフトキノ 1 を出発物質としたフェノール 4 への変換をおこなった。キノ 1 を還元しアセチル化でジエステル 2 へと変換後、酵素反応を利用する事で、二つ存在するエステルのうち片方のみを選択的に加水分解し 3 が得られることを見

だした。得られた 3 に対し数工程を経て 4 へと変換することに成功した。本手法を応用することで、RT を出発物質とした ET743 類似体への半合成が可能となり、がん細胞に対する殺細胞活性の置換基の影響をさらに明らかにできることが期待される。



(4) RT の安定供給方法の確立に向けた光環化反応本研究を展開する過程で本系海洋天然物の左半部 p-キノンモデル化合物の塩化メチレン溶液に蛍光灯下で照射することで RT の A 環部に存在するメチレンジオキシ環へと変換されることを見いだした。本光環化反応をレニエラマイシン M (RM) に応用し RT の安定供給方法を確立した。本手法で得た RT を出発物質とした RT 誘導体の合成と SAR 研究を現在展開している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masashi Yokoya, Ryo Sato, Naoki Saito	4. 巻 105
2. 論文標題 LIPASE-CATALYZED SITE-SELECTIVE DEACETYLATION OF 2METHOXY-3-METHYLNAPHTHALENE-1,4-DIOL DIACETATE FOR CONSTRUCTION OF CHARACTERISTIC SUBSTITUTED 1,2,3,4TETRAHYDROISOQUINOLINE DERIVATIVE OF ECTEINASCIDIN MARINE NATURAL PRODUCT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 511~522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-21-S(R)1	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 Petsri Korrakod, Yokoya Masashi, Tungsukruthai Sucharat, Rungrotmongkol Thanyada, Nutho Bodee, Vinayanuwattikun Chanida, Saito Naoki, Matsubara Takehiro, Sato Ryo, Chanvorachote Pithi	4. 巻 12
2. 論文標題 Structure-Activity Relationships and Molecular Docking Analysis of Mcl-1 Targeting Renieramycin T Analogues in Patient-derived Lung Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 875 ~ 875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12040875	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 Innets Bhurichaya, Thongsom Sunisa, Petsri Korrakod, Racha Satapat, Yokoya Masashi, Morieue Sohsuke, Chaotham Chatchai, Chanvorachote Pithi	4. 巻 27
2. 論文標題 Akt/mTOR Targeting Activity of Resveratrol Derivatives in Non-Small Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 8268 ~ 8268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27238268	査読の有無 無
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 Petsri Korrakod, Yokoya Masashi, Racha Satapat, Thongsom Sunisa, Thepthanee Chorpaka, Innets Bhurichaya, Ei Zin Zin, Hotta Daiki, Zou Hongbin, Chanvorachote Pithi	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel Synthetic Derivative of Renieramycin T Right-Half Analog Induces Apoptosis and Inhibits Cancer Stem Cells via Targeting the Akt Signal in Lung Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5345 ~ 5345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065345	査読の有無 無
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 Thongsom Sunisa, Racha Satapat, Petsri Korrakod, Ei Zin Zin, Visuttijai Kittichate, Morieue Sohsuke, Yokoya Masashi, Chanvorachote Pithi	4. 巻 23
2. 論文標題 Structural modification of resveratrol analogue exhibits anticancer activity against lung cancer stem cells via suppression of Akt signaling pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Complementary Medicine and Therapies	6. 最初と最後の頁 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12906-023-04016-6	査読の有無 無
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 Yokoya Masashi, Yamazaki-Nakai Miku, Nakai Keiyo, Sirimangkalakitti Natchanun, Chamni Supakarn, Suwanborirux Khanit, Saito Naoki	4. 巻 86
2. 論文標題 Transformation of Renieramycin M into Renieramycins T and S by Intramolecular Photoredox Reaction of 7-Methoxy-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-5,8-dione Derivatives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 222 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00974	査読の有無 無
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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 堀田 大貴、Chanvorachote Pithi、木村 真也、山中 正道、齋藤 直樹、横屋 正志
2. 発表標題 抗腫瘍活性レニエラマイシン海洋天然物を基盤としたMCL-1標的薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
タイ	チュラロンコーン大学			