

## 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 5 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501050

研究課題名（和文） 脂肪酸パルミチン酸アミド体を使った大腸がん分子標的療法の開発

研究課題名（英文） Development of a palmitic acid-derived anticancer drug for the treatment of human colon cancer

研究代表者

酒々井 眞澄 (SUZUI MASUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30347158

研究成果の概要（和文）：

本研究の最終ゴールは、脂肪酸誘導体を使った大腸がん分子標的療法の開発である。デセン酸を初期リード、パルミチン酸を後期リードとしてヒト大腸がん細胞株に対する IC<sub>50</sub> 値を指標に構造活性相関 (QSAR) 解析により抗がん効果のファルマコフォアが飽和炭素数 16 と 1 位炭素へのピペリジン環導入であることを突き止めた。化合物コード 903 (特願 2010-079755) は今のところ細胞レベルでの抗がん効果が最も強く、正常細胞に対する毒性が低い。ヌードマウス皮下移植モデルでは腫瘍体積抑制効果を認めた。本モデルでの ED<sub>50</sub> 値 (effective dose) はおおよそ 0.025~0.05 mg/kg と見積もられた。化合物コード 903 の pKa および cLogD を計算した結果、経口投与した場合に消化管より吸収されることが予測された。化合物コード 903 は腫瘍選択性が高く、広範な抗腫瘍効果を持つため大腸がんを含む消化器がん治療の新たなリード化合物になりうると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The final goal of the present study was to develop a fatty acid-derived anticancer drug for the treatment of human colon cancer. We decided to use the natural fatty acid decenoic acid and palmitic acid as lead compounds. Using quantitative structure activity relationship (QSAR) analysis, we found that a saturated aliphatic tail of 16 carbon atoms and a side chain at the C-1 position composed of piperidine rings markedly contribute to the in vitro anticancer effects of the palmitic acid derivatives. Compound code 903 was determined to be the most effective anticancer agent, which was less toxic to normal epithelial cells. In a nude mouse xenograft model, this agent inhibited the growth of implanted tumor cells. We estimated that the effective dose of ip treatment would be 0.025-0.05 mg/kg. Compound code 903 was thought to be absorbed from gastrointestinal tract by values of pKa and cLogD. The drug code 903 may be a promising lead compound for the treatment of colon cancer and other solid tumors because of its broad cancer killing activity and significant tumor specificity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：脂肪酸誘導体、抗がん剤、大腸がん、構造活性相関、リード化合物

1. 研究開始当初の背景

天然物の生物学的活性を研究する過程で蜂産品ローヤルゼリーに含まれる中鎖脂肪酸であるデセン酸（炭素数 10）をヒト大腸がん細胞（HT29 および HCT116）にばく露した結果、デセン酸は増殖抑制効果を持つことを発見した。よって、デセン酸を初期リードとして構造活性相関（QSAR）解析により新たな抗がん剤の設計、合成が可能であるとの着想に至った。このアイデアにもとづき予備実験で初期ロットとして約 70 種類の誘導体（コード番号 7 シリーズ化合物、8 シリーズ化合物および 9 シリーズ化合物）を設計、合成した後、スクリーニングしたところ、炭素数が 16 個の 2 種類のパルミチン酸誘導体に強い抗がん効果があることがわかった（特願 2009-127093）。現在の大腸がん治療での 4 剤併用療法（内 1 剤は分子標的薬）は併用薬剤数の限界と思われ、分子標的薬であっても重篤な副作用が起きる場合がある。また、転写因子抑制薬は特異性や毒性の点から前臨床試験を含めて実用には至っていない。本研究では、天然物誘導体を初期リードとすることで正常細胞に対する毒性の軽減に生かそうと試みた。本研究の特色は、膨大な化合物ライブラリー（数十万～物質）のスクリーニングは行わず、我々の実験と独自の天然物ライブラリー（植物、蜂産品など）に蓄積された情報を初期リードの分子設計に生かした点である。

2. 研究の目的

本研究の最終ゴールは脂肪酸パルミチン酸アミド体を使った大腸がん分子標的療法の開発である。具体的な研究目的として、(1) QSAR にもとづく抗がん剤の構造最適化と毒性評価、(2) インシリコ解析による標的候補分子の検討、(3) 抗がんスペクトラムの検証、(4) 個体レベルでの抗がん効果検証、を行った。(1)については、抗がん効果を規定

するファルマコフォアおよび正常細胞に対する毒性発現に關与する構造と物質の特性を明らかにする。これらの情報は腫瘍選択性を求める後期ロット誘導体（コード番号 10 シリーズ化合物、11 シリーズ化合物および 12 シリーズ化合物）の分子設計に応用できる。(2)については、抗がん効果や毒性発現に關与する抗がん剤の化学構造や標的分子（タンパク）の 3 次元構造、アミノ酸配列などの情報を得ることで化合物の最適化に応用できる。(3)については、適応可能ながん腫の範囲を知る手掛かりであり、作用機序、動物試験計画立案などに生かすことができる。(4)では、機序仮説の検証、適応症の基礎データ蓄積、化合物の製剤型（遊離型と塩酸塩）に有利な投与形態（経口と腹腔内）の検討に必要である。

3. 研究の方法

(1) 抗がん物質合成とスクリーニング

①構造活性相関（QSAR）に基づいたファルマコフォア特定

材料と方法：(a) 分子設計と合成、炭素鎖 10～17 の脂肪酸骨格をもとに側鎖構造を修飾、がん細胞増殖抑制効果を指標に構造の最適化を進めた。(b) ヒト大腸がん細胞株 HT29 および HCT116 細胞株をプレートにまき、コロニーアッセイおよび MTT アッセイを行った。IC<sub>50</sub> 値（50%増殖抑制率）を指標に効果判定を実施し、効果ありの場合は 2 次スクリーニング実施、これを繰り返した。

②構造の最適化（分子特異性を高めたプロトタイプ作成）  
IC<sub>50</sub> 値を指標に炭素鎖の数、側鎖官能基決定、二重結合有無の効果、などを評価した。

(2) 標的分子検索と抗がん活性評価

標的候補分子：標的分子のインシリコ解析、候補化合物の親水性、親油性を考慮し受容体型チロシンキナーゼと関連する転写因子と

の結合性を評価した。材料と方法：リガンドをスクリーニングで構造最適化された化合物とし標的受容体をチロシンキナーゼと転写因子として Discovery Studio2.1~3.0 プログラムを用いて CDOCKER 演算を実行し、ドッキングスコア (CDOCKER ENERGY および CDOCKER INTERACTION ENERGY) にて結合性を予測した。標的候補分子のアミノ酸構造、3次元構造と結合した化合物の配置を考慮し、効果や毒性に関与する構造上の特徴を考察した。

### (3) 抗がんスペクトラム検討

材料と方法：ヒト肝がん細胞株 HepG2、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト中皮腫細胞株 Mesol、マウスメラノーマ細胞株 B16F10 に対する抗がん効果をコロニーアッセイあるいは MTT アッセイにて検討した。

### (4) 個体レベルでの抗がん効果評価

材料と方法：抗がん効果が最も強い化合物について、SD ラットを用いて 2 週間急性毒性試験を行い、LD<sub>50</sub> 値 (50%致死量) を求めた。Cr1: CD (SD) 雌雄ラットを用い、被検物質を大豆油に 50, 100 および 200 mg/mL の濃度で溶解し、0 (対照群), 500, 1,000 および 2,000 mg/kg の用量で雌雄各 5 匹に単回強制経口投与し、14 日間状態の観察、投与後 1, 3, 7, 10 および 14 日目に体重を測定した。さらに、ヌードマウスゼノグラフトモデルを用いて腫瘍体積縮小効果を検討した。雌雄ヌードマウス側腹部皮下に HT29 細胞を移植し

(2.5x10<sup>6</sup>)、細胞生着後増殖を確認して被検物質を 0.05 mg/kg で 10 日毎に腹腔内投与した。実験開始後 6 週目まで観察し効果を判定した。

## 4. 研究成果

(1) について、抗がん効果を規定する構造 (ファルマコフォア) として飽和炭素鎖の長さおよび 1 位炭素へのアミド結合による環状化合物 (ペペリジンなど) の結合であることがわかった。化学構造と毒性との関連では、ペペリジン環の反応性に富む部分、N (窒素) 原子の求核性が毒性に関与することがわかった。飽和炭素数を 9 から 17 に置換して IC<sub>50</sub> 値を指標にスクリーニングした結果、IC<sub>50</sub> 値が最も低い化合物は飽和炭素数 16 の化合物コード 903 で、IC<sub>50</sub> 値 (200 nM) は初期リードのデセン酸 (炭素数 10) と比較して 1,000 倍以上の抗がん活性を発揮した。2 位炭素への二重結合挿入は抗がん活性への影響は少なかった。1 μM の化合物コード 903 をヒト大腸がん細胞にばく露した結果、がん細胞の 6 割は死滅するがヒト大腸正常上皮細胞は 9 割生存した。

(2) について、コード 903 の物理化学的特

性 (塩酸塩は水溶性) を考慮したインシリコ解析により受容体型チロシンキナーゼ c-kit タンパクのリン酸化ドメインに高い結合性を持つことが予測された。他に、c-kit 関連の転写因子である STAT3 の SH2 ドメイン (ホモダイマー結合部位) への結合性も予測された。飽和炭素数を 9 から 17 に置換した誘導体の IC<sub>50</sub> 値と各誘導体の c-kit/STAT3 への親和性 (ドッキングスコア) を評価した結果、IC<sub>50</sub> 値が低いほど親和性が高い傾向にあった。

(3) について、ヒト肝がん細胞株 HepG2、ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト中皮腫細胞株 Mesol、マウスメラノーマ細胞株 B16F10 での IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 1.9、2、4、5 μM であり、抗がんスペクトラムは広いと考えられた。

(4) について、Cr1: CD (SD) 雌雄ラットを用いた。化合物コード 903 を大豆油に 50, 100 および 200 mg/mL の濃度で溶解し、0 (対照群), 500, 1,000 および 2,000 mg/kg の用量で雌雄各 5 匹に単回強制経口投与し 14 日間状態の観察、投与後 1, 3, 7, 10 および 14 日目に体重を測定した。被検物質の投与により、雄では 2,000 mg/kg 群の全個体が死亡し、1,000 mg/kg 群で 5 個体中 2 個体が死亡した。雌では 2,000 および 1,000 mg/kg 群の全個体が死亡し、500 mg/kg 群で 5 個体中 1 個体が死亡した。症状に関しては雌雄の 2,000 mg/kg 群および雌の 1,000 mg/kg 群において投与後 30 分~2 時間までに軟便および鎮静が発現した。雄の 1,000 mg/kg 群でも投与後 30 分~2 時間までに軟便と鎮静が出現したが、生存個体では下腹部の汚れは 4 日目まで、被毛の粗剛化は 8 日目まで観察された。雄の 500 mg/kg 投与群では、投与後 30 分までに 1 個体で軟便がみられ、下腹部の汚れは 1 日目よりみられたが 7 日目には消失した。途中死亡個体では剖検時に胃の膨満および粘膜の変色がみられた。組織学的に食道上皮のびらん、潰瘍形成および abscess 形成を認めた。生存動物では肝細胞への脂肪沈着を認めた。ヌードマウス皮下移植モデルを用いて、薬剤を 0.05 mg/kg で 10 日毎に腹腔内投与し、腫瘍の生着と肉眼的増殖を確認した。実験開始後 3 週目より腫瘍体積抑制効果を認め、犠牲死 (6 週目) まで抑制効果が持続した。肉眼的には薬剤投与群の腫瘍は中心部が壊死に陥り、組織学的には中心部の腫瘍細胞に壊死像、karyorrhexis、picnosis などの所見を認めた。実験期間中に有意な体重減少は認めなかった。本モデルでの ED<sub>50</sub> 値はおおよそ 0.025~0.05 mg/kg と見積もられた。化合物コード 903 の pKa および cLogD を計算した結果、経口投与した場合に消化管より吸収されることが予測された。化合物コード 903 の抗がん効果は 5FU より強く、腫瘍選択性が高いという優れた特性を持つため大腸がんを含む消化器がん治療の新たなリード化合物になり

うると考えられた。実験エビデンスにもとづき、抗がん剤候補化合物を特許審査請求した（特願 2009-127093 は 2010.12.9 審査請求、特願 2010-079755 は 2013.1.15 審査請求）。尚、前者案件は 2013.4.5 に特許第 5237884 号として登録された。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 酒々井眞澄、深町勝巳、二口充、磯田泰彰、森脇健太. パルミチン酸誘導体のインビトロおよびインビボ抗がん効果の検証. 日本薬学会第 133 年会；横浜：2013 年 3 月 28 日
- ② 磯田泰彰、森脇健太、坂井勇斗、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミチン酸誘導体のインビトロ、インビボ抗がん効果の検討および作用機序のインシリコ解析. 個体レベルのがん研究による相乗効果；琵琶湖：2013 年 2 月 7 日
- ③ 酒々井眞澄、坂井勇斗、深町勝巳、二口充、磯田泰彰、森脇健太. パルミチン酸誘導体の抗がん効果の検証. 個体レベルのがん研究による相乗効果；琵琶湖：2013 年 2 月 6 日
- ④ 酒々井眞澄、深町勝巳、二口充、森脇健太. 新規パルミチン酸誘導体の in vitro および in vivo 抗がん活性. 第 71 回日本癌学会学術総会；札幌：2012 年 9 月 20 日
- ⑤ 酒々井眞澄、深町勝巳、二口充、森脇健太. 定量的構造活性相関によるパルミチン酸誘導体の抗がん活性スクリーニング. 第 19 回日本がん予防学会；岐阜：2012 年 6 月 23 日
- ⑥ 酒々井眞澄. 食品中に含まれる脂肪酸の健康への影響評価とパルミチン酸をリード化合物とする抗がん剤開発. 油化学セミナー；名古屋：2012 年 6 月 15 日
- ⑦ 酒々井眞澄、二口充、森脇健太、池永周平、坂井勇斗、深町勝巳. 新規抗がん剤パルミチン酸ピペリジンの 2 週間急性毒性試験. 個体レベルのがん研究のパラダイム；琵琶湖：2012 年 1 月 18-19 日

- ⑧ 森脇健太、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 新規パルミチン酸誘導体の in vitro 抗がん活性と in silico 標的分子のスクリーニング. 第 70 回日本癌学会学術総会；名古屋：2011 年 10 月 4 日
- ⑨ 酒々井眞澄、森脇健太、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 定量的構造活性相関による新規抗がん剤パルミチン酸誘導体のファルマコホア抽出. 第 70 回日本癌学会学術総会；名古屋：2011 年 10 月 3 日
- ⑩ 森脇健太、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 新規パルミチン酸誘導体の in vitro 抗がん活性のスクリーニングと in silico 標的分子の解析. がん若手研究者ワークショップ；蓼科：2011 年 9 月 1 日
- ⑪ 酒々井眞澄、深町勝巳、二口充、森脇健太. 定量的構造活性相関による新規抗がん剤パルミチン酸アミド体のファルマコホア抽出. がん予防大会；京都：2011 年 6 月 20-21 日
- ⑫ 酒々井眞澄、石原正志、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 新規化合物パルミチン酸アミド体によるヒト大腸がん細胞の増殖抑制効果. 第 69 回日本癌学会学術総合；大阪：2010 年 9 月 22 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/moltox.dir/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

酒々井 眞澄 (SUZUI MASUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：30347158

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

飯沼 宗和 (IINUMA MUNEKAZU)

岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：70082998

吉田 一郎 (YOSHIDA ICHIRO)

岐阜薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：40432447